



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP  
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU**

**Jefferson Monteiro Henriques**

**IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR (DNA *BARCODE*) DOS  
PEIXES DA BACIA DO RIO RIBEIRA DE IGUAPE E DOS  
RIOS COSTEIROS DO ESTADO DE SÃO PAULO**

Dissertação apresentada ao Programa de  
Pós-Graduação em Ciências Biológicas  
(Zoologia) do Instituto de Biociências de  
Botucatu, para obtenção do título de  
Mestre

**Orientador: Prof. Dr. Claudio de Oliveira**  
**Co-orientador: Dr. Osvaldo Takeshi Oyakawa**

Botucatu – SP  
2010

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP  
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU**

**Jefferson Monteiro Henriques**

**IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR (DNA *BARCODE*) DOS  
PEIXES DA BACIA DO RIO RIBEIRA DE IGUAPE E DOS  
RIOS COSTEIROS DO ESTADO DE SÃO PAULO**

Botucatu – SP  
2010

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO  
DA INFORMAÇÃO  
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP

**BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: Selma Maria de Jesus**

Henriques, Jefferson Monteiro.

Identificação molecular (DNA Barcode) dos peixes pertencentes a Bacia do Rio Ribeira de Iguape e dos Rios Costeiros do Estado de São Paulo / Jefferson Monteiro Henriques. – Botucatu, 2010.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Botucatu, 2010

Orientador: Claudio de Oliveira

Co-orientador: Osvaldo Takeshi Oyakawa

Assunto CAPES: 20500009

1. Peixe - Genética - Ribeira, Rio    2. Ictiofauna    3. Zoologia

Palavras-chave: Bacia Ribeira de Iguape; *barcode*; Cox 1; Rios costeiros; Peixes



***Aos meus pais, que sempre se  
dedicaram, me incentivaram e estiveram  
presentes em todas as etapas da minha  
vida...***

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, por me abençoar sempre, por me enviar em uma bela família e por ter amigos inesquecíveis!!!

Ao meu orientador, Prof. Dr. Claudio de Oliveira, pelo exemplo de profissionalismo, pelos ensinamentos, pela paciência e pela confiança em mim depositada .

Ao Prof. Dr. Fausto Foresti pelo exemplo como pesquisador e dedicação aos alunos.

À FAPESP, pelo apoio financeiro.

Aos funcionários e técnicos do Departamento de Morfologia (Renato Devidé, Ricardo Teixeira e Zé Eduardo), pela disposição nas coletas e pelos momentos de descontração.

Agradeço ao apoio e amizade de todos companheiros e colegas do Departamento de Morfologia.

Aos companheiros de risadas, distrações e churrascos, Fábio (Fio), Guilherme (Varvito), Luiz (Zirigui), Kelly, Marlon, Bruno (Guiodai) e Mahmoud. “A amizade, depois da sabedoria, é a mais bela dádiva feita aos homens”. *François La Rochefoucauld*.

Aos que me ajudaram nesses últimos dias de muita correria e colaboraram para conclusão desta dissertação: Vanessa, Luiz (Zirigui) e Guilherme (Varvito). Muito OBRIGADO pela ajuda!!!

À Universidade Estadual Paulista, ao Instituto de Biociências (Botucatu-SP) e ao Departamento de Morfologia que proporcionaram a oportunidade e as condições para a realização desse estudo.

A minha namorada Vanessa, pelo companherismo, por “toda” a paciência (principalmente nessas últimas semanas) e todo o carinho dedicado!

A toda minha família, meus pais: Adelino Henriques e Neuza Monteiro Henriques, e irmã: Jeniffer, pelo apoio financeiro, amizade e é claro, a confiança.  
*Muito obrigado!*

## RESUMO

O rio Ribeira de Iguape e os rios litorâneos drenam uma importante faixa de terras da região leste de São Paulo e sua ictiofauna de água doce tem algumas semelhanças e muitas diferenças em relação às drenagens continentais. Os levantamentos ictiofaunísticos realizados nesses rios, como nas outras grandes bacias hidrográficas brasileiras, são ainda incompletos. Além disso, não existe consenso acerca do *status* taxonômico de muitas espécies listadas nesses levantamentos. As estimativas disponíveis sugerem que existam cerca de 100 espécies de água doce na bacia do Ribeira de Iguape e 50 nos rios litorâneos. Estudos recentes têm proposto o uso do gene mitocondrial Citocromo Oxidase subunidade I (Cox 1) como um sistema global de identificação para as plantas e animais. Essas sequências têm sido interpretadas como um código de barras (*barcode*), com as espécies sendo delimitadas por uma sequência particular ou por um conjunto de sequências muito similares. Foram obtidas e analisadas 400 sequências do gene Citocromo Oxidase subunidade I (Cox1) de 68 espécies para a bacia do Ribeira de Iguape e 315 sequências de 58 espécies pertencentes aos rios costeiros do estado de São Paulo. A distância K2P média encontrada entre indivíduos dentro das espécies do Ribeira de Iguape foi de 0,41%, e 6,32% entre espécies dentro de um mesmo gênero, similar ao encontrado nos rios costeiros onde a distância K2P foi de 0,77% dentro de espécies, em comparação à 6,16% entre espécies dentro de um mesmo gênero. Todas as espécies puderam ser diferenciadas por sua sequência Cox1, embora alguns indivíduos isolados de espécies distintas apresentaram haplótipos característicos de uma espécie do mesmo gênero. O presente estudo evidenciou que as espécies de peixes analisadas puderam ser identificadas de forma eficiente através da utilização do *barcode*, e pode ser usada para aplicações subsequentes em ecologia e sistemática.



## **ABSTRACT**

The Ribeira Iguape river and coastal rivers drain a large range of land east of São Paulo and its freshwater fishes has some similarities and many differences from the continental drainage. Surveys conducted ichthyofauna in these rivers, as in other large river basins in Brazil, is still incomplete. Moreover, there is no consensus on the taxonomic status of many species listed in these surveys. Available estimates suggest that there are about 100 freshwater fishes species in the Ribeira Iguape basin and 50 in coastal rivers. Recent studies have proposed the use of mitochondrial gene cytochrome oxidase subunit I (Cox 1) as a global system of identification for plants and animals. These sequences have been interpreted as a barcodes, with species being bounded by a particular sequence or a set of very similar sequences. Were obtained and analyzed 400 sequences of the gene cytochrome oxidase subunit I (Cox1) from 68 species of Ribeira de Iguape basin and 315 sequences of 58 species of coastal rivers from Sao Paulo state. The average K2P distance between individuals within species of Ribeira Iguape basin was 0.41% and 6.32% between species within a genus, similar to that found in coastal rivers where the K2P distance was 0.77% within species, compared to 6.16% between species within the same genus. All species were differentiated by their sequence Cox1, although some isolated individuals of different species had haplotypes of species of the same gender. The present study showed that fish species analyzed could be identified efficiently using barcode, and can be used for subsequent applications in ecology and systematics.

## LISTA DE FIGURAS

### INTRODUÇÃO GERAL

**Figura 1** – Mapas de São Paulo. (a) hidrografia do Estado (escala 1:250.000): em branco os componentes do sistema do Alto rio Paraná, em rosa os componentes do sistema do rio Ribeira de Iguape, em verde os componentes do sistema do Alto rio Paraíba do Sul e em laranja os componentes do sistema denominado de rios litorâneos. (b) hidrografia digitalizada sobreposta ao relevo realçado do Estado (escala 1:250.000). Mapas disponibilizados no sítio: [www.relevobr.cnpm.embrapa.br/conteudo/aplicacoes/hidrografico.htm](http://www.relevobr.cnpm.embrapa.br/conteudo/aplicacoes/hidrografico.htm)..... 14

### METODOLOGIA

**Figura 2** – Mapa de São Paulo, hidrografia do Estado (escala 1:250.000): em verde os componentes do sistema do rio Ribeira de Iguape, em laranja os componentes do sistema denominado de rios litorâneos. Mapas disponibilizados no sítio: [www.relevobr.cnpm.embrapa.br/conteudo/aplicacoes/hidrografico.htm](http://www.relevobr.cnpm.embrapa.br/conteudo/aplicacoes/hidrografico.htm)..... 16

### CAPÍTULO 1

**Figura 1** – Gráfico da frequência em que a divergência entre vizinhos mais próximos (nearest – neighbour distance –NND) se apresentou após análise das 68 espécies analisadas.....34

**Figura 2** – Gráfico da frequência em que a percentagem das divergências interespecíficas se apresentou após análise das 68 espécies analisadas .....35

**Figura 3** – Dendrograma obtido por Neighbour-joining (MEGA4.0) a partir das sequências *barcode* espécimes de peixes da Bacia do rio Ribeira de Iguape. Os valores de *bootstrap* estão representados nos respectivos nós. Retângulo vermelho corresponde ao espécime identificado incorretamente na coleção do laboratório.....40

### CAPÍTULO 2

**Figura 1** – Gráfico da frequência em que a divergência entre vizinhos mais próximos (nearest – neighbour distance –NND) se apresentaram após análise das 49 espécies analisadas.....52

**Figura 2** –Gráfico da frequência em que a percentagem das divergências interespecíficas se apresentou após análise das 49 espécies analisadas .....53

## LISTA DE TABELAS

### RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### CAPÍTULO 1

**Tabela 1** – Média da composição de bases (com desvio padrão) das sequências obtidas dos peixes da bacia do rio Ribeira de Iguape.....32

**Tabela 2** – Sumário de divergências genéticas (percentagens K2P) em vários níveis taxonômicos para as 68 espécies analisadas (400 espécimes).....33

**Tabela 3** – Diversidade da bacia do rio Ribeira de Iguape e distribuição das distâncias genéticas das 68 espécies analisadas em relação à distância genética para o vizinho mais próximo (nearest – neighbour distance - NND), utilizando o modelo K2P.....36

#### CAPÍTULO 2

**Tabela 1** – Média da composição de bases (com desvio padrão) das sequências obtidas dos peixes pertencentes aos rios costeiros do estado de São Paulo.....50

**Tabela 2** – Sumário de divergências genéticas (percentagens K2P) em vários níveis taxonômicos para as 49 espécies analisadas (308 espécimes).....51

**Tabela 3** –Diversidade dos rios costeiros do estado de São Paulo e distribuição das distâncias genéticas das 49 espécies analisadas em relação à distância genética para o vizinho mais próximo (nearest – neighbour distance - NND), utilizando o modelo K2P.....36

### DISCUSSÃO GERAL

**Tabela 1** –Sumário de divergências genéticas (percentagens K2P) em vários níveis taxonômicos para as 91 espécies analisadas (FBCR e FBCRII) (706 espécimes).....62

## SUMÁRIO

<b>1 Introdução Geral.....</b>	<b>01</b>
1.1 Identificação molecular de espécies ( <i>DNA Barcoding</i> ).....	02
1.2 A bacia do Ribeira do Iguape.....	12
1.3 Rios Litorâneos.....	13
<b>2 Objetivos.....</b>	<b>15</b>
<b>3 Metodologia.....</b>	<b>16</b>
3.1 Materiais.....	16
3.2 Métodos.....	18
3.2.1 Extração de DNA Genômico.....	18
3.2.1.1 Extração por Tampão de extração (ALJANABI & MARTINEZ, 2001).....	18
3.2.1.2 Extração por Kit Comercial (“DNeasy Tissue Kit” – Qiagen Peqlab).....	19
3.2.2 Amplificação da sequência do gene Cox1.....	21
3.2.3 Purificação das amostras amplificadas.....	21
3.2.4 Reação de PCR para seqüenciamento.....	22
3.2.5 Limpeza do PCR de seqüenciamento.....	22
3.2.6 Sequenciamento de DNA.....	23
3.2.7 Análise dos dados.....	23
<b>4 Resultados e Discussão.....</b>	<b>25</b>
4.1 Capítulo 1 – Identificação molecular ( <i>DNA barcode</i> ) dos peixes da bacia do rio Ribeira de Iguape.....	26
4.2 Capítulo 2 – Indentificação molecular ( <i>DNA barcode</i> ) dos peixes de rios costeiros do Estado de São Paulo.....	44
4.3 Discussão Geral.....	61
<b>5 Conclusão.....</b>	<b>64</b>
<b>6 Refêrências Bibliográficas.....</b>	<b>65</b>
<b>7 Apêndices.....</b>	<b>70</b>

## 1 INTRODUÇÃO GERAL

O conhecimento acerca da diversidade biológica é o ponto de partida para todos os estudos básicos ou aplicados relacionados às ciências da vida e o reconhecimento de espécies, bem como a habilidade 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 Neotropical 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, aproximadamente 6.000 espécies encontram-se na região Neotropical, das quais 4.475 são consideradas válidas e cerca de 1.550 são conhecidas, porém ainda não descritas formalmente. Dentro desse universo de espécies de água doce destacam-se os representantes da superordem Ostariophysi que representam 71% dessa fauna (Reis et al., 2003). A prevalência dos Ostariophysi em ambientes de água doce é uma realidade mundial, uma vez que do total de espécies de peixes de água doce do mundo 75% são Ostariophysi (Fink e Fink, 1981).

Em um levantamento das tendências históricas de descrição de espécies em Characidae e Loricariidae feito por Schaefer (1998), o autor estima que possam existir cerca de 8.000 espécies de peixes de água doce neotropicais o que corresponderia a 25% de todas as espécies de peixes do mundo. Esse número é discutido e aceito por Vari e Malabarba (1998) 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 neotropicais, baseados em dados morfológicos, têm-se expandido consideravelmente nos últimos anos (ver referências em Malabarba et al., 1998), 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 implementada

por diversos autores. Apesar dos notáveis progressos, muito ainda resta a ser conhecido sobre a composição e o relacionamento dos diversos grupos, devido à imensa magnitude da biodiversidade neotropical.

### **1.1 Identificação molecular de espécies (*DNA barcoding*)**

A espécie é uma unidade de comparação fundamental em todos os campos da Biologia, da Anatomia ao Comportamento, Desenvolvimento, Ecologia, Evolução, Genética, Biologia Molecular, Paleontologia, Fisiologia, Sistemática, etc. (de Queiroz, 2005). Ao longo da história muitos conceitos de espécie foram propostos, incluindo o tipológico, morfológico, biológico, por isolamento reprodutivo, etc. Ainda que extensos debates sejam constantemente travados em relação a esses conceitos de espécie (de Queiroz, 2005; Waugh, 2007), do ponto de vista prático os taxonomistas são os profissionais responsáveis pela caracterização dessas entidades biológicas, e sua classificação, tornando-as palpáveis e reconhecíveis pela atribuição de um nome, erigido de acordo com os códigos internacionais de nomenclatura (Köhler, 2007).

Essa atribuição de um nome não constitui uma simples aplicação de regras de nomenclatura, mas sim na elaboração de uma hipótese, segundo a qual, um determinado conjunto de caracteres (usualmente morfológicos) é capaz de identificar uma entidade (espécie) com características biológicas próprias e histórias evolutivas independentes de outras entidades biológicas similares. Essas hipóteses podem ser testadas de diversas maneiras e, como todas as hipóteses, podem ser refutadas ou não. Adicionalmente, quando as descrições de espécies são baseadas em uma ampla base de dados, elas se tornam hipóteses científicas interessantes permitindo a elaboração de predições explícitas sobre os atributos dos organismos (Lipscomb et al., 2003).

Os dados morfológicos foram, historicamente, os primeiros a serem utilizados na identificação de espécies simplesmente pelo fato de que foram os primeiros disponíveis aos

pesquisadores que iniciaram a sistematização do conhecimento sobre os seres vivos. Com o desenvolvimento de novos métodos de estudos, novas metodologias foram se tornando disponíveis para o estudo da biodiversidade. Dessa maneira, há mais de 40 anos, a eletroforese de proteínas em géis de amido foi, pela primeira vez, utilizada para identificar espécies (Manwell e Baker, 1963). Há aproximadamente 30 anos, a análise de seqüências de genes de DNA ribossômico foi utilizada para investigar as relações evolutivas em níveis superiores (Woese e Fox, 1977) e as pesquisas em DNA mitocondrial dominaram a Sistemática Molecular no final da década de 70 e início da década de 80 (Avice, 1994) e hoje constituem um dos principais sustentadores desse tipo de investigação, com várias revistas dedicadas exclusivamente à esse campo como: *Molecular Phylogenetics and Evolution*, *Molecular Biology and Evolution* e *Journal of Molecular Evolution*. Entre os dados moleculares utilizados em Taxonomia e Sistemática temos as análises citogenéticas, bioquímicas, as isozimas, dados imunológicos e, mais recentemente, as seqüências de nucleotídeos (Hillis et al., 1996). Nos estudos taxonômicos essas 'novas' categorias de dados têm sido sempre adicionadas aos dados morfológicos, nunca pretendendo substituí-los. Exemplos desse tipo de integração são cada vez mais comuns, como na descrição de *Gymnotus sylvius* (Albert et al., 1999) e de uma nova espécie do gênero *Mugil* (Harrison et al., 2007). Esses exemplos são particularmente relevantes, pois são referentes a novas espécies de dois gêneros de peixes bastante complexos, que foram descritas após o acúmulo de evidências citogenéticas e moleculares que demonstravam a singularidade das amostras em estudo com relação a seus respectivos congêneres.

Embora ferramentas moleculares tenham fornecido uma ampla gama de novas oportunidades para estudar questões em Biologia Evolutiva (como nos processos de especiação) e em Sistemática Filogenética, só recentemente foi proposto que um curto segmento de 648 nucleotídeos da extremidade 5' do gene mitocondrial Citocromo Oxidase I (COI ou Cox1) seria suficiente, em muitos metazoários, para identificá-los a nível de espécie (Hebert et al., 2003a; 2003b). O uso dessa metodologia, denominada "*DNA barcoding*",

ganhou muita relevância com a criação em 2004 do “Consortium for the Barcode of Life (CBOL)” cuja meta é a criação de um banco de dados de códigos de barra, seqüências parciais de DNA do gene Cox1, da biodiversidade global, com o objetivo de facilitar o processo de automação da identificação das espécies (ver o sítio [www.barcoding.si.edu](http://www.barcoding.si.edu) para maiores detalhes). Como pode ser observado na literatura, outros segmentos gênicos também foram sugeridos para esse mesmo fim, como dos genes mitocondriais 16S rRNA e Citocromo B (Vences et al., 2005), porém, por questões de padronização e pelo seu aparente melhor desempenho, o CBOL adotou como seqüência padrão o fragmento citado do gene Cox1.

Paralelamente à proposição de criação do sistema de *DNA barcoding* (Hebert et al., 2003a; 2003b), foi lançada uma discussão sobre a criação de um sistema de taxonomia baseado em seqüências de DNA por Tautz et al. (2002, 2003) chamado de "*DNA Taxonomy*". Essa proposição foi levantada tendo em vista a extensão da diversidade dos organismos vivos, estimados entre 10 e 100 milhões de espécies (May, 1988; Whitfield, 2003), e a dificuldade em nomeá-las com os métodos correntemente em uso, cujo emprego, desde sua criação por Linnaeus em 1758, permitiu a nomeação de cerca de 1,7 milhão de espécies (Stoeckle, 2003). Outro problema levantado dizia respeito ao problema de formação de novos taxonomistas para substituir os especialistas que encerram suas carreiras. O que Tautz et al. (2003) propuseram formalmente era que as seqüências de DNA deixassem de ser um elemento auxiliar na identificação de espécie e passasse a ocupar uma posição central nesse processo de descrição de espécies. Essa proposição gerou uma grande animosidade entre os taxonomistas e os biólogos moleculares. Várias críticas a esse artigo de Tautz et al. (2003) foram publicadas (ex.: Lipscomb et al., 2003; Ebach e Holdrege, 2005) nas quais os autores invariavelmente mostravam preocupação com a Taxonomia tradicional e seus praticantes. Entretanto, com exceção de uma breve referência ao trabalho de Hebert et al. (2003a), em nenhum ponto do artigo de Tautz et al. (2003) a palavra *barcode* é mencionada! Assim, fica evidente que o que Tautz et al. (2003) propunham é algo independente do conceito de *DNA*



*barcode*, ainda que exista uma similaridade metodológica em relação ao uso de seqüências de DNA.

Essencialmente, os usuários da metodologia de *DNA barcoding* pretendem tornar possível à atribuição de indivíduos a espécies e facilitar a descoberta de novas espécies (Moritz e Cicero, 2004). Os primeiros estudos realizados com essa metodologia foram extremamente satisfatórios com um grau de resolução taxonômica maior que 95% (Hebert et al., 2003a, 2003b). Além disso, a metodologia foi aplicada satisfatoriamente para identificar espécimes imaturos, indivíduos em diferentes estágios do ciclo de vida de algumas espécies e possíveis espécies crípticas. Porém, com o avanço dos estudos, encontraram-se também grupos que não puderam ser prontamente resolvidos em nível de espécie, como alguns cnidários bentônicos, dois grupos de anfíbios e algumas espécies de gastrópode, possivelmente porque esses grupos eram formados por espécies com tempo de divergência bastante reduzido (ver revisão em Waugh, 2007).

Apesar da metodologia de *DNA barcoding* ser extremamente recente, várias críticas têm sido levantadas a respeito dessa metodologia. Algumas são meramente políticas, algumas confundem *DNA barcoding* com *DNA Taxonomy*, mas outras discutem aspectos científicos relacionados à mesma (Wiemers e Fiedler, 2007).

Assim, a princípio, alguns críticos sugeriram que o *DNA barcoding* não seria uma atividade científica porque não visaria testar hipóteses e gerar conhecimento, mas simplesmente produzir informações (Lipscomb et al., 2003; Ebach e Holdrege 2005). Entretanto, qualquer experimento gera informações que necessitam ser interpretadas sob a luz de hipóteses e essa é uma atividade científica. Segundo as palavras de Lipscomb et al. (2003) reduzir a taxonomia somente à identificação de espécies a torna uma simples tarefa técnica ao invés de uma ciência baseada em hipóteses. Esse mesmo raciocínio se encaixa perfeitamente nos estudos de *DNA barcoding* uma vez que esses nunca se limitam a relacionar as seqüências encontradas para cada indivíduo, mas sim procuram interpretar as semelhanças e diferenças entre essas seqüências e suas relações com as espécies

reconhecidas por outros métodos. Assim, é forçoso concluir que Taxonomia e *DNA barcoding* são igualmente atividades científicas. Waugh (2007) argumenta também que a aplicação da técnica de *DNA barcoding* serve ainda para testar a hipótese de que as espécies podem ser identificadas utilizando essa técnica e, no futuro, pode ser a fonte de dados que gerará outras hipóteses, o que é também uma atividade essencialmente científica.

Uma crítica mais recente, apresentada por Wiemers e Fiedler (2007), diz respeito ao chamado problema de “*barcoding gap*”. Os proponentes do uso do *DNA barcoding* sugeriram que a diferença genética interespecífica excede a diferença intra-específica de tal maneira que um claro *gap* permitiria assinalar um espécime desconhecido à sua espécie com uma taxa de erro insignificante (Hebert et al., 2004a). Os desvios a essa regra seriam atribuídos a um pequeno número de pares de espécies incipientes, com separação incompleta de linhagens (Hebert et al., 2004b). Como consequência, o estabelecimento da quantidade de divergência entre duas amostras acima de um determinado limite (proposto como sendo pelo menos 10 vezes maior do que dentro das espécies) iria indicar uma distinção em nível de espécie, enquanto uma diferença abaixo desse limite indicaria uma identidade taxonômica entre as amostras. Além disso, a existência de um *barcoding gap* tornaria possível a identificação de espécies não descritas (Hebert et al., 2004b; Smith et al., 2006). Críticas a essa abordagem têm sido levantadas uma vez que alguns conjuntos de dados podem ser passíveis de análises alternativas (Bower, 2006). Possíveis erros com essa abordagem incluem falsos positivos e falsos negativos (Wiemers e Fiedler, 2007). Falsos positivos ocorrem se populações dentro de uma espécie são muito distintas geneticamente, i.e., populações distantes com fluxo gênico limitado ou populações alopátricas com fluxo gênico interrompido. No último caso deve ser notado que, dependendo da quantidade de diferenciação morfológica e o conceito de espécie aplicado, tais populações podem ser qualificadas como “espécies crípticas” na visão de alguns cientistas. Falsos negativos, por outro lado, ocorrem quando pouca ou nenhuma variação nas sequências do fragmento de DNA utilizado é encontrada entre diferentes espécies [= grupos de populações

reprodutivamente isoladas, sensu Mayr (1969)]. Aqui, falsos negativos são mais críticos para a metodologia de *DNA barcoding*, porque a existência de tais casos revelaria exemplos onde essa metodologia é menos poderosa do que o uso de outras metodologias, mais holísticas, para delimitar as espécies (Wiemers e Fiedler, 2007).

Os estudos iniciais em aves (Hebert et al., 2004a) e artrópodes (Barrett e Hebert, 2005) corroboram a existência do *barcoding gap*, mas estudos recentes em gastrópodes (Meyer e Paulay, 2005), moscas (Meier et al., 2006) e borboletas (Wiemers e Fiedler, 2007) desafiam sua existência. As razões para essa discrepância não são inteiramente claras. Os estudos disponíveis sugerem que os níveis de divergência nas seqüências de Cox1 diferem entre táxons mais antigos e mais recentes, assim, uma média excepcionalmente baixa de divergência em seqüências de Cox1, de apenas 1%, foi encontrada entre pares de espécies de cnidária, comparado a 9,6 a 15,7% em outros filos animais. Moluscos com 11,1% de divergência média entre espécies (Meyer e Paulay, 2005) e dípteras com 9,3% (Meier et al., 2006) seriam atípicos com relação a essa propriedade. Meyer e Paulay (2005) assumem que a amostragem insuficiente a nível interespecífico e intra-específico criaria artificialmente um *barcoding gap*. Os proponentes do *DNA barcoding* argumentam, entretanto, que a principal razão para essa sobreposição seria o pouco conhecimento taxonômico disponível para alguns grupos e a necessidade de revisão taxonômica dos mesmos. Deve-se levar também em conta que estudos estatísticos recentes mostram que os testes de monofilia correntemente empregados precisam ser revistos uma vez que podem se apresentar altamente tendenciosos e passíveis de novas interpretações (DeSalle et al., 2005; Rosenberg, 2007).

Uma proposição alternativa e extremamente importante em relação ao estudo das seqüências geradas nos projetos de *DNA barcoding* foi apresentada por DeSalle et al. (2005). Segundo esses autores, um dos principais problemas com relação à análise dos dados gerados nos projetos de *DNA barcoding* diz respeito ao uso extensivo da construção de árvores por métodos fenéticos (como Neighbour-Joining). Eles ressaltam que os equívocos do uso dessa metodologia têm levado a conclusões também equivocadas quanto ao uso do *DNA*

*barcoding*. Segundo os autores, a metodologia taxonômica corrente usa a descoberta de caracteres diagnósticos, independentemente de árvores, para estabelecer sistemas taxonômicos e, principalmente para identificar espécies. Assim, concluem que o uso dos caracteres de DNA em um contexto de diagnose seria inteiramente compatível com os processos correntemente empregados em taxonomia, superando em muito a abordagem por árvores. Além disso, DeSalle et al. (2005), propõe explicitamente que deve haver uma ponte entre as pesquisas moleculares e morfológicas e que isso deve aprimorar o processo de identificação de espécies. Isso também deve ampliar nosso conhecimento sobre a diversidade de mecanismos envolvidos na origem dessas espécies.

Outra crítica levantada por oponentes do uso da metodologia de *DNA barcoding*, diz respeito ao reduzido número de indivíduos amostrados por espécie. As recomendações em curso sugerem que cinco exemplares deveriam ser amostrados de cada espécie, procedentes, sempre que possível, de diferentes pontos dentro da área estudada. Rosenberg (2007), em um estudo estatístico sobre capacidade de determinação de monofilia em comparações inter-pares, demonstrou que uma pequena amostra, de apenas dez indivíduos, para cada grupo testado pode ser suficiente para uma discriminação altamente significativa do ponto de vista estatístico. Considerando que existem grandes diferenças biológicas entre grupos de organismos quanto a esse número mínimo, o emprego inicial de cinco indivíduos (como correntemente proposto nos projetos de *DNA barcoding*) pode ser uma escolha metodologicamente viável, principalmente se encararmos essa escolha inicial como um experimento piloto. A necessidade desses experimentos pilotos com diferentes números de organismos é sugerida por DeSalle et al. (2005) que afirmam ainda que esse número pode ser orientado pelo conhecimento disponível sobre a história de vida das espécies, sua capacidade de dispersão e padrões de cruzamento. Essa crítica a um número tão reduzido de amostras também pode ser igualmente aplicada a vários trabalhos em Taxonomia em que novas espécies são erigidas com base em um ou muito poucos exemplares. Nos estudos biológicos há um consenso de que havendo disponibilidade de um grande número de

amostras essas devem ser analisadas, mas havendo impedimentos, as análises devem ser feitas com o número possível de amostras.

Considerando a literatura disponível, pode-se observar claramente que em alguns casos a metodologia de *DNA barcoding* é prontamente aplicável a nível de grupo animais, como as aves (ex. Hebert et al., 2004a) ou a faunas regionais, como no caso dos peixes marinhos da região australiana (Ward et al., 2005). As principais falhas que se têm apontado dizem respeito a estudos feitos com grupos ricos em espécies, como no caso das borboletas (Wiemers e Fiedler, 2007), onde os autores utilizaram a abordagem de árvores. Dos estudos disponíveis, que são ainda muito restritos em relação às diferentes formas de vida que habitam o planeta, pode-se concluir que em alguns casos essa metodologia é útil enquanto em outros não. Exatamente pela escassez de estudos não é possível advogar contra nem a favor da metodologia sem isenção de espírito, assim como não é possível saber como os dados se comportarão em determinado grupo animal antes que um estudo detalhado seja executado. Nesse ponto é forçoso concluir, em outras palavras, que a hipótese de existência de um *DNA barcoding*, para um determinado grupo de organismos, tem que ser testada para se concluir, sem isenção se ela pode ser refutada ou não.

Segundo Hajibabaei et al. (2007) a metodologia de *DNA barcoding* pode contribuir, como vem sendo demonstrado, com a Taxonomia, Sistemática e Genética de Populações. Na Taxonomia o *DNA barcoding* pode ser utilizado para identificar espécimes atípicos e contribuir para revisão da nomenclatura de vários grupos, assim como pode ser utilizado como método de rotina para auxiliar na identificação de espécies. Na Sistemática o *DNA barcoding* pode servir como ponto de partida para a seleção de táxons e as seqüências de DNA obtidas nos projetos de DNA barcoding podem ser adicionadas ao conjunto de seqüências utilizadas para elaboração de filogenias. Na Genética de Populações o *DNA barcoding* pode fornecer um primeiro sinal sobre a extensão e natureza das divergências populacionais o que facilitará os estudos comparativos da diversidade de várias espécies.

De acordo com Stoeckle et al. (2005), há pelo menos dez razões para a realização do projeto de Código de Barras dos seres vivos, que são:

1. Trabalho com segmentos. O Código de Barras pode identificar espécies a partir de pequenos pedaços ou fragmentos, incluindo material não utilizado no processamento de plantas e animais, e produtos morfológicamente não facilmente reconhecíveis, derivados de espécies protegidas ou reguladas.
2. Trabalho com todos os estágios do ciclo de vida. O Código de Barras pode identificar uma espécie em suas múltiplas formas, de ovos ou sementes, passando pelos estágios de larva ou mudas, até o estágio de adultos.
3. Identificação de espécies similares. O Código de Barras pode distinguir entre espécies que são morfológicamente muito similares, incluindo organismos perigosos (como os portadores de venenos) similares a outros não-perigosos, e assim permitir uma visão mais acurada da biodiversidade.
4. Redução de ambigüidades. Um Código de Barras fornece um meio digital, não ambíguo, para identificação de espécies, não carecendo do uso de descrições subjetivas baseadas em gradações de formas e cores, por exemplo.
5. Possibilidade dos especialistas irem mais longe. Os cientistas podem fazer uso do Código de Barras para uma identificação mais rápida dos organismos e também para facilitar um reconhecimento mais rápido de novas espécies que assim podem ser descritas pelos métodos tradicionais.
6. Democratização do acesso. Uma biblioteca padronizada de Código de Barras aumentará muito o número de pessoas capazes de nomear as espécies.
7. Abertura de caminhos para criação de um dispositivo portátil para identificação de espécies em campo. O Código de Barras liga a identificação biológica às fronteiras avançadas do seqüenciamento de DNA, eletrônica e ciência da informação, criando um caminho para criação de dispositivos portáteis para identificação de espécies.

8. Possibilita o posicionamento de novas folhas na árvore da vida. Estabelecer as similaridades e diferenças entre o Código de Barras das estimadas 10 milhões de espécies de plantas e animais ajudará a mostrar onde suas folhas, representando as espécies, devem estar posicionadas na árvore da vida.

9. Demonstração do valor das coleções. A compilação de uma biblioteca de Códigos de Barra começa com os milhões de espécimes em museus, herbários, zoológicos, jardins botânicos e outros repositórios de materiais biológicos, pondo em evidência seus esforços para preservar e entender a biodiversidade da Terra.

10. Compilação mais rápida da enciclopédia da vida. Uma biblioteca de Código de Barras, ligada a espécimes nomeados, ampliará o acesso do público ao conhecimento biológico, auxiliando na criação de uma enciclopédia *on-line* da vida na Terra.

Concluindo, em encontros recentes realizados entre pessoas interessadas na metodologia de *DNA barcoding* parece haver um consenso de que essa metodologia, como apregoada até hoje, por si só, não será capaz de identificar toda a diversidade global, como também nenhuma outra metodologia existente é capaz. Assim, muitas análises, com muito cuidado com as interpretações, devem ser realizadas. É óbvio também que um segmento de DNA de menos de 700 pares de bases não poderá resolver a filogenia de todos os organismos! Mesmo parcialmente. Se assim fosse, não seria justificável que pesquisadores investissem milhões para sequenciar longos segmentos genômicos antes de propor hipóteses sobre relações filogenéticas entre grupos de espécies, gêneros, famílias, etc. Por outro lado, assim como os proponentes do *DNA barcoding* não estão propondo a substituição da Taxonomia tradicional pela Taxonomia do DNA, eles também não estão propondo que essa metodologia substitua a Sistemática Filogenética. O que muitos pesquisadores, como DeSalle et al. (2005), Gregory (2005), Hajibabaei et al. (2007), Köhler (2007), Miller (2007) e Vogler e Monaghan (2007), estão sugerindo é que essa metodologia é uma metodologia que pode ser muito útil no estudo dos organismos, assim como no estudo da biodiversidade, podendo e

devendo aliar-se a outras metodologias para que um conhecimento realmente útil e robusto dos organismos possa ser alcançado.

## **1.2 A bacia do rio Ribeira de Iguape**

A bacia hidrográfica do rio Ribeira e o Complexo Estuarino Lagunar de Iguape, Cananéia e Paranaguá, denominada Vale do Ribeira, possui uma área de 2.830.666 hectares (28.306 km<sup>2</sup>), sendo 1.119.133 hectares no Estado do Paraná e 1.711.533 hectares no Estado de São Paulo (Figura 1). O rio Ribeira de Iguape, é o principal rio da região, formado pelos rios Ribeirão Grande e Açungui, que nascem no estado do Paraná, a noroeste da Região Metropolitana de Curitiba, a uma altitude de aproximadamente 1.000 metros. Possui uma extensão total de aproximadamente 470 km, sendo cerca de 120 km em terras paranaenses. Desce, inicialmente, rompendo as escarpas das serras, num perfil acidentado até perto de Itapeuna, onde apresenta um desnível de mais de 900 metros em cerca de 290 km, e de 90 metros nos 90 km seguintes, ficando, na altura da cidade de Registro, ainda a 70 km da foz, com apenas 5 metros acima do nível do mar. Sua foz localiza-se no município de Iguape, no local denominado Barra do Ribeira. Desde a abertura do canal do Valo Grande, no entanto, parte de suas águas não deságua diretamente no mar aberto, mas no Mar Pequeno ou de Iguape, compreendido entre o continente e a Ilha Comprida.

Os levantamentos ictiofaunísticos realizados na bacia do rio Ribeira de Iguape são ainda incompletos. Assim, Castro e Menezes (1998) relatam a ocorrência de 12 famílias e aproximadamente 54 espécies de peixes de água doce na parte paulista dessa bacia. Bizerril e Lima (2000) relatam a presença de 77 espécies de água doce nessa bacia. Oyakawa et al. (2006) relatam a existência de mais de 100 espécies de peixes, das quais fornecem informações detalhadas de 73 delas, que ocorrem nas Unidades de Conservação do Vale do Ribeira.



### **1.3 Rios litorâneos**

O conjunto de drenagens atlânticas, denominado rios litorâneos (Figura 1), contém 15 famílias e aproximadamente 48 espécies de peixes de água doce (Castro e Menezes, 1998). Estudos sobre origem das drenagens costeiras e de sua ictiofauna apontam para a existência de cerca de 35 espécies na região compreendida entre as cidades de Santos e Ubatuba (Ribeiro et al., 2006). Embora em termos numéricos seja taxonomicamente menos diversa que a bacia do Ribeira de Iguape, é a mais rica em formas endêmicas (cerca de 80% dos Ostariophysi dos rios costeiros do leste do Brasil são endêmicos), já que a longa história evolutiva independente de suas bacias componentes gerou um bom número de formas endêmicas conhecidas, número este que deverá aumentar significativamente quando a região for melhor explorada ictiofaunisticamente. Com exceção dos cursos d'água contidos no complexo do Parque Estadual da Serra do Mar, os rios da região sofrem há algum tempo um intenso impacto resultante do desmatamento e produção de lixo e esgotos domésticos não tratados, associados à ocupação imobiliária intensa e desordenada, com fins de turísticos e de lazer (Castro e Menezes, 1998).

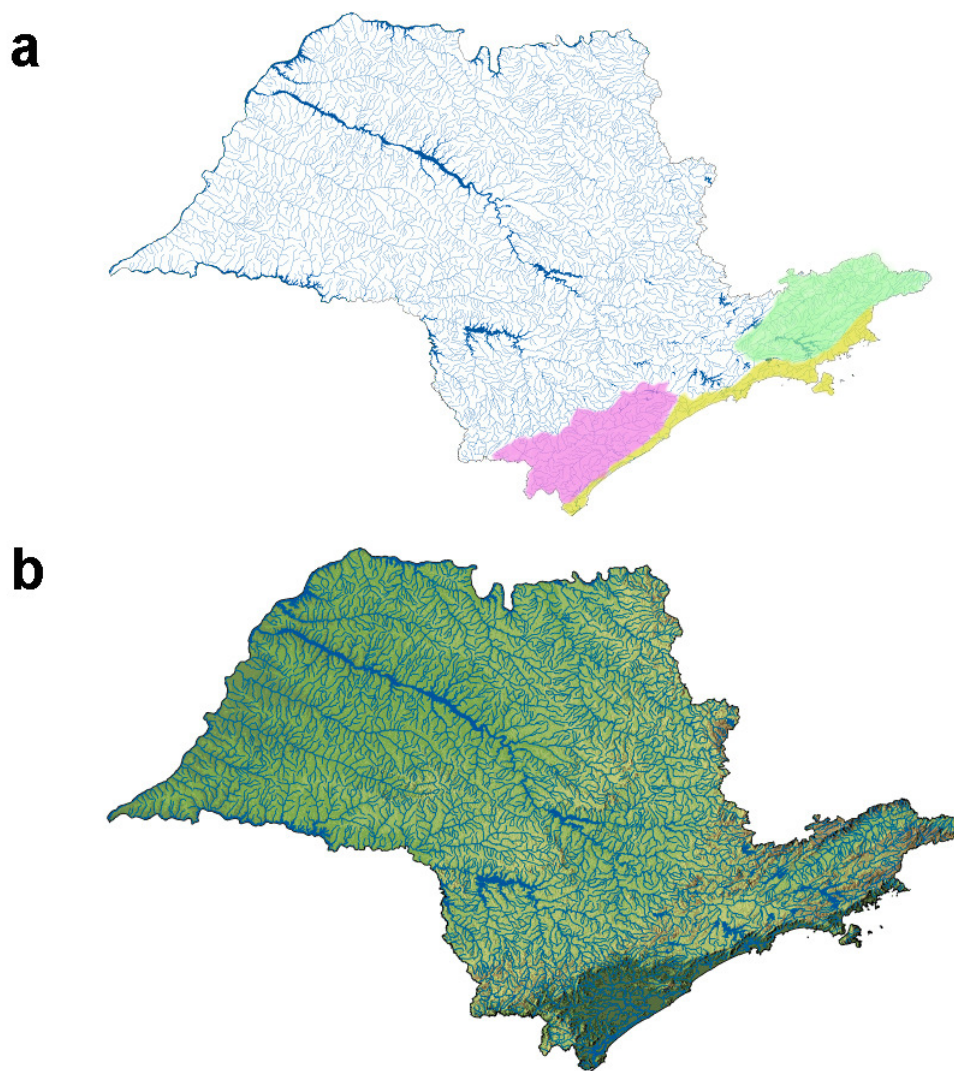


Figura 1. Mapas de São Paulo. (a) hidrografia do Estado (escala 1:250.000): em branco os componentes do sistema do Alto rio Paraná, em rosa os componentes do sistema do rio Ribeira de Iguape, em verde os componentes do sistema do Alto rio Paraíba do Sul e em laranja os componentes do sistema denominado de rios litorâneos. (b) hidrografia digitalizada sobreposta ao relevo realçado do Estado (escala 1:250.000). Mapas disponibilizados no sítio: [www.relevobr.cnpm.embrapa.br/conteudo/aplicacoes/hidrografico.htm](http://www.relevobr.cnpm.embrapa.br/conteudo/aplicacoes/hidrografico.htm).

## 2 OBJETIVOS

Considerando os dados bastante promissores já obtidos para diversos grupos de plantas e animais com o uso do método de Código de Barras, considerando a ampla diversidade de peixes da bacia do rio Ribeira de Iguape e dos rios litorâneos do Estado de São Paulo, considerando o ainda escasso conhecimento que se tem sobre essa importante fauna de peixes e considerando o impacto ambiental que esses corpos de d'água vêm enfrentando ao longo de sua história, o presente projeto teve por objetivos gerais:

- 1- Realizar o sequenciamento de segmentos parciais do gene mitocondrial Cox 1 para as espécies de peixes de água doce encontradas na bacia do rio Ribeira de Iguape e dos rios litorâneos do Estado de São Paulo.
- 2- Avaliar a capacidade das sequências do gene Cox 1 em discriminar as diferentes espécies presentes nessas bacias hidrográficas.
- 3- Analisar os casos de possíveis espécies crípticas procurando expandir o conhecimento sobre a fauna de peixes da bacia do rio Ribeira de Iguape e dos rios litorâneos.
- 4- Criar um sistema de Código de Barras para os peixes das bacias do rio Ribeira de Iguape e dos rios litorâneos.

### **3 - METODOLOGIA**

#### **3.1 – MATERIAIS**

Inicialmente foi realizada uma busca exaustiva na coleção de peixes e tecidos do Laboratório de Biologia e Genética de Peixes (LBP) da UNESP, Botucatu, credenciada no Ministério do Meio Ambiente como Fiel Depositária de Amostras do Patrimônio Genético em busca de material genético da região de estudo. Foram localizados 156 lotes de peixes pertencentes à Bacia do Ribeira de Iguape e rios litorâneos (Figura 2) que já possuíam exemplares identificados ao nível de espécie.



Figura 2. Mapa de São Paulo, hidrografia do Estado (escala 1:250.000): em verde os componentes do sistema do rio Ribeira de Iguape, em laranja os componentes do sistema denominado de rios litorâneos. Mapas disponibilizados no sítio: [www.relevobr.cnpm.embrapa.br/conteudo/aplicacoes/hidrografico.htm](http://www.relevobr.cnpm.embrapa.br/conteudo/aplicacoes/hidrografico.htm).

Foram realizadas quatro novas grandes coletas na Bacia do Ribeira de Iguape e rios litorâneos. A primeira delas nos municípios de Juquiá e Itanhaém, no estado de São

Paulo, acrescentou à coleção 38 lotes de peixes, sendo 23 lotes para a Bacia do Ribeira de Iguape e 15 lotes correspondentes aos rios litorâneos. A segunda coleta foi realizada no município de Iporanga/SP, na região do Vale do rio Betary, e esta acrescentou à coleção 22 lotes correspondentes a Bacia do Ribeira de Iguape. A terceira coleta foi realizada nos municípios de Registro/SP, Iguape/SP, Pedro de Toledo/SP e Juquitiba/SP e acrescentou a coleção mais 34 lotes correspondentes a Bacia do Ribeira de Iguape, principalmente lotes de espécies que habitam o leito principal do rio Ribeira de Iguape, de porte médio e grande, que não tínhamos em nossa coleção, incluindo quatro espécies marinhas (*Centropomus sp.*, *Gobio sp.*, *Lycengraulis sp.* e *Genidens sp.*) que foram coletadas no município de Registro à aproximadamente 40 Km da foz do rio Ribeira de Iguape. A quarta coleta foi realizada no município de Ubatuba/SP e acrescentou 28 lotes à coleção.

## **3.2 - MÉTODOS**

### **3.2.1 Extração de DNA Genômico**

O DNA foi obtido a partir de amostras de músculo, sangue, brânquias e nadadeiras preservadas em etanol 95%, seguindo diferentes metodologias:

#### **3.2.1.1 Extração por Tampão de extração (ALJANABI & MARTINEZ, 2001)**

1. Prepara-se uma solução MIX contendo:

<b><i>Soluções</i></b>	<b><i>Volume</i></b>
------------------------	----------------------

Tampão de Extração (Tris-HCl + EDTA + SDS 1%)	290,0 µl
Proteinase K (10 mg/ml)	10,0 µl

2. Em um cadinho, dissocia-se a amostra juntamente com a solução MIX (sem a Proteinase K) e transfere-se a solução obtida para um tubo tipo *ependorf* 1,5 ml.
3. Adiciona-se a Proteinase K e deixa-se em banho-maria (55°C) de 2 a 3 horas, vertendo-os esporadicamente.
4. Coloca-se 100 µl de solução de NaCl 5M e mistura-se bem vertendo o tubo vagarosamente.
5. Centrifuga-se a 10.000 rpm por 10 minutos à temperatura ambiente.
6. Remove-se 300 µl de sobrenadante e transfere-se para um novo tubo de 1,5 ml.
7. Adiciona-se 600 µl de etanol 100% gelado.
8. Deixa-se no ultrafreezer (-70°C) por 20 minutos.
9. Centrifuga-se a 14.000 rpm por 30 minutos a 4°C.
10. Remove-se o sobrenadante.
11. Seca-se bem (pode deixar em estufa a 37°C por até 30 minutos ou então overnight em temperatura ambiente).
12. Adiciona-se 200 µl de água ultrapura autoclavada. Deixa-se na bancada ou na geladeira por pelo menos 24 horas para hidratação.
13. Alíquota-se o DNA e guarda-se cerca de 150 µl no freezer (-20°C) para solução estoque e o restante na geladeira (4°C) para a solução de trabalho.

### 3.2.1.2 Extração por Kit Comercial (“DNeasy Tissue Kit” – Qiagen Peqlab)

1. Coloca-se a amostra em um tubo tipo *ependorf* 1,5 ml e transfere-se o mesmo a um “banho seco” (Block) à 55°C por cerca de 25 minutos até a secagem completa de todo o álcool presente na amostra;
2. Com o auxílio de um *piston* macera-se toda a amostra;
3. Adiciona-se à amostra 200 µl de Tampão de Extração (Tris HCl pH8.0 10mM + EDTA pH 8.0 10 mM + NaCl 50 mM + SDS 0,5%);
4. Adiciona-se 25 µl de Proteinase K (20 mg/ml) e coloca-se o tubo no vórtex ligeiramente;
5. Coloca-se o tubo num block aquecido a 55°C e deixa-se por uma 2 horas ou overnight para a digestão completa do tecido;
7. Após a digestão retira-se o tubo do Block e centrifuga-se por 5 segundos (*spin*);
8. Adiciona-se 220 µl de Tampão BL e coloca-se no vórtex ligeiramente;
9. Transfere-se o tubo para um block programado a 70°C e deixe por 10 minutos;
10. Centrifuga-se o tubo por 5 segundos (*spin*);
11. Adiciona-se 220 µl de EtOH 100% e coloca-se no vórtex;
12. Centrifuga-se o tubo por 5 segundos (*spin*);
13. Transfere-se o conteúdo do tubo (digestão) para uma coluna acoplada a um tubo coletor, ambos devidamente identificados;
14. Centrifuga-se por 1 minuto a 10.000 rpm;
15. Transfere-se a coluna para um novo tubo coletor e descarte-se o anterior;
16. Adiciona-se 600 µl de Wash Buffer (preparado com EtOH) na coluna;

17. Centrifuga-se por 1 minuto a 10.000 rpm. Descarta-se o líquido do tubo coletor e o acopla-se novamente à coluna;
18. Adiciona-se novamente 600 µl de Wash Buffer (preparado com EtOH) na coluna;
19. Centrifuga-se por 1 minuto a 10.000 rpm. Descarta-se o líquido do tubo coletor e o acopla-se novamente à coluna;
20. Pré-aquecimento do Elution Buffer à 70 °C;
21. Centrifuga-se a coluna (vazia) acoplada ao mesmo tubo coletor por 2 minutos a 13.000 rpm, para a secagem completa da coluna;
22. Transfere-se a coluna para um novo tubo tipo *ependorf* 1,5 ml e descarta-se o tubo coletor;
23. Adiciona-se à coluna 200 µl de Elution Buffer pré-aquecido;
24. Coloca-se o tubo 1,5 ml com a coluna num block a 70°C por 3 minutos;
25. Centrifuga-se por 1 minuto a 10.000 rpm;

### **3.2.2 – Amplificação da sequência do gene Cox 1**

Aproximadamente 654pb foram amplificados da região 5` do gene Citocromo Oxidase subunidade I (Cox 1), correspondentes a região DNA *barcoding* utilizando três conjuntos de *primers*, sendo eles: Fish F1 5'- TCA ACC AAC CAC AAA GAC ATT GGC AC -3', Fish R1 5'- AGACTTCTGGGTGGCCAAAGAATCA – 3', Fish F2 5'- TCG ACT AAT CAT AAA GAT ATC GGC AC -3', Fish R2 5'- CTTCAGGGTGACCGAAGAATCAGAA – 3'



descritos por Ward *et al.* (2005) e L6252 – Asn 5'-AAG GCG GGG AAA GCC CCG GCA G-3', H7271 – COXI 5'-TCC TAT GTA GCC GAA TGG TTC TTT T-3' desenhados em nosso laboratório.

A amplificação foi efetuada num ciclador térmico de PCR utilizando-se 25 µl de uma solução contendo 17,35 µl de água ultra pura (milli-Q), 0,8 µl de dNTP (8 mM), 2,5 µl de tampão 10X, 0,5 µl de cada primer (10 µM), 1,25 µl de MgCl<sub>2</sub> (50 mM), 0,1 µl de DNA polimerase (5 unidades) e 2,0 µl de DNA. O programa de PCR consiste em um passo inicial de desnaturação a 95 °C por 2 minutos, seguidos de 35 ciclos de desnaturação a 94 °C por 30 segundos, anelamento a 54 °C por 30 segundos e extensão a 72 °C por 1 minuto, seguido de um passo final de extensão a 72 °C por 10 minutos.

Os segmentos de DNA amplificados foram visualizados em gel de agarose 1% corados com brometo de etídio.

### 3.2.3 Purificação das Amostras Amplificadas

Após checagem da amplificação, o produto de PCR passou por reação de limpeza através do kit ExoSap-IT<sup>®</sup> (USB Corporation) seguindo o seguinte procedimento:

Limpeza com ExoSap-IT<sup>®</sup> (USB Corporation):

1: Em um tubo *ependorf* prepara-se uma reação contendo **5,0 µl** do DNA amplificado juntamente com **2,0 µl** da solução de ExoSap e leva-se para o termociclador para a realização do seguinte programa:

<b>Passo</b>	<b>Temperatura</b>	<b>Tempo</b>
1	37° C	15'
2	80°C	15'

### 3.2.4 Reação de PCR para Sequenciamento

Para a reação de PCR foi utilizado o Kit “Big Dye™ Terminator v 3.1 Cycle Sequencing Ready Reaction” (Applied Biosystems). O procedimento utilizado foi o seguinte:

1. Prepara-se uma solução MIX, para cada uma das amostras, contendo:

<b>Soluções</b>	<b>Volume</b>
DNA (Amplificado e limpo pela ExoSap-IT)	2,0 µl
<i>Primer</i>	2,0 µl
Solução Pré-MIX (nucleotídeos marcados com fluorescência)	2,0 µl
H <sub>2</sub> O Autoclavada	3,0 µl
<b>Volume Final</b>	9,0 µl

2. Levam-se os *ependorfs* a um termociclador e realiza-se o seguinte programa:

<b>Passo</b>	<b>Processo</b>	<b>Temperatura</b>	<b>Tempo</b>
1	Desnaturação Inicial	96° C	2'
2	Desnaturação	96 °C	30"
3	Anelamento	50 °C	15"
4	Extensão	60 °C	4'
5	Volta para o passo 2		30X

### 3.2.5 Limpeza do PCR de Sequenciamento

1. Adiciona-se em cada tubo: 0.7 µl de EDTA (125mM);

2. Adiciona-se em cada tubo: 0.7  $\mu$ l de Acetato de Sódio (3 M)
3. Homogeneizar e passar no spin brevemente;
4. Adicionar 17,5  $\mu$ l de Etanol 100%;
5. Incubar por 15 minutos a temperatura ambiente;
6. Centrifuga-se por 15 min a 13000 rpm à 25°C;
7. Descartar o Etanol em papel toalha;
8. Adiciona-se 24,5  $\mu$ l de Etanol 70% Gelado;
9. Centrifuga-se por 10':15" a 13000 rpm à 20°C;
10. Descartar o Etanol em papel toalha;
11. Repetir passo 8 a 10 (lavagem com etanol 70%);
12. Secar em termociclador por 2 minutos a 96°C sem tampa e com o termociclador aberto;
13. Guarda-se os tubos, já secos, no freezer à 4°C envolto em papel alumínio, até o momento do sequenciamento;

### **3.2.6 Sequenciamento de DNA**

As sequências foram obtidas através da técnica de sequenciamento por capilaridade no sequenciador ABI3130 do Laboratório de Biologia e Genética de Peixes (LBGP), no Departamento de Morfologia do Instituto de Biociências da UNESP, campus de Botucatu e no sequenciador ABI3730 do Biodiversity Institute of Ontario (BIO), na University of Guelph (Canadá).

### **3.2.7. Análise dos Dados**

As sequências obtidas foram editadas através dos programas ATGC (*Genetyx Corporation*) e Bioedit (Hall T.A., 1999) para a obtenção de sequências consenso, as

quais foram posteriormente alinhadas usando-se o editor ClustalW (Thompson et al., 1997) acoplado ao programa DAMBE (Xia e Xie, 2001). As sequências foram então analisadas no programa MEGA 4.0 (Tamura et al., 2007) para a construção de dendrogramas, cujos parâmetros utilizados para verificar a divergência genética entre as sequências foram os recomendados na literatura para sequências *barcode*, sendo utilizado o método de distância UPGMA e o modelo Kimura-2-parâmetros (K2P). Os dendrogramas obtidos foram testados através do método *bootstrap* (Felsenstein, 1985) com 1.000 pseudoréplicas.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados e as discussões específicas dos dados obtidos encontram-se apresentados na forma de Capítulos, referentes a possíveis trabalhos que serão submetidos à publicação em revistas científicas.

**Capítulo 1** – Identificação molecular (DNA *Barcode*) dos peixes da Bacia do rio Ribeira de Iguape.

**Capítulo 2** – Identificação molecular (DNA *Barcode*) dos peixes da Bacia dos rios litorâneos do estado de São Paulo.

## **CAPÍTULO 1**

---

---

**Identificação molecular (DNA *barcode*) dos peixes da  
bacia do rio Ribeira de Iguape**

## RESUMO

Os trabalhos de levantamento de fauna da bacia do rio Ribeira de Iguape, relatam a ocorrência de cerca de 100 espécies de peixes. Foram obtidas e analisadas 400 sequências do gene Citocromo Oxidase subunidade I (Cox1) de 68 espécies pertencentes a 48 gêneros. A distância K2P média entre indivíduos dentro das espécies foi de 0,41% em comparação à 6,32% entre espécies dentro de um mesmo gênero. No geral, portanto, há 15X mais variação entre espécies de um mesmo gênero que entre os indivíduos de uma mesma espécie. Todas as espécies puderam ser diferenciadas por sua sequência Cox1, embora alguns indivíduos isolados de duas espécies distintas apresentaram haplótipos característicos de uma espécie do mesmo gênero. O presente estudo evidenciou que as espécies de peixes da bacia do rio Ribeira de Iguape podem ser identificadas de forma eficiente através da utilização de código de barras do DNA, e que a biblioteca de DNA *barcode* pode ser usada para aplicações subseqüentes em ecologia e sistemática.

## INTRODUÇÃO

A ictiofauna de água doce Neotropical 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, aproximadamente 6.000 espécies encontram-se na região Neotropical, das quais 4.475 são consideradas válidas e cerca de 1.550 são conhecidas, porém ainda não descritas formalmente.

Os levantamentos ictiofaunísticos realizados na bacia do rio Ribeira de Iguape, relatam a ocorrência de 12 famílias e aproximadamente 54 espécies de peixes de água doce na parte paulista dessa bacia (Castro e Menezes 1998). Bizerril e Lima (2000) identificaram a presença de 77 espécies de água doce nessa bacia. Oyakawa *et al.* (2006) relatam a existência de mais de 100 espécies de peixes, das quais fornecem informações detalhadas de 73 delas, que ocorrem nas Unidades de Conservação do Vale do Ribeira.

A maioria dos estudos realizados nessa bacia são estudos morfológicos e taxonômicos, já estudos utilizando ferramentas moleculares ainda são escassos. Recentemente foi proposto que um curto segmento de 648 nucleotídeos da extremidade 5' do gene mitocondrial Citocromo Oxidase I (COI ou Cox1) seria suficiente, em muitos metazoários, para identificá-los a nível de espécie (Hebert *et al.*, 2003a; 2003b). O uso dessa metodologia, denominada "*DNA barcode*", ganhou muita relevância com a criação em 2004 do "Consortium for the Barcode of Life (CBOL)" cuja meta é a criação de um banco de dados de códigos de barra, sequências parciais de DNA do gene Cox1, da biodiversidade global.

Vários autores têm sugerido que o DNA *barcode* irá ajudar no progresso dos trabalhos taxonômicos tradicionais, acelerando a descoberta de novas espécies (Gregory, 2005), contribuindo para revisão da nomenclatura de vários grupos, assim como ser utilizado como método de rotina para auxiliar na identificação de espécies. Embora o código de barras de DNA continue controverso em alguns círculos (Lipscomb *et al.*, 2003;



Moritz & Cicero, 2004; Fitzhugh, 2006), já demonstrou ser altamente eficaz em distinguir espécies de colêmbolos (Hogg & Hebert, 2004), formigas (Smith *et al.*, 2005), borboletas (Hebert *et al.*, 2004a), aves (Hebert *et al.*, 2004b), mamíferos (Clare *et al.*, 2007; Borisenko *et al.*, 2008) e peixes (Ward *et al.*, 2005; Hubert *et al.*, 2008; Valdez-Moreno *et al.*, 2009).

Embora os peixes representem quase 50% de todos os vertebrados, poucos estudos com DNA *barcode* foram realizados até o momento (Ward *et al.*, 2005; Hubert *et al.*, 2008; Valdez-Moreno *et al.*, 2009), entre eles Ward *et al.* (2005) ao analisar espécies marinhas Australianas, utilizando o DNA *barcode*, identificou 100% das 207 espécies examinadas. Em outros estudos o DNA *barcode* serviu de ferramenta de identificação de larvas de peixes marinhos (Pegg *et al.* 2006; Victor, 2007).

O presente estudo teve como objetivo, criar um banco de dados de DNA para as espécies de ocorrência na bacia do rio Ribeira do Iguape e testar a eficácia do método de DNA *barcode* na correta discriminação dessas espécies. Teve como objetivo também analisar possíveis espécies crípticas e endêmicas, com isso fornecendo subsídios para uma melhor compreensão da ocorrência e distribuição da ictiofauna desta região.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

O DNA foi obtido a partir de amostras de músculo, sangue, brânquias ou nadadeiras preservadas em etanol 95%. As amostras foram obtidas a partir de exemplares (vouchers) depositados na coleção do Laboratório de Biologia e Genética de Peixes (LBGP), Universidade Estadual Paulista, Botucatu-SP. Os indivíduos foram identificados em nível de espécies por taxonomistas a partir de caracteres morfológicos.

Estudos genéticos comparativos sugerem que os peixes de água doce geralmente possuem altos níveis de diversidade genética intra-populacional quando comparados com espécies marinhas (Ward, 1994). Desse modo sempre que possível cinco indivíduos por

espécie de pelo menos duas localidades distintas desta bacia hidrográfica foram utilizados na tentativa de capturar uma parte representativa da diversidade molecular.

Extrações de DNA foram realizadas utilizando a técnica de extração por tampão de extração (Aljanabi & Martinez, 2001) e extração por kit comercial (“DNeasy Tissue Kit” – Qiagen Peqlab) seguindo orientações do fabricante.

Aproximadamente 654pb foram amplificados da região 5' do gene Citocromo Oxidase subunidade I (Cox 1), correspondentes a região DNA *barcoding* utilizando três conjuntos de *primers*, sendo eles: Fish F1 5'- TCA ACC AAC CAC AAA GAC ATT GGC AC -3', Fish R1 5'- AGACTTCTGGGTGGCCAAAGAATCA – 3', Fish F2 5'- TCG ACT AAT CAT AAA GAT ATC GGC AC -3', Fish R2 5'- CTTCAGGGTGACCGAAGAATCAGAA – 3' descritos por Ward *et al.* (2005) e L6252 – Asn 5'-AAG GCG GGG AAA GCC CCG GCA G-3', H7271 – COXI 5'-TCC TAT GTA GCC GAA TGG TTC TTT T-3' desenhados em nosso laboratório.

As amplificações foram realizadas num ciclador térmico de PCR utilizando-se 25 µl de uma solução contendo 17,35 µl de água ultra pura (milli-Q), 0,8 µl de dNTP (8 mM), 2,5 µl de tampão 10X, 0,5 µl de cada *primer* (10 µM), 1,25 µl de MgCl<sub>2</sub> (50 mM), 0,1 µl de DNA polimerase (5 unidades) e 2,0 µl de DNA. O programa de PCR consiste em um passo inicial de desnaturação a 95 °C por 2 minutos, seguidos de 35 ciclos de desnaturação a 94 °C por 30 segundos, anelamento a 54 °C por 30 segundos e extensão a 72 °C por 1 minuto, seguido de um passo final de extensão a 72 °C por 10 minutos. Os seguimentos de DNA amplificados são visualizados em gel de agarose 1% corados com brometo de etídio. Para a reação de PCR de sequenciamento foi utilizado o Kit “Big Dye™ Terminator v 3.1 Cycle Sequencing Ready Reaction” (Applied Biosystems) e sequenciamento por capilaridade no sequenciador ABI3130 (Applied Biosystems) seguindo orientações do fabricante.

Dados sobre as sequências obtidas, eletroferogramas, detalhes sobre os *primers* por espécime (Apêndices 1 e 2) estão disponíveis no projeto FBCR (Fishes of Brazilian Coastal Rivers) depositado no banco de dados do projeto “Barcode of Life” (BOLD - [www.barcodinglife.org](http://www.barcodinglife.org)) na Universidade de Guelph, Ontario (Canadá).

As sequências obtidas foram editadas através dos programas ATGC (*Genetyx Corporation*) e Bioedit (Hall T.A., 1999) para a obtenção de sequências consenso, as quais foram posteriormente alinhadas usando-se o editor ClustalW (Thompson et al., 1997) acoplado ao programa DAMBE (Xia e Xie, 2001). As sequências foram então submetidas no programa MEGA 4.0 (Tamura et al., 2007) para a construção de dendrogramas, cujos parâmetros utilizados para verificar a divergência genética entre as sequências são os recomendados na literatura para sequências *barcode*, sendo utilizado o método de distância Neighbor-Joining, utilizando o modelo parâmetro Kimura-2-parâmetros (K2P). Os dendrogramas obtidos foram testados através do método de *bootstrap* (Felsenstein, 1985) com 1.000 permutações.

## RESULTADOS

Um total de 91 espécies foram amostradas durante a realização deste estudo. Os *primers* utilizados amplificaram a região alvo da maior parte das espécies. Dois problemas foram verificados, sendo problemas relacionados ao anelamento dos *primers*, onde as ampliações não ocorriam e problema de ocorrência de contaminação de reações.

Ao final foram obtidas e analisadas 400 sequências DNA *barcode*, pertencentes a 68 espécies, 48 gêneros, 20 famílias e 8 ordens, as quais foram utilizadas para obtenção de um dendrograma, através do método Neighbour-joining (Apêndice 1). Não foram encontradas inserções, deleções ou *stop-codons*, suportando que todas as regiões amplificadas correspondem a sequências funcionais de Cox 1 mitocondrial, sugerindo que não foram sequenciados NUMTs (nuclear DNA sequences originating from mitochondrial

DNA sequences). Em vertebrados sequências NUMTs tipicamente possuem um tamanho inferior à 600pb (Zhang & Hewitt 1996).

Todas as sequências amplificadas possuem um tamanho de 654pb, destas 338 pb se mostraram conservadas e 316 pb variáveis. Observando o conteúdo de GC (Tabela 1) dos 654pb do Cox 1 dos Osteichthys analisados, este apresentou uma taxa média de 46,7%. Esse valor é um pouco superior ao encontrado por Saccone *et al.* (1999), que em revisão sobre o genoma mitocondrial completo, encontrou em Osteichthys e Condrichthys uma taxa de 43,2% e 38,4% respectivamente.

**Tabela 1.** Média da composição de bases (com desvio padrão) das sequências obtidas dos peixes da bacia do rio Ribeira de Iguape.

	Min	Média	Max	Desvio Padrão
<b>G %</b>	15.5	18.17	21.41	0.06
<b>C %</b>	23.02	27.9	32.52	0.114
<b>A %</b>	21.58	24.22	27.38	0.07
<b>T %</b>	25.88	29.7	34.3	0.106
<b>GC %</b>	40.41	46.07	52.13	0.141
<b>GC % Codon Pos 1</b>	50.55	55.8	59.27	0.086
<b>GC % Codon Pos 2</b>	41.31	42.73	44.74	0.018
<b>GC % Codon Pos 3</b>	26.68	39.25	55.62	0.373

A distância K2P média entre indivíduos dentro de espécies foi de 0,41% em comparação a 6,32% entre espécies dentro de um mesmo gênero (Tabela 2). No geral,

portanto, há 15X mais variação entre espécies de um mesmo gênero que entre os indivíduos de uma mesma espécie.

A divergência média entre as espécies dentro de famílias foi de 19,08% e entre as espécies dentro de ordens e classes de 22,87% e 25,70%, respectivamente (Tabela 2). O aumento não proporcional das taxas em categorias taxonômicas mais elevadas se deve ao fato de ocorrer uma saturação nas substituições de nucleotídeos.

**Tabela 2.** Sumário de divergências genéticas (percentagens K2P) em vários níveis taxonômicos para as 68 espécies analisadas (400 espécimes).

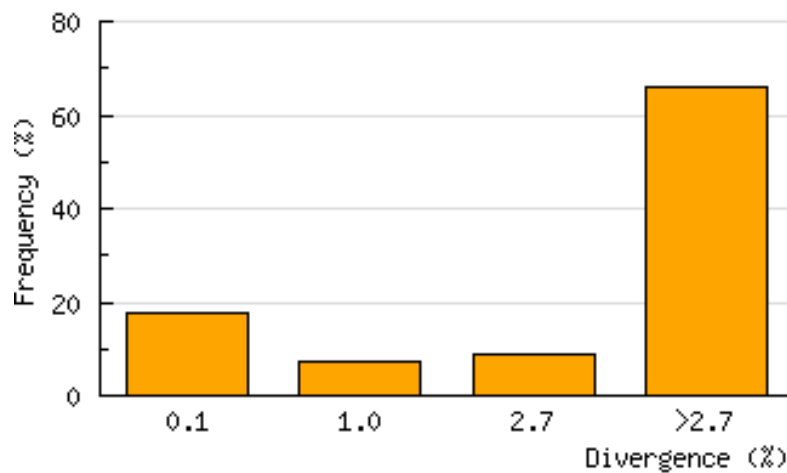
<b>Comparações entre</b>	<b>Número de comparações</b>	<b>mínima</b>	<b>Distância média</b>	<b>máxima</b>	<b>Desvio Padrão</b>
Espécies	1789	0	0.41	6.48	0.02
Gêneros	1104	0	6.32	15.45	0.134
Famílias	10000	1.39	19.08	29.66	0.042
Ordens	21164	16.39	22.87	31.35	0.012
Classes	44456	11.36	25.70	37.12	0.012

Distribuições nas médias de distância K2P entre indivíduos de uma mesma espécie e entre espécies de um mesmo gênero, são parcialmente sobrepostas, como podemos observar na Tabela 2, variando de 0 a 6,48% entre indivíduos co-específicos e 0 a 15,45% entre indivíduos co-genéricos.

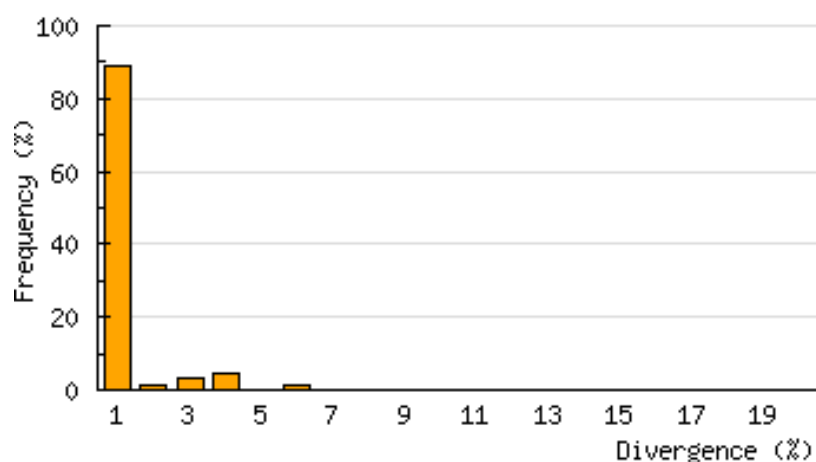
Um aumento contínuo da variação genética através do aumento dos níveis taxonômicos foi observado, apoiando uma mudança acentuada de divergência genética com os limites de espécie. A análise da distribuição de distância para o vizinho mais

próximo (nearest – neighbour distance -NND) (Tabela 3), ou seja, análise da distância genética mínima entre espécies e seus parentes mais próximos, revelou que 25% dos NND foi inferior a 1% e destes 17,6% foram inferiores a 0,1% (Fig. 1). Em contrapartida, a divergência entre indivíduos de uma mesma espécie foi inferior a 1% em 84% dos casos (Fig. 2). A média de NND foi 9,88%, ou seja, 19 vezes maior que a média da distância genética entre indivíduos de uma mesma espécie, que foi de 0,52%.

Sobreposição na distribuição das distâncias genéticas entre os indivíduos de uma mesma espécie e indivíduos de espécies de um mesmo gênero podem ser originários de profundas divergências intra-específicas, ou baixas divergências entre espécies irmãs (Hubert, 2008).



**Figura 1.** Gráfico da frequência em que a divergência entre vizinhos mais próximos (nearest – neighbour distance –NND) se apresentou após análise das 68 espécies analisadas.



**Figura 2.** Gráfico da frequência em que a percentagem das divergências interespecíficas se apresentou após análise das 68 espécies analisadas.

**Tabela 03.** Diversidade da bacia do rio Ribeira de Iguape e distribuição das distâncias genéticas das 68 espécies analisadas em relação à distância genética para o vizinho mais próximo (nearest – neighbour distance - NND), utilizando o modelo K2P.

Ordem	Família	N.E.	< 0,1	0,1-1,0	1-2,7	>2,7
Symbranchiformes	Symbranchidae	1				1
Siluriformes	Callichthyidae	6				6
	Loricariidae	23	7	3	4	9
	Trichomycteridae	4				4
	Heptapteridae	5		2		3
	Pimelodidae	1				1
	Ariidae	1				1
	Pseudopimelodidae	1				1

	Auchenipteridae	1			1
Cyprinodontiformes	Poeciliidae	2		2	
	Rivulidae	1			1
Characiformes	Characidae	7			7
	Crenuchidae	1			1
	Prochilodontidae	1			1
	Erythrinidae	1			1
Gimnotiformes	Gimnotidae	4	3		1
Perciformes	Cichlidae	4	2		2
	Centropomidae	1			1
Cypriniformes	Cyprinidae	1			1
Clupeiformes	Engraulidae	1			1
	<b>TOTAL</b>	<b>68</b>	<b>12</b>	<b>5</b>	<b>6</b>
					<b>45</b>

N.E. – número de espécies

## DISCUSSÃO

O sucesso do DNA *barcode*, depende da distribuição de distâncias genéticas entre indivíduos co-específicos e hetero-específicos, dado que falhas no agrupamento utilizando essa técnica são proporcionais à sobreposição entre essas duas distribuições (Meyer, 2005). O presente estudo demonstrou a eficácia da técnica de DNA *barcode* para identificação das espécies da bacia do rio Ribeira de Iguape. Por outro lado, ficou claro



que as espécies com problemas de separação pela técnica de *barcode* foram exatamente algumas espécies pertencentes a grupos com histórico de problemas taxonômicos.

Estudos têm mostrado que linhagens diversificam mais rapidamente dentro de espécies do que entre espécies (Pons, 2006). Isto se deve ao fato de que a diversificação dentro de espécies é impulsionada por mutações a uma taxa superior a encontrada entre espécies. Assim, o comprimento do ramo entre as espécies tende a ser maior do que entre indivíduos de uma mesma espécie, levando a uma lacuna na distribuição da distância entre pares, que tem sido chamado *barcode gap* (Meyer, 2005).

O Citocromo Oxidase I apresenta uma alta taxa mutacional mesmo para um DNA mitocondrial (Saccone, 2009). Desse modo o presente estudo mostrou que na maioria dos táxons aqui analisados (66,2%) o "*barcode gap*" foi observado, e a distância genética média entre indivíduos da mesma espécie foi geralmente menor do que a média de distância genética entre indivíduos de espécies distintas, mesmo que apenas espécies irmãs fossem consideradas.

Embora as análises de DNA *barcode* tenham como principal objetivo delinear os limites entre espécies e atribuir nomes a indivíduos de espécies conhecidas, a diversidade escondida, ou seja, espécies ainda não reconhecidas e descritas, é frequentemente detectada através de análises do DNA *barcode* (Kerr *et al.*, 2007, Hebert *et al.*, 2004 e Pons *et al.* 2006).

A distância média entre indivíduos co-específicos foi de cerca de 0,4%, enquanto a distância média de NND e a distância média entre as espécies de um mesmo gênero foram de 9,9% e 6,3%, respectivamente. Quando usamos um limiar de 1% de divergência genética para separarmos espécies (2,5 vezes superior à média da variabilidade intra-específica), apenas quatro famílias (Loricariidae, Heptapteridae, Gymnotidae e Cichlidae), das 21 famílias analisadas apresentaram espécies que ficaram fora desse limiar (Tabela 3).

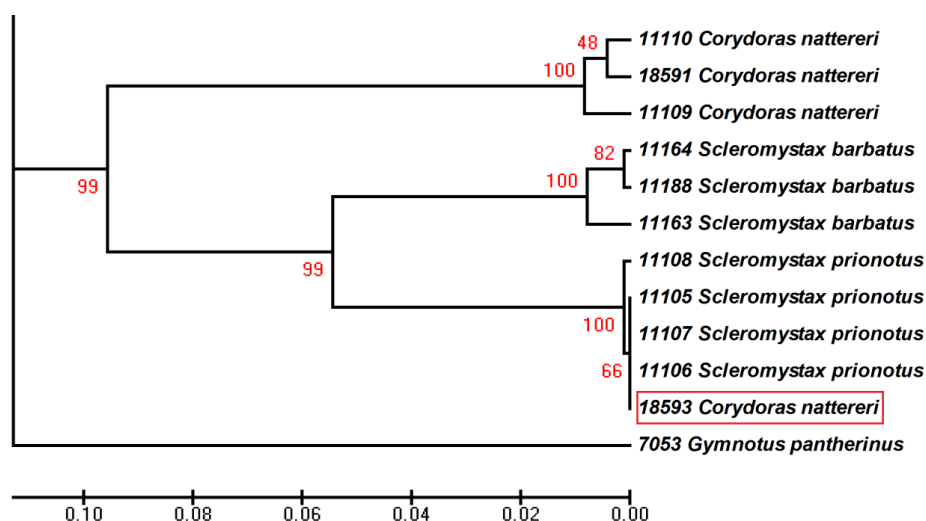
Ao analisar-se o conjunto das 68 espécies, pode-se observar que oito espécies (11,7%) apresentaram sequências DNA *barcode* que foram compartilhados ou sobrepostas com as de outras espécies nominais (Tabela 3).

No caso da família Gymnotidae, representada por quatro espécies neste estudo (*Gymnotus pantherinus*, *Gymnotus sylvius*, *Gymnotus carapo* e *Gymnotus inaequilabiatus*), apenas a espécie *Gymnotus pantherinus* ficou separada em um *cluster* definido, já nas outras espécies da família ocorreu sobreposição entre elas. Na família Loricariidae, as espécies que apresentaram problemas de sequências compartilhadas fazem parte do gênero *Hypostomus* (*Hypostomus tapijara* e *Hypostomus interruptus*). Em ambos os casos um fator que pode ter sido determinante para essa sobreposição foi identificação errônea de espécimes analisados, visto que são espécies de identificação complexa por serem muito similares entre si e em alguns casos os indivíduos analisados eram juvenis.

Outra família que apresentou problema de sobreposição de sequências foi a família Heptapteridae, representada pelas espécies *Pimelodella transitoria* e *Pimelodella kronei*, esta última conhecida por ser um “bagre-cego” que vive no interior de cavernas na região de Iporanga – SP (Trajano, 1991). Ao analisar a divergência genética entre as duas espécies em questão, observou-se uma divergência média de 0,43% e uma divergência máxima de 0,77%, números esses que são similares ao encontrados neste estudo quando se compara indivíduos de uma mesma espécie. Alguns fatores podem estar envolvidos (Funk *et al.*, 2003; Meyer *et al.*, 2005), como por exemplo, hibridizações entre essas espécies, ou mesmo, as espécies serem na realidade uma só, visto que a técnica de DNA *barcode* checa a delimitação das espécies que foram nomeadas através de uma abordagem tradicional através da diferença entre os fenótipos (Hubert *et al.*, 2008). Estudos citogenéticos realizados por Almeida-Toledo *et al.* (1992) em ambas as espécies, revelaram o mesmo número diplóide,  $2n=58$ , e cariótipos muito similares.

Um caso onde se pode contextualizar o potencial do DNA *barcode* para as coleções, é o caso de um exemplar de *Corydoras nattereri* (voucher = 18593) que aparece agrupado com os exemplares de *Scleromystax prionotus* como mostra o dendrograma (Figura 3 – retângulo vermelho). Após, uma análise do espécime depositado na coleção do Laboratório de Biologia e Genética de Peixes (LBP), revelou que se tratava de um exemplar de *Scleromystax prionotus*, o qual havia sido identificado erroneamente.

Outro caso em que o DNA *barcode* se mostrou útil para as coleções, foi na identificação de indivíduos não nomeados a nível de espécie, como no caso dos indivíduos da espécie *Isbrueckerichthys alipionis* que já haviam sido identificados corretamente, e após análise das sequências de alguns indivíduos identificados apenas como *Isbrueckerichthys sp.*, verificou-se que ambos se juntaram em um mesmo *cluster* com 0% de divergência entre elas, sugerindo que os indivíduos não identificados não representavam uma nova espécie, mas sim eram exemplares de *Isbrueckerichthys alipionis*. O mesmo aconteceu com indivíduos da espécie *Trichomycterus zonatus* e alguns *Trichomycterus sp.*



**Figura 3.** Dendrograma obtido por Neighbour-joining (MEGA4.0) a partir das sequências *barcode* espécimes de peixes da Bacia do rio Ribeira de Iguape. Os valores de *bootstrap* estão

representados nos respectivos nós. Retângulo vermelho corresponde ao espécime identificado incorretamente na coleção do laboratório.

Também devemos levar em consideração, que a utilização de uma percentagem única de divergência genética como taxa de corte, para determinação de espécies, pode ser um erro, podendo em algumas situações levar a atribuições errôneas (Hickerson *et al.*, 2006; Meier *et al.*, 2006).

Resoluções de casos desta natureza exigem cuidadosa análise morfológica de taxonomistas especialistas antes que quaisquer recomendações finais possam ser feitas. O DNA *barcode* e a análise morfológica devem caminhar juntas.

Uma vez que um banco de dados global de DNA *barcode* seja estabelecido para peixes e outros grupos biológicos, qualquer pessoa com acesso direto ou indireto a um sequenciador de DNA será capaz de identificar, com um grau elevado de certeza, qualquer ovo, larva ou fragmento de carcaça. Esta será uma ferramenta valiosa, por exemplo, no caso de peixes, na identificação do pescado desembarcado nos mercados, na identificação de espécies em trabalhos de consultoria e para muitos outros benefícios científicos e práticos.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aljanabi, S. M., Martinez, I. (1997). Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. *Nucleic Acids Research*, 25: 4692-4693, nº 22.
- Almeida-Toledo, L.F., Foresti, F., Trajano, E. and **Toledo Filho, S.A.** (1992). Cytogenetic analysis of the Brazilian blind catfish *Pimelodella kronei* and of its presumed ancestor *Pimelodella transitoria*. *Caryologia* 45: 255-262.
- Bizerril, C.R.S.F., Lima, N.R.W. (2000). Levantamento da ictiofauna da bacia do rio Ribeira, Brasil. *Acta Biologica Leopoldinensia*, 22: 103-110.

- Castro, R.M.C., Menezes, N.A. (1998). Estudo diagnóstico da diversidade de peixes do Estado de São Paulo. IN: Biodiversidade do Estado de São Paulo, Brasil. Ed. R.M.C. Castro. São Paulo: FAPESP. Pp. 3-13
- Felsenstein, J. (1985). Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution*, 39: 783-791.
- Fitzhugh, K. (2006). DNA barcoding: an instance of technology-driven science? *Bioscience* 56, 462–463.
- Funk DJ, Omland KE (2003) Species-level paraphyly and polyphyly: frequency, causes and consequences, with insights from animal mitochondria DNA. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics* 34: 397–423.
- Gregory, T.R. (2005). DNA barcoding does not compete with taxonomy. *Nature* 434:1067-1067.
- Hall, T.A. (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.* 41:95-98. Hebert, P.D.N.; A. Cywinska; S.L. Ball & J.R. deWaard. 2003a. Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences* 270: S569-S599.
- Hebert, P. D. N., Penton, E.H., Burns, J.M., Janzen, D. H., Hallwachs, W. (2004b). Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astraptes fulgerator*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 101(41):14812-14817.
- Hebert, P. D. N., Ratnasingham, S., deWaard, J. R. (2003b). Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proc Biol Sci*, 270:S96-99.
- Hebert, P. D. N., Stoeckle, M. Y., Zemplak, T. S., Francis, C. M. (2004a). Identification of birds through DNA Barcodes. *PLoS Biol*, 2(10):1567-1663.
- Hickerson MJ, Meyer CP, Moritz C (2006) DNA barcoding will often fail to discover new animal species over broad parameter space. *Systematic Biology* 55: 729–739.
- Hogg, I. D. & Hebert, P. D. N. (2004). Biological identification of springtails (Hexapoda: Collembola) from the Canadian Arctic, using mitochondrial DNA barcodes. *Canadian Journal of Zoology* 82, 749–754.
- Hubert N, Hanner R, Holm E, Mandrak NE, Taylor E, et al. (2008) Identifying Canadian Freshwater Fishes through DNA Barcodes. *PLoS ONE* 3(6): e2490. doi:10.1371/journal.pone.0002490

- Kerr KC, Stoeckle MY, Dove CJ, Weigt LA, Francis CM, et al. (2007) Comprehensive DNA barcode coverage of North American birds. *Molecular Ecology Notes* doi: 10.1111/j.1471-8286.2007.01670.x.
- Lipscomb, D., Platnick, N., Wheeler, Q. (2003). The intellectual content of taxonomy: a comment on DNA taxonomy. *Trends Ecol Evol*, 18:65-66.
- Meier R, Shiyang K, Vaidya G, Ng PKL (2006) DNA barcoding and taxonomy in Diptera: a tale of high intraspecific variability and low identification success. *Systematic Biology* 55: 715–728.
- Meyer CP, Paulay G (2005) DNA barcoding: error rates based on comprehensive sampling. *PLOS Biology* 3: 2229–2238.
- Moritz, C. and Cicero, C. (2004). DNA barcoding: promise and pitfalls. *PLoS Biol.* 2(10):1529-1531.
- Oyakawa, O.T., Akama, A., Mautari, K.C., Nolasco, J.C. (2006). Peixes de riachos da mata atlântica nas Unidades de Conservação do Vale do Rio Ribeira de Iguape no Estado de São Paulo: Editora Neotrópica Ltda, 201 p.
- Pegg, G.G., Sinclair, B., Briskey, L., Aspden, W.J., 2006. MtDNA barcode identification of fish larvae in the southern Great Barrier Reef, Australia. *Scientia Marina* 70 (Suppl. 2), 7–12.
- Pons J, Barraclough TG, Gomez-Zurita J, Cardoso A, Duran DP, et al. (2006) Sequence-based species delimitation for the DNA taxonomy of undescribed insects. *Systematic Biology* 55: 595–606.
- Reis, R.E., Kullander, S.O., Ferraris, C. (2003). Check List of the Freshwater Fishes of South and Central America (CLOFFSCA), Porto Alegre: Edipucrs.
- Saccone, C., De Giorgi, C., Gissi, C., Pesole, G. & Reyes, A. 1999 Evolutionary genomics in Metazoa: the mitochondrial DNA as a model system. *Gene* 238, 195–209. (doi:10.1016/S0378-1119(99)00270-X.)
- Smith, M. A., Fisher, B. L. & Hebert, P. D. N. (2005). DNA barcoding for effective biodiversity assessment of a hyperdiverse arthropod group: the ants of Madagascar. *Philosophical Transactions of the Royal Society B* 360, 1825–1834.
- Tamura K, Dudley J, Nei M & Kumar S (2007) MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. [Molecular Biology and Evolution](#) 24: 1596-1599.
- Thompson, J.D., Gibson, T.J., Plewniak, F., Jeanmougin, F., Higgins, D.G. (1997). The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.* 24:4876-4882.

- Trajano, E. 1991 Population ecology of *Pimelodella kronei*, troglobitic catfish from Southeastern Brazil (Siluriformes, Pimelodidae). *Environ. Biol. Fish* 30:407–421.
- Valdez-Moreno, M., Ivanova, N.V., Elías-Gutiérrez, M., Contreras-Balderas, S. and Hebert, P.D.N (2009). Probing diversity in freshwater fishes from Mexico and Guatemala with DNA barcodes. *Journal of Fish Biology* 74, 377–402.
- Victor, B. C. (2007). *Coryphopterus kuna*, a new goby (Perciformes: Gobiidae: Gobiinae) from the western Caribbean, with the identification of the late larval stage and an estimate of the pelagic larval duration. *Zootaxa* 1526, 51–61.
- Ward R.D, Woodwark M, Skininski DOF (1994) A comparison of genetic diversity levels in marine, freshwater and anadromous fish. *Journal of FishBiology* 44: 213–232.
- Ward, R. D., Zemlak, T. S., Innes, B. H., Last, P. R., Hebert, P. D. N. (2005). DNA barcoding Australia's fish species. *Phil. Trans. R. Soc. B*, 359:1847-1857.
- Xia, X., Xie, Z. (2001). DAMBE: Data analysis in molecular biology and evolution. *J. Heredity* 92:371-373.
- Zhang, D.-X. & Hewitt, G. M. 1996 Nuclear integrations: challenges for mitochondrial DNA markers. *Trends Ecol. Evol.* 11, 247–251. (doi:10.1016/0169-5347(96)10031-8.)

## **CAPÍTULO 2**

---

---

**Identificação molecular (DNA *barcode*) dos peixes de rios  
costeiros do estado de São Paulo**



## Resumo

Os trabalhos de levantamento de fauna da bacia dos rios costeiros do Estado de São Paulo relatam a ocorrência de aproximadamente 50 espécies de peixes. Foram obtidas e analisadas 308 sequências do gene Citocromo Oxidase subunidade I (Cox1) de 58 espécies pertencentes a 40 gêneros. A distância K2P média entre indivíduos dentro das espécies foi de 0,77% em comparação à 6,16% entre espécies dentro de um mesmo gênero. No geral, portanto, há 8X mais variação entre espécies de um mesmo gênero que entre os indivíduos de uma mesma espécie. Todas as espécies puderam ser diferenciadas por sua sequência Cox1, embora alguns indivíduos isolados de espécies distintas apresentaram haplótipos característicos de uma espécie do mesmo gênero. O presente estudo evidenciou que as espécies de peixes dos rios costeiros do estado São Paulo, podem ser identificadas de forma eficiente através da utilização de código de barras do DNA, e que a biblioteca de DNA *barcode* pode ser usada para aplicações subsequentes em ecologia e sistemática.

## Introdução

As ferramentas moleculares fornecem uma ampla gama de novas oportunidades para estudar questões em Biologia Evolutiva (como nos processos de especiação) e em Sistemática Filogenética, porém, só recentemente foi proposto que um curto segmento de 648 nucleotídeos da extremidade 5' do gene mitocondrial Citocromo Oxidase I (COI ou Cox1) seria suficiente, em muitos metazoários, para identificá-los a nível de espécie (Hebert et al., 2003a; 2003b). O uso dessa metodologia, denominada “*DNA barcode*”, ganhou muita relevância com a criação em 2004 do “Consortium for the Barcode of Life (CBOL)” cuja meta é a criação de um banco de dados de códigos de barra, sequências parciais de DNA do gene Cox1, da biodiversidade global, com o objetivo de facilitar o processo de automação da identificação das espécies (ver o sítio [www.barcoding.si.edu](http://www.barcoding.si.edu) para maiores detalhes).

Essencialmente, os usuários da metodologia de *DNA barcode* pretendem tornar possível à atribuição de indivíduos a espécies e facilitar a descoberta de novas espécies (Moritz e Cicero, 2004). Os primeiros estudos realizados com essa metodologia foram extremamente satisfatórios com um grau de resolução taxonômica maior que 95% (Hebert et al., 2003a, 2003b). Além disso, a metodologia foi aplicada satisfatoriamente para identificar espécimes imaturos, indivíduos em diferentes estágios do ciclo de vida de algumas espécies e possíveis espécies crípticas. Porém, com o avanço dos estudos, encontraram-se também grupos que não puderam ser prontamente resolvidos em nível de espécie, como alguns cnidários bentônicos, dois grupos de anfíbios e algumas espécies de gastrópode, possivelmente porque esses grupos eram formados por espécies com tempo de divergência bastante reduzido (ver revisão em Waugh, 2007).

Os primeiros estudos iniciais em aves (Hebert *et al.*, 2004a) e artrópodes (Barrett e Hebert, 2005) corroboram a existência do *barcoding gap*, mas estudos recentes em gastrópodes (Meyer e Paulay, 2005), moscas (Meier *et al.*, 2006) e borboletas (Wiemers e

Fiedler, 2007) desafiam sua existência. As razões para essa discrepância não são inteiramente claras. Os estudos disponíveis sugerem que os níveis de divergência nas sequências de Cox1 diferem entre táxons mais antigos e mais recentes, assim, uma média excepcionalmente baixa de divergência em seqüências de Cox1, de apenas 1%, foi encontrada entre pares de espécies de cnidária, comparado a 9,6 a 15,7% em outros filos animais.

Em peixes poucos estudos foram realizados até o momento, como em peixes marinhos da região australiana (Ward *et al.*, 2005), e neotropicais da região do México e Guatemala (Valdez-Moreno *et al.*, 2009). No Brasil, apesar da riqueza de espécies de peixes, o único estudo realizado utilizando o *barcoding* se refere as raias de água doce (Toffoli *et al.*, 2008). Nesse estudo, com muitos problemas taxonômicos, não foi possível, segundo os autores, separar as espécies.

O objetivo deste trabalho foi o de analisar através do *barcoding*, o conjunto de espécies de peixes presentes nas drenagens atlânticas, denominado rios litorâneos (Figura 1), que compreendem 15 famílias e aproximadamente 48 espécies de peixes de água doce (Castro e Menezes, 1998).

As regiões dos rios costeiros são consideradas as mais ricas em formas endêmicas (cerca de 80% dos Ostariophysi dos rios costeiros do leste do Brasil são endêmicos), número este que deverá aumentar significativamente quando a região for melhor explorada ictiofaunisticamente e também após análises mais acuradas, como a que emprega a técnica de DNA *barcode*, utilizada no presente estudo.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

O DNA foi obtido a partir de amostras de músculo, sangue, brânquias ou nadadeiras preservadas em etanol 95%. As amostras foram obtidas a partir de exemplares (“vouchers”) depositados na coleção do Laboratório de Biologia e Genética de

Peixes (LBGP), Universidade Estadual Paulista, Botucatu-SP, reconhecidos em nível de espécies por taxonomistas a partir de caracteres morfológicos.

Estudos genéticos comparativos sugerem que os peixes de água doce geralmente possuem altos níveis de diversidade genética intra-populacional quando comparados com espécies marinhas (Ward, 1994). Desse modo sempre que possível cinco indivíduos por espécie de pelo menos duas localidades distintas desta bacia hidrográfica foram utilizados na tentativa de capturar uma parte representativa da diversidade molecular.

Extrações de DNA foram realizadas utilizando a técnica de extração por tampão de extração (Aljanabi & Martinez, 2001) e extração por kit comercial (“DNeasy Tissue Kit” – Qiagen Peqlab) seguindo orientações do fabricante.

Aproximadamente 654pb foram amplificados da região 5' do gene Citocromo Oxidase subunidade I (Cox 1), correspondentes a região DNA *barcoding* utilizando três conjuntos de *primers*, sendo eles: Fish F1 5'- TCA ACC AAC CAC AAA GAC ATT GGC AC -3', Fish R1 5'- AGACTTCTGGGTGGCCAAAGAATCA – 3', Fish F2 5'- TCG ACT AAT CAT AAA GAT ATC GGC AC -3', Fish R2 5'- CTTCAGGGTGACCGAAGAATCAGAA – 3' descritos por Ward *et al.* (2005) e L6252 – Asn 5'-AAG GCG GGG AAA GCC CCG GCA G-3', H7271 – COXI 5'-TCC TAT GTA GCC GAA TGG TTC TTT T-3' desenhados em nosso laboratório.

As amplificações foram realizadas num ciclador térmico de PCR utilizando-se 25 µl de uma solução contendo 17,35 µl de água ultra pura (milli-Q), 0,8 µl de dNTP (8 mM), 2,5 µl de tampão 10X, 0,5 µl de cada *primer* (10 µM), 1,25 µl de MgCl<sub>2</sub> (50 mM), 0,1 µl de DNA polimerase (5 unidades) e 2,0 µl de DNA. O programa de PCR consiste em um passo inicial de desnaturação a 95 °C por 2 minutos, seguidos de 35 ciclos de desnaturação a 94 °C por 30 segundos, anelamento a 54 °C por 30 segundos e extensão a 72 °C por 1 minuto, seguido de um passo final de extensão a 72 °C por 10 minutos. Os seguimentos de DNA amplificados foram visualizados em gel de agarose 1% corados com

brometo de etídio. Para a reação de PCR de sequenciamento foi utilizado o Kit “Big Dye™ Terminator v 3.1 Cycle Sequencing Ready Reaction” (Applied Biosystems) e sequenciamento por capilaridade no sequenciador ABI3130 (Applied Biosystems) seguindo orientações do fabricante.

Dados sobre as sequências obtidas, eletroferogramas, detalhes sobre os *primers* por espécime (Apêndices 3 e 4) estão disponíveis no projeto FBCRII (Fishes of Brazilian Coastal Rivers II) no banco de dados do projeto “Barcode of Life” (BOLD - [www.barcodinglife.org](http://www.barcodinglife.org)) na Universidade de Guelph.

As sequências obtidas foram editadas através dos programas ATGC (*Genetyx Corporation*) e Bioedit (Hall, 1999) para a obtenção de sequências consenso, as quais são posteriormente alinhadas usando-se o editor ClustalW (Thompson *et al.*, 1997) acoplado ao programa DAMBE (Xia e Xie, 2001). As sequências foram então submetidas no programa MEGA 4.0 (Tamura *et al.*, 2007) para a construção de dendrogramas, cujos parâmetros utilizados para verificar a divergência genética entre as sequências foram os recomendados na literatura para sequências DNA *barcode*, sendo utilizado o método de distância UPGMA, através do parâmetro K2P (Kimura-2-parâmetros). Os dendrogramas obtidos foram testados através do método *bootstrap* (Felsenstein, 1985) com 1.000 permutações.

## RESULTADOS

Um total de 58 espécies foi amostrado durante a realização desse trabalho. Os *primers* utilizados amplificaram a região alvo da maior parte das espécies. Dois problemas verificados foram relacionados a problemas de anelamento dos *primers*, onde as ampliações não ocorriam e problemas de ocorrência de contaminação de reações. Foram obtidas e analisadas 308 sequências DNA *barcode*, pertencentes a 49 espécies, 40 gêneros, 16 famílias e 8 ordens, as quais foram utilizadas para obtenção de um dendrograma mostrando o relacionamento geral entre elas (Apêndice 3). As sequências

obtidas apresentaram 654 pb e não foram encontradas inserções, deleções ou *stop-codons*, suportando que todas as regiões amplificadas correspondem a sequências funcionais de Cox1 mitocondrial, além de todas as sequências amplificadas possuírem um tamanho de 654pb, o que sugere que não foram sequenciados NUMTs (nuclear DNA sequences originating from mitochondrial DNA sequences). Em vertebrados, as sequências NUMTs tipicamente possuem um tamanho inferior à 600pb (Zhang & Hewitt 1996).

As sequências obtidas possuem, em sua maioria, um tamanho de 654pb sendo que 191 pb são conservadas e 465 pb são variáveis. Observando o conteúdo de GC (Tabela 1) dos 654pb do Cox 1 dos Osteichthys analisados, este apresentou uma taxa média de 45%. Esse valor é um pouco superior ao encontrado por Saccone *et al.* (1999), que em revisão sobre o genoma mitocondrial completo, encontrou em Osteichthys e Condrichthys uma taxa de 43,2% e 38,4 respectivamente.

**Tabela 1.** Média da composição de bases (com desvio padrão) das sequências obtidas dos peixes pertencentes aos rios costeiros do estado de São Paulo.

	Min	Média	Max	Desvio Padrão
<b>G %</b>	15.7	18.14	20.68	0.05
<b>C %</b>	22.32	26.86	32.32	0.13
<b>A %</b>	21.49	24.09	27.13	0.06
<b>T %</b>	26.76	30.91	35.21	0.12
<b>GC %</b>	40.88	45	50.86	0.14
<b>GC % Codon Pos 1</b>	50.3	55.5	59.27	0.12
<b>GC % Codon Pos 2</b>	41.94	42.79	45.21	0.02
<b>GC % Codon Pos 3</b>	25.08	36.23	50.76	0.35

A distância K2P média de indivíduos dentro de espécies foi de 0,77% em comparação a 6,16% entre espécies dentro de um mesmo gênero (Tabela 2). No geral, portanto, houve 8X mais variação entre espécies de um mesmo gênero que entre os indivíduos de uma mesma espécie.

A divergência média entre as espécies dentro de famílias foi de 21,39%, e entre as espécies dentro de ordens e classes foi de 23,98% e 25,99% respectivamente (Tabela 2). O aumento não proporcional das taxas em categorias taxonômicas mais elevadas se deve ao fato de ocorrer uma saturação nas substituições de nucleotídeos.

**Tabela 2.** Sumário de divergências genéticas (percentagens K2P) em vários níveis taxonômicos para as 49 espécies analisadas (308 espécimes).

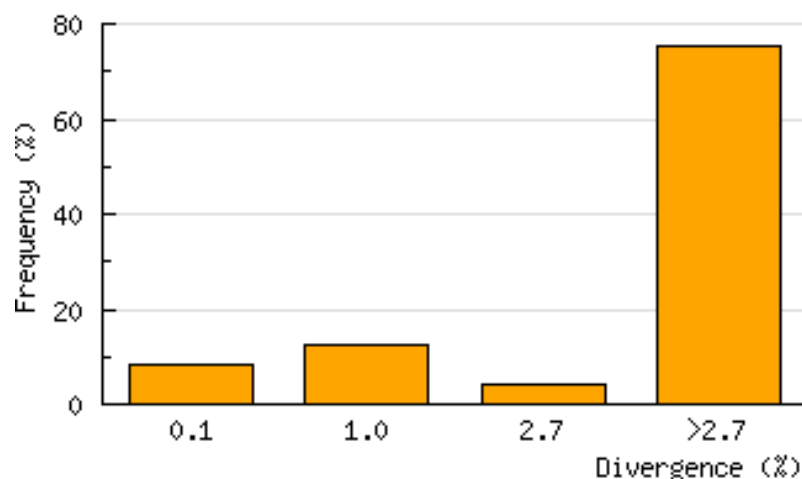
<b>Comparações</b>	<b>Número de</b>	<b>mínima</b>	<b>Distância</b>	<b>máxima</b>	<b>Desvio</b>
<b>entre</b>	<b>comparações</b>		<b>média</b>		<b>Padrão</b>
Espécies	1384	0	0.77	11.06	0.05
Gêneros	982	0	6.16	14.28	0.09
Famílias	3115	0	21.39	29.13	0.08
Ordens	7089	11.78	23.98	30.94	0.03
Classes	34638	17.87	25.99	38.59	0.01

Distribuições nas médias de distância K2P entre indivíduos de uma mesma espécie e entre espécies de uma mesmo gênero, ficaram parcialmente sobrepostas, como podemos observar na Tabela 2, variando de 0 a 11.06% entre indivíduos co-específicos e 0 a 14,28% entre indivíduos co-gêneros.

Um aumento contínuo da variação genética através do aumento dos níveis taxonômicos foi observado, apoiando uma mudança acentuada de divergência genética

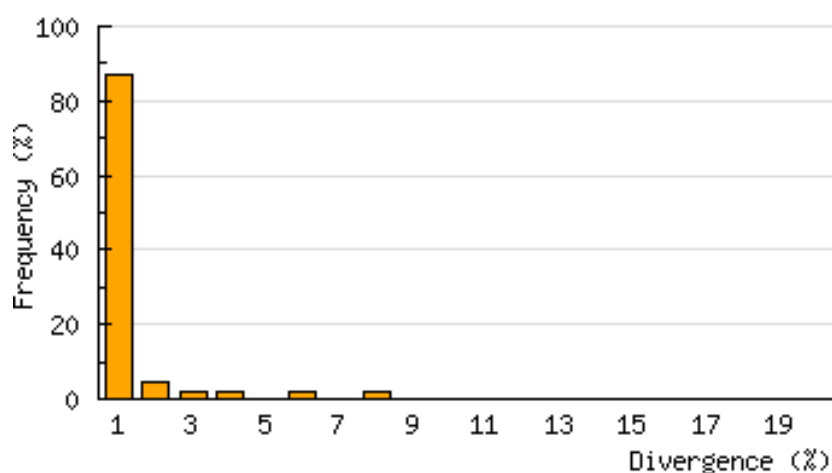
com os limites da espécie. A análise da distribuição de distância para o vizinho mais próximo (nearest – neighbour distance - NND), ou seja, análise da distância genética mínima entre espécies e seus parentes mais próximos, revelou que 20% dos NND foram inferiores a 1% e destes 8,1% foram inferiores a 0,1% (Figura 1). Em contrapartida, a divergência entre indivíduos de uma mesma espécie foi inferior a 1% em 83% dos casos (Figura 2). A média de NND foi 10,16%, ou seja, 16 vezes maior que a média da distância genética entre indivíduos de uma mesma espécie, que foi de 0,62%.

Sobreposição na distribuição das distâncias genéticas entre os indivíduos de uma mesma espécie e indivíduos de espécies de um mesmo gênero podem ser originários de profundas divergências intra-específicas, ou baixas divergências entre espécies irmãs (Hubert *et al.*, 2008).



**Figura 1.** Gráfico da frequência em que a divergência entre vizinhos mais próximos (nearest – neighbour distance –NND) se apresentaram após análise das 49 espécies analisadas.





**Figura 2.** Gráfico da frequência em que a percentagem das divergências interespecíficas se apresentou após análise das 49 espécies analisadas.

**Tabela 3.** Diversidade dos rios costeiros do estado de São Paulo e distribuição das distâncias genéticas das 49 espécies analisadas em relação à distância genética para o vizinho mais próximo (nearest – neighbour distance - NND), utilizando o modelo K2P.

Ordem	Família	N° de espécies	< 0,1	0,1-1,0	1-2,7	>2,7
Synbranchiformes	Synbranchidae	1				1
Perciformes	Eleotridae	3		2		1
	Gobiidae	3	2			1
	Cichlidae	3			2	1
Siluriformes	Heptapteridae	4		2		2
	Callichthyidae	3				3
	Trichomycteridae	3				3
	Loricariidae	5				5
Characiformes	Crenuchidae	5				5

	Characidae	9	2	7
	Erythrinidae	1		1
Sygnathiformes	Sygnathidae	2		2
Gymnotiformes	Gymnotidae	2		2
Cyprinodontiformes	Poeciliidae	2	2	
	Rivulidae	2		2
Cypriniformes	Cyprinidae	1		1
	<b>TOTAL</b>	<b>49</b>	<b>4</b>	<b>6</b>
			<b>2</b>	<b>37</b>

## DISCUSSÃO

Sistemas de identificação baseados no DNA dependem da habilidade de distinguir entre as variações intra e interespecíficas. O presente estudo demonstrou eficácia da técnica de DNA *barcode* para criação de um sistema de identificação de espécies pertencentes ao conjunto de drenagens costeiras do estado de São Paulo. Por outro lado, ficou claro que as espécies com problemas de separação pela técnica de DNA *barcode* foram exatamente algumas espécies pertencentes a grupos com históricos problemas taxonômicos, problemas esses que podem impedir uma correta nomenclatura e identificação do voucher, e não de separação pela técnica do DNA *barcode*.

O sucesso do DNA *barcode*, depende da distribuição de distâncias genéticas entre indivíduos co-específicos e hetero-específicos, dado que falhas no agrupamento utilizando essa técnica são proporcionais à sobreposição entre essas duas distribuições (Meyer, 2005).

O Citocromo Oxidase 1 apresenta uma alta taxa mutacional, mesmo para um DNA mitocondrial (Saccone, 2009). Desse modo o presente estudo confirma que, na maioria

dos táxons aqui analisados (75,5%), o “*barcoding gap*” (de acordo com Meyer (2005) o comprimento do ramo entre as espécies tende a ser maior do que entre indivíduos de uma mesma espécie, levando a uma lacuna na distribuição da distância entre pares) foi observado, e a distância genética média entre indivíduos da mesma espécie, foi geralmente menor do que a média de distância genética entre indivíduos de espécies distintas, mesmo que apenas espécies irmãs fossem consideradas. Essa taxa é similar ao encontrado no presente estudo (Capítulo 1) em relação à bacia do rio Ribeira de Iguape, onde essa taxa foi de 66,2%.

As espécies de peixes aqui analisadas, apresentaram divergências co-genéricas 8X maior do que entre indivíduos da mesma espécie, uma proporção inferior (25X) ao encontrado no estudo de peixes australianos (Ward *et al.*, 2005) e ligeiramente inferior (12X) ao encontrados em peixes mexicanos (Valdez-Moreno *et al.*, 2009) e nos peixes da bacia do Ribeira do Iguape (15X) (Capítulo 1). Uma possível explicação para essa diferença nas divergências entre espécies dulcícolas e marinhas seja o fato de as espécies de água doce, em média, serem de origem mais recente que as espécies marinhas (Valdez-Moreno *et al.*, 2009).

Uma possível explicação para as taxas de divergência co-genéricas estarem ligeiramente discrepantes quando comparamos os dados obtidos dos indivíduos dos riachos costeiros (8X) com os dados da bacia do rio Ribeira de Iguape (15X), poderia ser um problema de identificação dos indivíduos das famílias Gobiidae, Eleotridae e Poecilidae, visto que são espécies de complexa identificação por serem muito similares entre si.

Sequências NUMTs (transferências de sequências de DNA mitocondrial no genoma nuclear) não foram observadas. Uma revisão sobre a ocorrência de NUMTs em animais e plantas não encontraram nenhuma evidência sobre sua existência em Actinopterygii (Bensasson *et al.*, 2001), mas uma comparação de sequências de DNA mitocondrial e nuclear detectaram oito NUMTs em *Fungu rupripes* (Richly & Leister,

2004). Isso confirma a necessidade de se tomar cuidado ao analisar sequências em peixes no caso de um eventual caso de amplificação de pseudogenes.

A distância média entre indivíduos co-específicos foi de cerca de 0,77%, enquanto a distância média de NND e distância média entre as espécies de um mesmo gênero foram 10,1% e 6,16%, respectivamente. Quando usamos um limiar de 1% de divergência genética para separarmos espécies, 5 famílias (Eleotridae, Gobiidae, Heptapteridae, Characidae e Poeciliidae), das 16 famílias analisadas apresentaram espécies que ficaram fora desse limiar (Tabela 3).

Ao analisar-se o conjunto das 49 espécies, a única situação em que sequências DNA *barcode* foram compartilhadas, ocorreu ao analisar os gêneros *Astyanax* e *Geophagus*, alguns indivíduos identificados somente em nível de gênero se uniram com indivíduos de espécies definidas, *Astyanax janeiroensis* e *Geophagus iporanguensis* respectivamente. Isso sugere que a verdadeira identidade de tais indivíduos seja essas espécies anteriormente citadas.

No gênero *Characidium*, espécimes coletados em Ubatuba – SP e identificados como *Characidium lanei*, apresentaram uma divergência 5,5% em relação a exemplares coletados na região de Itanhaém e Mongaguá, também identificados como sendo *Characidium lanei*. Estudos citogenéticos em exemplares de ambos os grupos apresentaram cariótipos distintos (Pansonato, comunicação pessoal), sendo os exemplares de Ubatuba-SP com cariótipos iguais aos da localidade tipo de *Characidium lanei*. Como no presente estudo não foram seqüenciados exemplares de *Characidium lanei* da localidade tipo, chegamos a conclusão por dados citogenéticos e os aqui apresentados que os espécimes de Ubatuba seriam denominados *Characidium lanei*, e os da região de Itanhaém e Mongaguá de *Characidium sp.*

Na espécie *Mimagoniates microlepis*, pode-se observar uma divergência de 1,25% ao compararmos os espécimes coletados na região de Ubatuba-SP com Itanhaém-SP e Mongaguá-SP, e entre Itanhaém e Mongaguá a divergência média encontrada foi de

0,63%. A divergência entre Ubatuba e as outras localidades, apesar de representar 2X a divergência encontrada em Mongaguá e Itanhaém, ainda encontra-se na faixa de divergência média encontrada em espécies de peixes (Ward *et al.*, 2009). Porém, ao se juntar os dados obtidos na bacia do Ribeira de Iguape, a divergência genética salta para 5% entre o grupo dos rios costeiros e Ribeira de Iguape e entre os espécimes do Ribeira de Iguape a divergência não passou de 0,62%, sugerindo que a espécie coletada no Ribeira de Iguape pode ser uma espécie distinta da encontrada nos rios costeiros.

No caso do gênero *Phalloceros*, segundo Lucinda (2008), somente a espécie *Phalloceros reisi* seria encontrada nas drenagens costeiras e na bacia do rio Ribeira de Iguape, porém, levando-se em consideração somente as taxas de divergência genética, podemos sugerir a existência de pelo menos cinco “clusters” para a região dos rios costeiros e Ribeira de Iguape cujas divergências médias no gênero são de 6,3%, chegando a uma divergência máxima de 10,6%.

Também devemos levar em consideração, que a utilização de uma percentagem única de divergência genética como taxa de corte, para determinação de espécies, pode ser um erro, podendo em algumas situações levar a atribuições errôneas (Hickerson *et al.*, 2006, Meier *et al.* 2006).

Resoluções de casos desta natureza exigem cuidadosa análise morfológica por taxonomistas especialistas antes que quaisquer recomendações finais possam ser feitas. O *Barcoding* e a análise morfológica devem caminhar juntas.

Embora a análise do *barcode* apenas vise delinear limites da espécie, é evidente a existência de algum sinal filogenético na análise dos dados. No entanto, não se pode esperar obter uma verdadeira filogenia para peixes, a partir de um fragmento de apenas 654 pb de DNA mitocondrial através de distância K2P e Neighbour-joining. Para isso, mais genes devem ser usados (incluindo genes nucleares) e outros métodos analíticos implantados, incluindo máxima parcimônia e máxima verossimilhança (Ward *et al.*, 2005).

Assim que projeto de DNA *barcode* complete seu banco de dados global para peixes e outros grupos biológicos, qualquer pessoa com acesso direto ou indireto a um sequenciador de DNA será capaz de identificar, a um grau elevado de certeza, qualquer ovo, larva ou fragmento de carcaça. Esta será uma ferramenta valiosa, por exemplo, no caso de peixes, na identificação do pescado desembarcado nos mercados, na identificação de espécies em trabalhos de consultoria e para muitos outros benefícios científicos e práticos.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aljanabi, S. M., Martinez, I. (1997). Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. *Nucleic Acids Research*, 25: 4692-4693, nº 22.
- Barber P, Boyce SL (2006) Estimating diversity of Indo-Pacific coral reef stomatopods through DNA barcoding of stomatopod larvae. *Proceedings of the Royal Society of London, Series B, Biological Sciences* 273: 2053–2061.
- Barrett, R. D. H., Hebert, P. D. (2005). Identifying spiders through DNA barcodes. *Can J Zool*, 83:481-491.
- Bensasson D, Zhang D-X, Hartl DL, Hewitt GM (2001) Mitochondrial pseudogenes: Evolution's misplaced witnesses. *Trends Ecol Evol* 16:314–321
- Castro, R.M.C., Menezes, N.A. (1998). Estudo diagnóstico da diversidade de peixes do Estado de São Paulo. IN: *Biodiversidade do Estado de São Paulo, Brasil*. Ed. R.M.C. Castro. São Paulo: FAPESP. Pp. 3-13
- Felsenstein, J. (1985). Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution*, 39: 783-791.
- Hall, T.A. (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.* 41:95-98.
- Hebert P.D.N.; A. Cywinska; S.L. Ball & J.R. deWaard. 2003a. Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences* 270: S569-S599.

- Hebert P.D.N.; S. Ratnasingham & J.R. deWaard. 2003b. Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit I divergences among closely related species. *Proceedings of the Royal Society. Series B, Biological Sciences* 270: 313- 321.
- Hebert P.D.N, Penton EH, Burns JM, Janzen DH, Hallwachs W (2004a) Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astraptes fulgerator*. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 101: 14812–14817.
- Hickerson M.J, Meyer CP, Moritz C (2006) DNA barcoding will often fail to discover new animal species over broad parameter space. *Systematic Biology* 55: 729–739.
- Hubert N., Hanner R., Holm E., Mandrak N.E., Taylor E., et al. (2008) Identifying Canadian Freshwater Fishes through DNA Barcodes. *PLoS ONE* 3(6): e2490. doi:10.1371/journal.pone.0002490
- Kerr K.C., Stoeckle MY, Dove CJ, Weigt LA, Francis CM, et al. (2007) Comprehensive DNA barcode coverage of North American birds. *Molecular Ecology Notes* doi: 10.1111/j.1471-8286.2007.01670.x.
- Lucinda, P. H. F. 2008. Systematics and Biogeography of the poeciliid fishes genus *Phalloceros* with the descriptions of twenty - one new species. *Neotropical Ichthyology*, 6(2): 113 - 158.
- Meier R, Shiyang K, Vaidya G, Ng PKL (2006) DNA barcoding and taxonomy in Diptera: a tale of high intraspecific variability and low identification success. *Systematic Biology* 55: 715–728.
- Meyer CP, Paulay G (2005) DNA barcoding: error rates based on comprehensive sampling. *PLOS Biology* 3: 2229–2238.
- Moritz C. & Cicero C. (2004). DNA barcoding: promise and pitfalls. *PLoS Biology* 2, 1529–1531.
- Pons J., Barraclough T.G., Gomez-Zurita J., Cardoso A, Duran DP, et al. (2006) Sequence-based species delimitation for the DNA taxonomy of undescribed insects. *Systematic Biology* 55: 595–606.
- Richly, E. and D. Leister. 2004. NUMTs in sequenced eukaryotic genomes. *Mol. Biol. Evol.* 21:1081–1084.
- Saccone, C., De Giorgi, C., Gissi, C., Pesole, G. & Reyes, A. 1999 Evolutionary genomics in Metazoa: the mitochondrial DNA as a model system. *Gene* 238, 195–209. (doi:10.1016/S0378-1119(99)00270-X.)

- Tamura K, Dudley J, Nei M & Kumar S (2007) MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. [Molecular Biology and Evolution](#) 24: 1596-1599.
- Thompson, J.D., Gibson, T.J., Plewniak, F., Jeanmougin, F., Higgins, D.G. (1997). The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.* 24:4876-4882.
- Toffoli, Daniel et al. A test of the utility of DNA barcoding in the radiation of the freshwater stingray genus *Potamotrygon* (Potamotrygonidae, Myliobatiformes). *Genet. Mol. Biol.* [online]. 2008, vol.31, n.1, suppl., pp. 324-336. ISSN 1415-4757.
- Ward, R. D., Hanner, R. & Hebert, P.D.N. (2009). REVIEW PAPER: The campaign to DNA barcode all fishes, FISH-BOL. *Journal of Fish Biology* (2009) 74, 329 a 356.
- Ward, R.D., Woodwark M, Skininski DOF (1994) A comparison of genetic diversity levels in marine, freshwater and anadromous fish. *Journal of FishBiology* 44: 213–232.
- Ward, R. D., Zemlak, T. S., Innes, B. H., Last, P. R., Hebert, P. D. N. (2005). DNA barcoding Australia's fish species. *Phil. Trans. R. Soc. B*, 359:1847-1857.
- Waugh, J. (2007). DNA barcoding in animal species: progress, potential and pitfalls. *BioEssays* 29, 188–197.
- Wiemers, M., Fiedler, K. (2007). Does the DNA barcoding gap exist? – a case study in blue butterflies (Lepidoptera: Lycaenidae). *Frontiers in Zool.*, 4(8):1-16.
- Xia, X., Xie, Z. (2001). DAMBE: Data analysis in molecular biology and evolution. *J. Heredity* 92:371-373.
- Zhang, D.-X. & Hewitt, G. M. 1996 Nuclear integrations: challenges for mitochondrial DNA markers. *Trends Ecol. Evol.* 11, 247–251. (doi:10.1016/0169-5347(96)10031-8.)



### 4.3 DISCUSSÃO GERAL

O presente estudo demonstrou a eficácia da técnica de DNA *barcode* para identificação das espécies da bacia do rio Ribeira de Iguape e dos rios costeiros do estado de São Paulo. Por outro lado, ficou claro que as espécies com problemas de separação pela técnica de DNA *barcode* foram exatamente algumas espécies pertencentes a grupos com histórico de problemas taxonômicos.

O sucesso do DNA *barcode*, depende da distribuição de distâncias genéticas entre indivíduos co-específicos e hetero-específicos, dado que falhas no agrupamento utilizando essa técnica são proporcionais à sobreposição entre essas duas distribuições (Meyer, 2005).

As drenagens estudadas compartilharam 27 espécies, ou seja, espécies que foram coletadas tanto na bacia do Ribeira de Iguape quanto nos rios costeiros do estado de São Paulo e tiveram suas sequências incluídas no BOLD (Barcode of Life Data Systems).

A distância K2P média para as espécies dos rios costeiros foi de 0,77% em comparação a 6,16% entre espécies dentro de um mesmo gênero. No geral, portanto, houve 8X mais variação entre espécies de um mesmo gênero que entre os indivíduos de uma mesma espécie para essas drenagens, valores similares ao encontrado entre as espécies do Ribeira de Iguape que foi de 0,41% em comparação a 6,32% entre espécies dentro de um mesmo gênero, portanto, há 15X mais variação entre espécies de um mesmo gênero que entre os indivíduos de uma mesma espécie. Essas proporções são similares ao encontrado por Valdez-Moreno *et al.*(2009) analisando-se peixes dulcícolas do México, e inferiores ao encontrado por Ward *et al.* (2005) analisando peixes marinhos australianos. Uma possível explicação para essa diferença entre as divergências obtidas entre espécies marinhas e dulcícolas seja o fato de que as espécies de água doce, em sua maioria sejam de origem mais recente (Valdez-Moreno *et al.*, 2009; Montoya – Burgos, 2003; Hubert *et al.* 2007).

Ao juntarmos os projetos cadastrados no BOLD, que são FBCR (Fishes of Brazilian Coastal Rivers) para os peixes da bacia do rio Ribeira de Iguape e FBCRII (Fishes of Brazilian Coastal Rivers II) para os peixes pertencentes aos rios litorâneos (Apêndice 5), obtivemos uma distância K2P média para as espécies de 0,96% em comparação a 6,38% entre espécies dentro de um mesmo gênero (Tabela 1). Ou seja, mesmo ao juntarmos os dados de ambas as áreas estudadas, as médias continuam dentro do encontrado por Ward *et al.* (2009) em revisão dos dados de peixes depositados no Bold.

**Tabela 1.** Sumário de divergências genéticas (percentagens K2P) em vários níveis taxonômicos para as 91 espécies analisadas (FBCR e FBCRII) (706 espécimes).

<b>Comparações</b>	<b>Número de</b>	<b>mínimo</b>	<b>Distância</b>	<b>máximo</b>	<b>Desvio</b>
<b>entre</b>	<b>comparações</b>		<b>média</b>		<b>Padrão</b>
Espécies	4807	0	0.96	14.17	0.03
Gêneros	3436	0	6.38	15.56	0.07
Famílias	19861	0	20.03	29.65	0.03
Ordens	47828	11.78	23.21	31.35	0.01
Classes	171756	11.37	25.74	38.59	0.01

Ao analisarmos espécies que ocorrem em ambas as áreas de estudadas no presente trabalho, um caso que chama a atenção é o caso da espécie *Mimagoniates microlepis*, onde pode-se observar uma divergência de 1,25% ao compararmos os espécimes coletados na região de Ubatuba-SP com Itanhaém-SP e Mongaguá-SP. Entre Itanhaém e Mongaguá a divergência média encontrada foi de 0,63%. A divergência entre Ubatuba e as outras localidades, apesar de representar 2X a divergência encontrada em Mongaguá e Itanhaém, ainda encontra-se na faixa de divergência média encontrada em

espécies de peixes (Ward *et al.*, 2009). Porém, ao juntarmos os dados obtidos na bacia do Ribeira de Iguape, a divergência genética salta para 5% entre o grupo dos rios costeiros e Ribeira de Iguape, sendo que entre os espécimes do Ribeira de Iguape a divergência dentro desse grupo não passou de 0,62%, sugerindo que a espécie coletada no Ribeira de Iguape pode ser uma espécie distinta da encontrada nos rios costeiros.

Ao compararmos espécimes do gênero *Geophagus*, podemos observar uma divergência média de 0,79% ao compararmos todos os espécimes, porém, ao comparar-se dois grupos, um grupo formado por indivíduos de Ubatuba – SP e outro grupo sendo formado por todos os outros espécimes coletados do gênero, observa-se uma divergência média de 1,73% entre os grupos, uma divergência acima da encontrada para outros indivíduos do mesmo gênero

No caso da espécie *Schizolecis gunteri*, descobriu-se uma divergência representativa entre o grupo amostrado na bacia do Ribeira de Iguape e o grupo amostrado nos rios costeiros, enquanto a divergência dentro desses grupos não ultrapassava 0,33%, a divergência entre os grupos foi de 14%, uma taxa extremamente elevada em nível de espécie, o que nos leva a sugerir a possibilidade de serem espécies diferentes, ou mesmo gêneros diferentes, porém mais indivíduos dessas áreas necessitam ser amostrados para mais análises.

A análise futura de novos exemplares de espécies com baixo nível de separação no presente estudo deverão ser bastante úteis para um melhor conhecimento da fauna de peixes de rios costeiros de São Paulo.

## 5 CONCLUSÃO

A maioria das espécies de peixes de água doce da bacia do rio Ribeira de Iguape e rios costeiros aqui analisadas apresentam um padrão similar de diversidade genética no Cox 1, sendo cada cluster definido por sequências de mtDNA fortemente relacionadas e distinto de todas as outras espécies. Portanto, o presente estudo suporta a visão de que o uso do DNA *barcode* é uma ferramenta poderosa para a identificação de espécies. Usando este método, será possível a qualquer um com acesso a sequenciamento e internet a identificação de peixes de água doce, de ovos, larvas, amostras de músculo e barbatanas, portanto, fornecendo uma ferramenta muito útil para a prática de conservação e genética forense nessas espécies de peixes de água doce.

De uma perspectiva sistemática, o DNA *barcode* fornece uma abordagem nova e rápida para a identificação do número real de espécies caracterizadas por conjuntos particulares de caracteres diagnósticos. A identificação de vários casos de polifiletismo e parafiletismo na genealogia das espécies usando o Cox 1, suporta a visão de que um processo iterativo de DNA *barcode*, seguido por análises taxonômicas usando outros caracteres, será uma maneira produtiva de se criar um catálogo da biodiversidade do planeta como sugerido por Barber (2006) e Kerr *et al.* (2007).

## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Albert, J. S., Fernandes-Matioli, F. M., Almeida-Toledo, L. F. (1999). New species of *Gymnotus* (Gymnotiformes, Teleostei) from Southeastern Brazil: towards the deconstruction of *Gymnotus carapo*. *Copeia*, 1999(2): 410-421.
- Almeida-Toledo, L.F., Foresti, F., Trajano, E. and Toledo Filho, S.A. (1992). Cytogenetic analysis of the Brazilian blind catfish *Pimelodella kronei* and of its presumed ancestor *Pimelodella transitoria*. *Caryologia* 45: 255-262.
- Avise, J. C. (1994). Molecular markers, natural history and evolution. New York: Chapman & Hall.
- Barber P, Boyce SL (2006) Estimating diversity of Indo-Pacific coral reef stomatopods through DNA barcoding of stomatopod larvae. *Proceedings of the Royal Society of London, Series B, Biological Sciences* 273: 2053–2061.
- Barrett, R. D. H., Hebert, P. D. (2005). Identifying spiders through DNA barcodes. *Can J Zool*, 83:481-491.
- Bensasson D, Zhang D-X, Hartl DL, Hewitt GM (2001) Mitochondrial pseudogenes: Evolution's misplaced witnesses. *Trends Ecol Evol* 16:314–321
- Bizerril, C.R.S.F., Lima, N.R.W. (2000). Levantamento da ictiofauna da bacia do rio Ribeira, Brasil. *Acta Biologica Leopoldinensia*, 22: 103-110.
- Bremer, K. (1988). The limits of amino acid sequence data in angiosperm phylogenetic reconstruction. *Evolution*, 42: 795-803.
- Brower, A.V. Z. (2006). Problems with DNA barcodes for species delimitation: 'ten species' of *Astrartes fulgerator* reassessed (Lepidoptera: Hesperidae). *Syst Biodiv*, 4(2):127-132.
- Castro, R.M.C., Menezes, N.A. (1998). Estudo diagnóstico da diversidade de peixes do Estado de São Paulo. IN: Biodiversidade do Estado de São Paulo, Brasil. Ed. R.M.C. Castro. São Paulo: FAPESP. Pp. 3-13
- Davis, J. I., Nixon, K. C. (1992). Populations, genetic variation, and the delimitation of phylogenetic species. *Syst. Biol.*, 41:421–435.
- DeQueiroz, K. (2005). Ernst Mayr and the modern concept of species. *Proc Natl Acad Sci USA*, 102(s1):6600-6607.
- DeSalle, R., Egan, M. G., Siddall, M. (2005). The unholy trinity: taxonomy, species delimitation and DNA barcoding. *Phil Trans Royal Soc B*, 360:1905-1916.
- Ebach, M. C., Holdrege, C. (2005). DNA barcoding is no substitute for taxonomy. *Nature* 434:697.
- Farris, J.S., Albert, V.A., Källersjö, M., Lipscomb, D., Kluge, A.G. (1996). Parsimony jackknifing outperforms neighbor-joining. *Cladistics*, 12: 99-124.
- Felsenstein, J. (1985). Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution*, 39, 783-791.

- Felsenstein, J. (2004). *Inferring phylogenies*. Sinauer Associates, Inc., Sunderland, Massachusetts, 664 pp.
- Fink, S.V., Fink, W.L. (1981). Interrelationships of the ostariophysan fishes (Teleostei). *Zool. J. Linn. Soc. Lond.*, 72: 297-353.
- Fitzhugh, K. (2006). DNA barcoding: an instance of technology-driven science? *Bioscience* 56, 462–463.
- Funk DJ, Omland KE (2003) Species-level paraphyly and polyphyly: frequency, causes and consequences, with insights from animal mitochondria DNA. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics* 34: 397–423.
- Goldstein, P. Z., DeSalle, R. (2000). Phylogenetic species, nested hierarchies, and character fixation. *Cladistics*, 16:364–384.
- Goldstein, P. Z., DeSalle, R. (2003). Calibrating phylogenetic species formation in a threatened insect using DNA from historical specimens. *Mol. Ecol.*, 12:1993–1998.
- Goldstein, P. Z., DeSalle, R., Amato, G., Vogler, A. P. (2000). Conservation genetics at the species boundary. *Conserv. Biol.*, 14:120–131.
- Golobof, P., Farris, J., Nixon, K. (2006). T.N.T.: Tree analysis using new technology. Program and documentation available from the authors. [www.zmuc.dk/public/phylogeny](http://www.zmuc.dk/public/phylogeny).
- Gregory, T.R. (2005). DNA barcoding does not compete with taxonomy. *Nature* 434:1067-1067.
- Hajibabaei M., Singer, G. A., Hebert, P. D. N., Hickey, D. A. (2007). DNA barcoding: how it complements taxonomy, molecular phylogenetics and population genetics. *Trends in Genetics*, 23(4):167-172.
- Harrison, I. J., Nirchio, M., Oliveira, C., Ron, E., Gavira, J. (2007). A new species of mullet (Teleostei: Mugilidae) from Venezuela, with a discussion on the taxonomy of *Mugil gaimardianus*. *J Fish Biol*, 71:76-97.
- Hebert, P. D. N., Cywinska, A., Ball, S. L., deWaard, J. R. (2003a). Biological identifications through DNA barcodes. *Proc R Soc Lond B*, 270:313-322.
- Hebert, P. D. N., Penton, E.H., Burns, J.M., Janzen, D. H., Hallwachs, W. (2004b). Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astraptes fulgerator*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 101(41):14812-14817.
- Hebert, P. D. N., Ratnasingham, S., deWaard, J. R. (2003b). Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proc Biol Sci*, 270:S96-99.
- Hebert, P. D. N., Stoeckle, M. Y., Zemplak, T. S., Francis, C. M. (2004a). Identification of birds through DNA Barcodes. *PLoS Biol*, 2(10):1567-1663.
- Hennig, W. (1966). *Phylogenetics systematics*. University of Illinois Press, Urbana, Illinois.
- Hillis, D. M., Moritz, C., Mable, B. K. (1996). *Molecular Systematics*. Massachusetts: Sinauer Associates Incorporation.

- Hickerson MJ, Meyer CP, Moritz C (2006) DNA barcoding will often fail to discover new animal species over broad parameter space. *Systematic Biology* 55: 729–739.
- Hogg, I. D. & Hebert, P. D. N. (2004). Biological identification of springtails (Hexapoda: Collembola) from the Canadian Arctic, using mitochondrial DNA barcodes. *Canadian Journal of Zoology* 82, 749–754.
- Hubert N, Hanner R, Holm E, Mandrak NE, Taylor E, et al. (2008) Identifying Canadian Freshwater Fishes through DNA Barcodes. *PLoS ONE* 3(6): e2490. doi:10.1371/journal.pone.0002490
- Kerr KC, Stoeckle MY, Dove CJ, Weigt LA, Francis CM, et al. (2007) Comprehensive DNA barcode coverage of North American birds. *Molecular Ecology Notes* doi: 10.1111/j.1471-8286.2007.01670.x.
- Köhler, F. (2007). From DNA taxonomy to barcoding - how a vague idea evolved into a biosystematic tool. *Zool Reihe*, 83:44-51.
- Kumar, S., Tamura, K., Nei, M. (2004). MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. *Briefings in Bioinformatics*, 5:150-163.
- Lemmon, A.R., Milinkovitch, M.C. (2002). MetaPIGA (Phylogenetic Inference using the MetaGA) version 1.0.2b. Distribuído pelos autores. [www.ulb.ac.be/sciences/ueg](http://www.ulb.ac.be/sciences/ueg).
- Lipscomb, D., Platnick, N., Wheeler, Q. (2003). The intellectual content of taxonomy: a comment on DNA taxonomy. *Trends Ecol Evol*, 18:65-66.
- Lucinda, P. H. F. 2008. Systematics and Biogeography of the poeciliid fishes genus *Phalloceros* with the descriptions of twenty - one new species. *Neotropical Ichthyology*, 6(2): 113 - 158.
- Malabarba, L.R., Reis, R.E., Vari, R.P., Lucena, Z.M.S., Lucena, C.A.S. (1998). Phylogeny and classification of neotropical fishes. Porto Alegre: Edipucrs.
- Manwell, C., Baker, C.M.A. (1963). A sibling species of seacucumber discovered by starch-gel electrophoresis. *Comp. Biochem. Physiol.*, 10, : 39–53.
- May, R. M. (1988). How many species are there on Earth? *Science*, 241:1441–1449.
- Mayr, E. (1969). *Principles of systematic zoology*. New York , McGraw-Hill.
- Meier, R., Shiyang, K., Vaidya, G., Ng, P. K. L. (2006). DNA barcoding and taxonomy in Diptera: a tale of high intraspecific variability and low identification success. *Syst Biol*, 55(5):715-728.
- Meyer, C. P., Paulay, G. (2005). DNA barcoding: error rates based on comprehensive sampling. *PLoS Biol*, 3(12):1-10.
- Miller, S. E. (2007). DNA barcoding and the renaissance of taxonomy. *Proc Natl Acad Sci USA*, 104:4775-4776.
- Moritz, C. and Cicero, C. (2004). DNA barcoding: promise and pitfalls. *PLoS Biol*. 2(10):1529-1531.

- Nei, M., Kumar, S. (2000). *Molecular evolution and phylogenetics*. Oxford University Press, New York, USA.
- Nixon, K. C., Wheeler, Q. D. (1990). An amplification of the phylogenetic species concept. *Cladistics*, 6:211–223.
- Oyakawa, O.T., Akama, A., Mautari, K.C., Nolasco, J.C. (2006). Peixes de riachos da mata atlântica nas Unidades de Conservação do Vale do Rio Ribeira de Iguape no Estado de São Paulo: Editora Neotrópica Ltda, 201 p.
- Pegg, G.G., Sinclair, B., Briskey, L., Aspden, W.J., 2006. MtDNA barcode identification of fish larvae in the southern Great Barrier Reef, Australia. *Scientia Marina* 70 (Suppl. 2), 7–12.
- Pons J, Barraclough TG, Gomez-Zurita J, Cardoso A, Duran DP, et al. (2006) Sequence-based species delimitation for the DNA taxonomy of undescribed insects. *Systematic Biology* 55: 595–606.
- Posada, D., Crandall, K.A. (1998). Modeltest: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics*, 14: 817-818.
- Reis, R.E., Kullander, S.O., Ferraris, C. (2003). *Check List of the Freshwater Fishes of South and Central America (CLOFFSCA)*, Porto Alegre: Edipucrs.
- Ribeiro, A. C., Lima, F.C.T., Riccomini, C. Menezes, N.A. (2006). Fishes of the Atlantic Rainforest of Boracéia: testimonies of the Quaternary fault reactivation within a Neoproterozoic tectonic province in Southeastern Brazil. *Ichthyological Explorations of Freshwaters*, 17(2): 157-164.
- Richly, E. and D. Leister. 2004. NUMTs in sequenced eukaryotic genomes. *Mol. Biol. Evol.* 21:1081–1084.
- Rosenberg, N. A. (2007). Statistical tests for taxonomic distinctiveness from observations of monophyly. *Evolution*, 61: 317-323.
- Saccone, C., De Giorgi, C., Gissi, C., Pesole, G. & Reyes, A. 1999 Evolutionary genomics in Metazoa: the mitochondrial DNA as a model system. *Gene* 238, 195–209. (doi:10.1016/S0378-1119(99)00270-X.)
- Sarkar, I. N., Thornton, J. W., Planet, P. J., Figurski, D. H., Schierwater, B., DeSalle, R. (2002). An automated phylogenetic key for classifying homeoboxes. *Mol. Phylogenet. Evol.*, 24:388–399.
- Savage, J.M. (1995). Systematics and the biodiversity crisis. *BioScience*, 45: 673-679.
- Schaefer, S.A. (1998). Conflict and resolution impact of new taxa on phylogenetic studies of the Neotropical cascudinhos (Siluroidei: Loricariidae). IN: *Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes*. Eds. Malabarba, L.R., Reis, R.E., Vari, R.P., Lucena, Z.M.S., Lucena, C.A.S. Porto Alegre: Edipucrs. Pp. 375-400.
- Smith, M. A., Fisher, B. L. & Hebert, P. D. N. (2005). DNA barcoding for effective biodiversity assessment of a hyperdiverse arthropod group: the ants of Madagascar. *Philosophical Transactions of the Royal Society B* 360, 1825–1834.



- Smith, M. A., Woodley, N. E., Janzen, D. H., Hallwachs, W., Hebert, P. D. N. (2006). DNA barcodes reveal cryptic host-specificity within the presumed polyphagous members of a genus of parasitoid flies (Diptera: Tachinidae). *Proc Natl Acad Sci USA*, 103(10):3657-3662.
- Stoeckle, M. (2003). Taxonomy, DNA, and the Bar Code of Life. *BioScience*, 53:2.
- Stoeckle, M., Waggoner, P.E., Ausubel, J.H. (2005). Barcoding life, illustrated. Goals, rationale, results. [www.barcoding.si.edu](http://www.barcoding.si.edu). Consultado em 01/05/07.
- Swofford, D.L. (2002). PAUP\* - Phylogenetic analysis using parsimony (\*and other methods). Version 4.0b10. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates.
- Swofford, D.L., Olsen, G.J., Waddell, P.J., Hillis, D.M. (1996). Phylogenetic inference. IN: *Molecular Systematics*. Eds. Hillis, D.M, Moritz, C., Mable, B.K.. Massachusetts: Sinauer Associates, Inc. Pp. 407-514.
- Tautz, D., Arctander, P., Minelli, A., Thomas, R. H., Vogler, A. P. (2002). DNA points the way ahead in taxonomy. *Nature* 418: 479.
- Tautz, D., Arctander, P., Minelli, A., Thomas, R. H., Vogler, A. P. (2003). A plea for DNA taxonomy. *Trends Ecol Evol*, 18:70–74.
- Thompson, J.D., Gibson, T.J., Plewniak, F., Jeanmougin, F., Higgins, D.G. (1997). The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.*, 24: 4876-4882.
- Toffoli, Daniel et al. A test of the utility of DNA barcoding in the radiation of the freshwater stingray genus *Potamotrygon* (Potamotrygonidae, Myliobatiformes). *Genet. Mol. Biol.* [online]. 2008, vol.31, n.1, suppl., pp. 324-336. ISSN 1415-4757.
- Trajano, E. 1991. Populational ecology of *Pimelodella kronei*, troglobitic catfish from southeastern Brazil (Siluriformes, Pimelodidae). *Environ. Biol. Fish* 30:407–421.
- Valdez-Moreno, M., Ivanova, N.V., Elías-Gutiérrez, M., Contreras-Balderas, S. and Hebert, P.D.N (2009). Probing diversity in freshwater fishes from Mexico and Guatemala with DNA barcodes. *Journal of Fish Biology* 74, 377–402.
- Vari, R.P., Malabarba, L.R. (1998). Neotropical Ichthyology: an overview. IN: *Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes*. Eds. Malabarba, L.R., Reis, R.E., Vari, R.P., Lucena, Z.M.S., Lucena, C.A.S.. Porto Alegre: Edipucrs. Pp. 1-11.
- Vences, M., Thomas, M., Van der Meijden, A., Chiari, Y., Vieites, D. R. (2005b). Comparative performance of the 16S rRNA gene in DNA barcoding of amphibians. *Frontiers in Zoology*, 2: 1-12.
- Victor, B. C. (2007). *Coryphopterus kuna*, a new goby (Perciformes: Gobiidae: Gobiinae) from the western Caribbean, with the identification of the late larval stage and an estimate of the pelagic larval duration. *Zootaxa* 1526, 51–61.
- Vogler, A. P., Monaghan, M. T. (2007). Recent advances in DNA taxonomy. *J Zool Syst Evol Res*, 45(1):1-10.
- Ward, R. D., Hanner, R. & Hebert, P.D.N. (2009). REVIEW PAPER: The campaign to DNA barcode all fishes, FISH-BOL. *Journal of Fish Biology* (2009) 74, 329 a 356.

- Ward, R. D., Zemlak, T. S., Innes, B. H., Last, P. R., Hebert, P. D. N. (2005). DNA barcoding Australia's fish species. *Phil. Trans. R. Soc. B*, 359:1847-1857.
- Waugh, J. (2007). DNA barcoding in animal species: progress, potential and pitfalls. *BioEssays*, 29:188-197.
- Whitfield, J. (2003). DNA barcodes catalogue animals. *Nature*. News Service. Available on URL <http://www.nature.com/news/2003/030512/full/0305127.html>. Acessado em 01/05/2007.
- Wiemers, M., Fiedler, K. (2007). Does the DNA barcoding gap exist? – a case study in blue butterflies (Lepidoptera: Lycaenidae). *Frontiers in Zool.*, 4(8):1-16.
- Woese, C.R., Fox, G.E. (1977). Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 97: 8392–8396.
- Xia, X., Xie, Z. (2001). DAMBE: Data analysis in molecular biology and evolution. *J. Heredity*, 92: 371-373.
- Zhang, D.-X. & Hewitt, G. M. 1996 Nuclear integrations: challenges for mitochondrial DNA markers. *Trends Ecol. Evol.* 11, 247–251. (doi:10.1016/0169-5347(96)10031-8.)

**Apendice 1** – Dendrograma obtido por Neighbour-joining, pelo método Kimura-2-parâmetros, obtidos a partir de 400 sequências de espécimes coletados da bacia do Ribeira de Iguape.

### **BOLD TaxonID Tree**

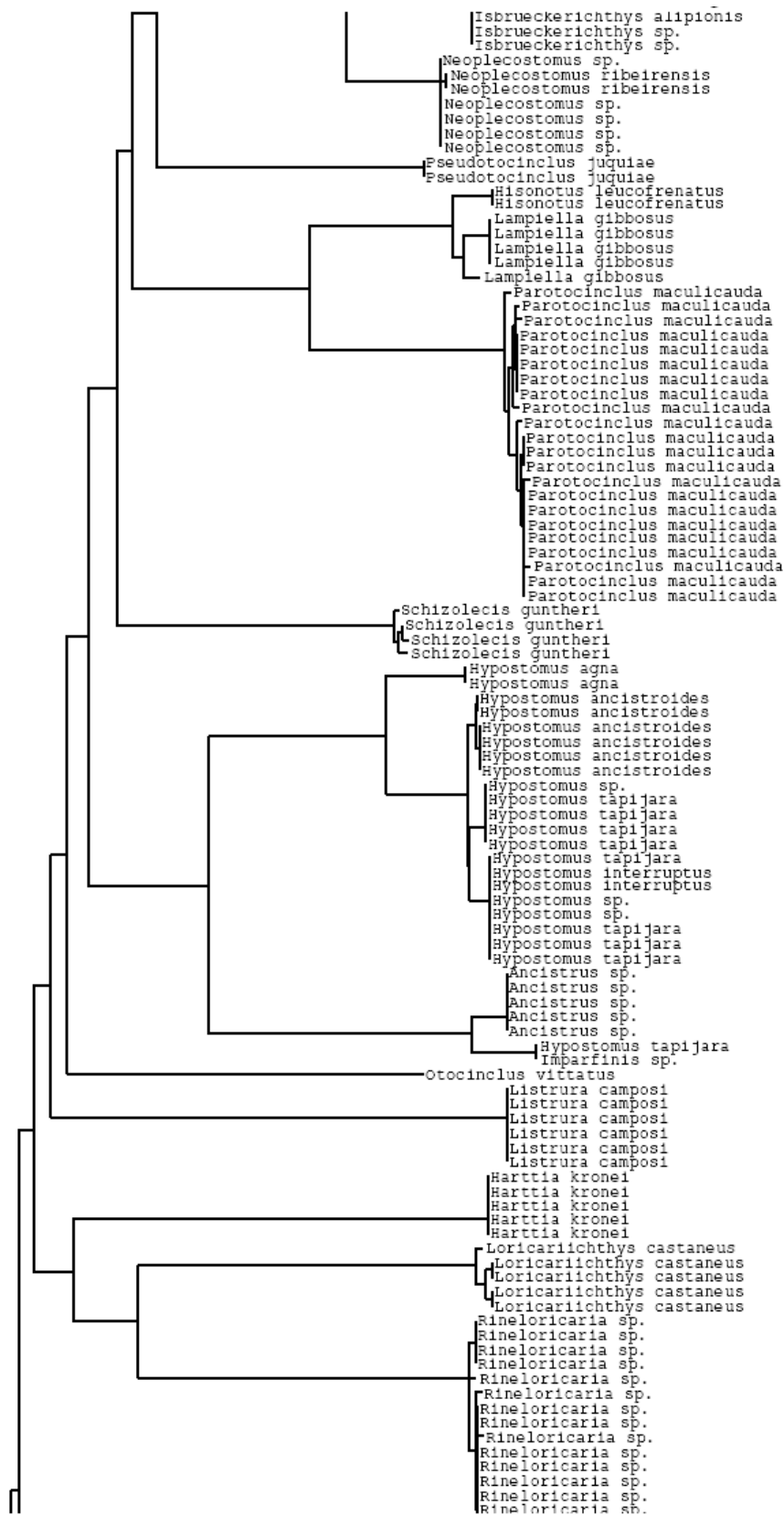
```
Project      : Fishes from Brazilian coastal rivers [FBCR]
Date        : 19-January-2010
Data Type   : Nucleotide
Distance Model : Kimura 2 Parameter
Codon Positions : 1st, 2nd, 3rd
Labels      :
Colorization :

Sequence Count : 400
Species count  : 68
Genus count    : 48
Family count   : 20
Unidentified   : 1
```

Continuação do apêndice 1.



Continuação do apêndice 1.



Continuação do apêndice 1.





## Apendice 2 –Detalhes das espécies e espécimes da Bacia do Ribeira de Iguape que foram utilizados nesta análise.

**Project:** Fishes from Brazilian coastal rivers

**User:** Jefferson M. Henriques

**Created :** 04-February-2010

Process ID	Sample ID	Field Num	Catalog Num	COI-5P Seq. Length	Collection Date	Identification
FBCR304-09	LBP-35471	LBP2008110602	35471	658	06-Nov-2008	Ancistrus sp.
FBCR303-09	LBP-35470	LBP2008110602	35470	658	06-Nov-2008	Ancistrus sp.
FBCR302-09	LBP-35469	LBP2008110602	35469	658	06-Nov-2008	Ancistrus sp.
FBCR301-09	LBP-35468	LBP2008110602	35468	658	06-Nov-2008	Ancistrus sp.
FBCR300-09	LBP-35467	LBP2008110602	35467	658	06-Nov-2008	Ancistrus sp.
FBCR501-09	LBP-35494	LBP2008111701	35494	656	17-Nov-2008	Astyanax ribeirae
FBCR500-09	LBP-35493	LBP2008111701	35493	635	17-Nov-2008	Astyanax ribeirae
FBCR493-09	LBP-36016	LBP2008111904	36016	656	19-Nov-2008	Astyanax ribeirae
FBCR491-09	LBP-36014	LBP2008111904	36014	656	19-Nov-2008	Astyanax ribeirae
FBCR490-09	LBP-36013	LBP2008111904	36013	656	19-Nov-2008	Astyanax ribeirae
FBCR483-09	LBP-35635	LBP2008111801	35635	656	18-Nov-2008	Astyanax ribeirae
FBCR475-09	LBP-35774	LBP2008111903	35774	628	19-Nov-2008	Astyanax ribeirae
FBCR474-09	LBP-35773	LBP2008111903	35773	627	19-Nov-2008	Astyanax ribeirae
FBCR127-09	LBP-18577	LBP2005072501	18577	658	25-Jul-2005	Astyanax ribeirae
FBCR498-09	LBP-35420	LBP2008110602	35420	625	06-Nov-2008	Astyanax sp.
FBCR497-09	LBP-35419	LBP2008110602	35419	656	06-Nov-2008	Astyanax sp.
FBCR496-09	LBP-35418	LBP2008110602	35418	656	06-Nov-2008	Astyanax sp.
FBCR495-09	LBP-35417	LBP2008110602	35417	626	06-Nov-2008	Astyanax sp.
FBCR128-09	LBP-18578	LBP2005072501	18578	658	25-Jul-2005	Astyanax sp.
FBCR176-09	LBP-35537	LBP2008111901	35537	658	19-Nov-2008	Callichthys callichthys
FBCR175-09	LBP-35759	LBP2008111901	35759	658	19-Nov-2008	Callichthys callichthys
FBCR459-09	LBP-35544	LBP2008111902	35587	656	19-Nov-2008	Centropomus sp.
FBCR458-09	LBP-35587	LBP2008111902	35586	656	19-Nov-2008	Centropomus sp.
FBCR457-09	LBP-35586	LBP2008111902	35546	656	19-Nov-2008	Centropomus sp.
FBCR456-09	LBP-35546	LBP2008111902	35545	656	19-Nov-2008	Centropomus sp.
FBCR455-09	LBP-35545	LBP2008111902	35544	656	19-Nov-2008	Centropomus sp.
FBCR168-09	LBP-35440	LBP2008110602	35440	695	06-Nov-2008	Cetopsorhamdia iheringi
FBCR163-09	LBP-17415	LBP2005030901	17415	664	09-Mar-2005	Cetopsorhamdia iheringi
FBCR125-09	LBP-35425	LBP2008110602	35425	656	06-Nov-2008	Characidium pterostictum
FBCR124-09	LBP-35424	LBP2008110602	35424	650	06-Nov-2008	Characidium pterostictum
FBCR123-09	LBP-7941	LBP1999082301	7941	658	23-Aug-1999	Characidium pterostictum
FBCR122-09	LBP-7918b	LBP1999082301	7918	658	23-Aug-1999	Characidium pterostictum
FBCR121-09	LBP-8585	LBP1999082301	8585	658	23-Aug-1999	Characidium pterostictum
FBCR415-09	LBP-18820	LBP2005072701	18820	658	27-Jul-2005	Cichlasoma sp.
FBCR508-09	LBP-35385	LBP2008111702	35385	656	17-Nov-2008	Corydoras nattereri
FBCR505-09	LBP-35382	LBP2008111702	35382	656	17-Nov-2008	Corydoras nattereri
FBCR503-09	LBP-11110	LBP2002081401	11110	656	14-Aug-2002	Corydoras nattereri
FBCR502-09	LBP-11109	LBP2002081401	11109	656	14-Aug-2002	Corydoras nattereri
FBCR414-09	LBP-33122	LBP2008090201	33122	658	02-Sep-2008	Crenicichla iguapina
FBCR413-09	LBP-33121	LBP2008090201	33121	658	02-Sep-2008	Crenicichla iguapina
FBCR412-09	LBP-33120	LBP2008090201	33120	648	02-Sep-2008	Crenicichla iguapina
FBCR411-09	LBP-33119	LBP2008090201	33119	658	02-Sep-2008	Crenicichla iguapina
FBCR410-09	LBP-35698	LBP2008111804	36698	658	18-Nov-2008	Crenicichla sp.
FBCR409-09	LBP-35697	LBP2008111804	35697	658	18-Nov-2008	Crenicichla sp.
FBCR408-09	LBP-11179	LBP2002140802	11179	658	14-Aug-2002	Crenicichla sp.



## Continuação do Apêndice 2.

FBCR130-09	LBP-18580	LBP2005072501	18580	658	25-Jul-2005	Deuterodon iguape
FBCR129-09	LBP-18579	LBP2005072501	18579	658	25-Jul-2005	Deuterodon iguape
FBCR364-09	LBP-35581	LBP2008111902	35581	658	20-Nov-2008	Genidens barbuis
FBCR363-09	LBP-35562	LBP2008111902	35562	658	19-Nov-2008	Genidens barbuis
FBCR421-09	LBP-35800	LBP2008111903	35800	656	19-Nov-2008	Geophagus iporangensis
FBCR420-09	LBP-35799	LBP2008111903	35799	658	19-Nov-2008	Geophagus iporangensis
FBCR419-09	LBP-35400	LBP2008111702	35400	658	17-Nov-2008	Geophagus iporangensis
FBCR418-09	LBP-35399	LBP2008111702	35399	658	17-Nov-2008	Geophagus iporangensis
FBCR417-09	LBP-35398	LBP2008111702	35398	658	17-Nov-2008	Geophagus iporangensis
FBCR416-09	LBP-35397	LBP2008111702	35397	658	17-Nov-2008	Geophagus iporangensis
FBCR406-09	LBP-36046	LBP2008112002	36046	658	20-Nov-2008	Geophagus iporangensis
FBCR405-09	LBP-36045	LBP2008112002	36045	658	20-Nov-2008	Geophagus iporangensis
FBCR404-09	LBP-36044	LBP2008112002	36044	658	20-Nov-2008	Geophagus iporangensis
FBCR403-09	LBP-36043	LBP2008112002	36043	658	20-Nov-2008	Geophagus iporangensis
FBCR402-09	LBP-35573	LBP2008111902	35573	658	19-Nov-2008	Geophagus iporangensis
FBCR401-09	LBP-35536	LBP 2008111802	35536	658	18-Nov-2008	Geophagus iporangensis
FBCR400-09	LBP-35746	LBP2008111804	35746	658	18-Nov-2008	Geophagus iporangensis
FBCR399-09	LBP-35745	LBP2008111804	35745	658	18-Nov-2008	Geophagus iporangensis
FBCR398-09	LBP-35744	LBP2008111804	35744	658	18-Nov-2008	Geophagus iporangensis
FBCR397-09	LBP-35743	LBP2008111804	35743	650	18-Nov-2008	Geophagus iporangensis
FBCR396-09	LBP-35742	LBP2008111804	35742	658	18-Nov-2008	Geophagus iporangensis
FBCR395-09	LBP-35684	LBP2008111801	35684	658	18-Nov-2008	Geophagus iporangensis
FBCR394-09	LBP-35683	LBP2008111801	35683	658	18-Nov-2008	Geophagus iporangensis
FBCR393-09	LBP-35658	LBP2008111801	35658	658	18-Nov-2008	Geophagus iporangensis
FBCR392-09	LBP-11213	LBP2002140804	11213	658	14-Aug-2002	Geophagus iporangensis
FBCR391-09	LBP-11212	LBP2002140804	11212	658	14-Aug-2002	Geophagus iporangensis
FBCR389-09	LBP-11191	LBP2002140803	11191	658	14-Aug-2002	Geophagus iporangensis
FBCR388-09	LBP-11159	LBP2002140802	11159	658	14-Aug-2002	Geophagus iporangensis
FBCR387-09	LBP-7063	LBP1999110801	7063	658	08-Nov-1999	Geophagus iporangensis
FBCR539-09	LBP-35535	LBP2008111801	35535	656	18-Nov-2008	Glanidium
FBCR357-09	LBP-35580	LBP2008111902	35580	658	19-Nov-2008	Glanidium melanopterus
FBCR355-09	LBP-35534	LBP 2008111802	35534	608	18-Nov-2008	Glanidium melanopterus
FBCR354-09	LBP-35533	LBP 2008111802	35533	658	18-Nov-2008	Glanidium melanopterus
FBCR428-09	LBP-36099	LBP2008111903	36099	656	19-Nov-2008	Gobio sp.
FBCR427-09	LBP-36100	LBP2008111903	36100	656	19-Nov-2008	Gobio sp.
FBCR426-09	LBP-36003	LBP2008111903	36003	656	19-Nov-2008	Gobio sp.
FBCR424-09	LBP-36001	LBP2008111903	36001	656	19-Nov-2008	Gobio sp.
FBCR381-09	LBP-33117	LBP2008090201	33117	658	02-Sep-2008	Gymnotus carapo
FBCR380-09	LBP-33116	LBP2008090201	33116	658	02-Sep-2008	Gymnotus carapo
FBCR379-09	LBP-36020	LBP2008111904	36020	658	19-Nov-2008	Gymnotus carapo
FBCR378-09	LBP-35632	LBP2008111702	35632	658	17-Nov-2008	Gymnotus carapo
FBCR386-09	LBP-36023	LBP2008111904	36023	658	19-Nov-2008	Gymnotus inaequilabiatus
FBCR385-09	LBP-36022	LBP2008111904	36022	658	19-Nov-2008	Gymnotus inaequilabiatus
FBCR377-09	LBP-36074	LBP2008112002	36074	658	20-Nov-2008	Gymnotus pantherinus
FBCR375-09	LBP-35764	LBP2008111901	35764	658	19-Nov-2008	Gymnotus pantherinus
FBCR374-09	LBP-35763	LBP2008111901	35763	658	19-Nov-2008	Gymnotus pantherinus
FBCR373-09	LBP-35762	LBP2008111901	35762	658	19-Nov-2008	Gymnotus pantherinus
FBCR372-09	LBP-35761	LBP2008111901	35761	658	19-Nov-2008	Gymnotus pantherinus
FBCR371-09	LBP-35760	LBP2008111901	35760	658	19-Nov-2008	Gymnotus pantherinus
FBCR370-09	LBP-7060	LBP1999110801	7060	644	08-Nov-1999	Gymnotus pantherinus

## Continuação do Apêndice 2.

FBCR366-09	LBP-7053	LBP1999110801	7053	658	08-Nov-1999	Gymnotus pantherinus
FBCR365-09	LBP-7052	LBP1999110801	7052	658	08-Nov-1999	Gymnotus pantherinus
FBCR384-09	LBP-36021	LBP2008111904	36021	658	19-Nov-2008	Gymnotus sylvius
FBCR383-09	LBP-35526	LBP2008111702	35526	658	17-Nov-2008	Gymnotus sylvius
FBCR531-09	LBP-35454	LBP2008110602	35454	658	06-Nov-2008	Harttia kronei
FBCR530-09	LBP-35453	LBP2008110602	35453	658	06-Nov-2008	Harttia kronei
FBCR529-09	LBP-35452	LBP2008110602	35452	658	06-Nov-2008	Harttia kronei
FBCR528-09	LBP-35451	LBP2008110602	35451	658	06-Nov-2008	Harttia kronei
FBCR527-09	LBP-35450	LBP2008110602	35450	658	06-Nov-2008	Harttia kronei
FBCR293-09	LBP-35656b	LBP2008111801	35656	658	18-Nov-2008	Hisonotus leucofrenatus
FBCR292-09	LBP-35655b	LBP2008111801	35655	658	18-Nov-2008	Hisonotus leucofrenatus
FBCR015-09	LBP-33038	LBP2008090301	33038	658	03-Sep-2008	Hollandichthys multifasciatus
FBCR014-09	LBP-33037	LBP2008090301	33037	658	03-Sep-2008	Hollandichthys multifasciatus
FBCR013-09	LBP-33036	LBP2008090301	33036	658	03-Sep-2008	Hollandichthys multifasciatus
FBCR011-09	LBP-33034	LBP2008090301	33034	658	03-Sep-2008	Hollandichthys multifasciatus
FBCR097-09	LBP-33132	LBP2008090201	33132	688	02-Sep-2008	Hoplias malabaricus
FBCR096-09	LBP-33131	LBP2008090201	33131	687	02-Sep-2008	Hoplias malabaricus
FBCR095-09	LBP-33130	LBP2008090201	33130	691	02-Sep-2008	Hoplias malabaricus
FBCR094-09	LBP-33129	LBP2008090201	33129	687	02-Sep-2008	Hoplias malabaricus
FBCR093-09	LBP-33128	LBP2008090201	33128	690	02-Sep-2008	Hoplias malabaricus
FBCR183-09	LBP-35532	2008111802	35532	641	18-Nov-2008	Hoplosternum littorale
FBCR533-09	LBP-35567	LBP2008111902	35567	658	19-Nov-2008	Hypostomus agna
FBCR532-09	LBP-35527	LBP 2008111802	35527	656	18-Nov-2008	Hypostomus agna
FBCR326-09	LBP-34912	LBP2008112003	34912	658	20-Nov-2008	Hypostomus ancistroides
FBCR325-09	LBP-34911	LBP2008112003	34911	658	20-Nov-2008	Hypostomus ancistroides
FBCR324-09	LBP-34910	LBP2008112003	34910	658	20-Nov-2008	Hypostomus ancistroides
FBCR323-09	LBP-34909	LBP2008112003	34909	658	20-Nov-2008	Hypostomus ancistroides
FBCR322-09	LBP-34908	LBP2008112003	34908	658	20-Nov-2008	Hypostomus ancistroides
FBCR321-09	LBP-34907	LBP2008112003	34907	658	20-Nov-2008	Hypostomus ancistroides
FBCR329-09	LBP-34915	LBP2007071601	34915	658	16-Jul-2007	Hypostomus interruptus
FBCR327-09	LBP-34913	LBP2007071601	34913	658	16-Jul-2007	Hypostomus interruptus
FBCR307-09	LBP-35650	LBP2008111801	35650	658	18-Nov-2008	Hypostomus sp.
FBCR306-09	LBP-35649	LBP2008111801	35649	658	18-Nov-2008	Hypostomus sp.
FBCR305-09	LBP-35648	LBP2008111801	35648	658	18-Nov-2008	Hypostomus sp.
FBCR320-09	LBP-35570	LBP2008111902	35570	658	19-Nov-2008	Hypostomus tapijara
FBCR319-09	LBP-35569	LBP2008111902	35569	658	19-Nov-2008	Hypostomus tapijara
FBCR318-09	LBP-35568	LBP2008111902	35568	658	19-Nov-2008	Hypostomus tapijara
FBCR316-09	LBP-35528	LBP 2008111802	35528	658	18-Nov-2008	Hypostomus tapijara
FBCR315-09	LBP-35730	LBP2008111804	35730	368	18-Nov-2008	Hypostomus tapijara
FBCR314-09	LBP-35729	LBP2008111804	35729	663	18-Nov-2008	Hypostomus tapijara
FBCR313-09	LBP-35728	LBP2008111804	35728	658	18-Nov-2008	Hypostomus tapijara
FBCR312-09	LBP-35727	LBP2008111804	35727	658	18-Nov-2008	Hypostomus tapijara
FBCR311-09	LBP-35726	LBP2008111804	35726	642	18-Nov-2008	Hypostomus tapijara
FBCR167-09	LBP-35738	LBP2008111804	35738	658	18-Nov-2008	Imparfinis sp.
FBCR166-09	LBP-35737	LBP2008111804	35737	658	18-Nov-2008	Imparfinis sp.
FBCR165-09	LBP-35736	LBP2008111804	35736	658	18-Nov-2008	Imparfinis sp.
FBCR164-09	LBP-18602	LBP2005072501	18602	658	25-Jul-2005	Imparfinis sp.
FBCR162-09	LBP-17414	LBP2005030901	17414	663	09-Mar-2005	Imparfinis sp.
FBCR161-09	LBP-11162	LBP2002140802	11162	658	14-Aug-2002	Imparfinis sp.

## Continuação do Apêndice 2.

FBCR243-09	LBP-35449	LBP2008110602	35449	658	06-Nov-2008	Isbrueckerichthys alipionis
FBCR242-09	LBP-35448	LBP2008110602	35448	658	06-Nov-2008	Isbrueckerichthys alipionis
FBCR241-09	LBP-35447	LBP2008110602	35447	658	06-Nov-2008	Isbrueckerichthys alipionis
FBCR240-09	LBP-35446	LBP2008110602	35446	658	06-Nov-2008	Isbrueckerichthys alipionis
FBCR253-09	LBP-17403	LBP2005031001	17403	658	10-Mar-2005	Isbrueckerichthys duseni
FBCR252-09	LBP-17402	LBP2005031001	17402	658	10-Mar-2005	Isbrueckerichthys duseni
FBCR251-09	LBP-17401	LBP2005031001	17401	646	10-Mar-2005	Isbrueckerichthys duseni
FBCR250-09	LBP-17400	LBP2005031001	17400	658	10-Mar-2005	Isbrueckerichthys duseni
FBCR526-09	LBP-35485	LBP2008111701	35485	657	17-Nov-2008	Isbrueckerichthys epakmos
FBCR525-09	LBP-35484	LBP2008111701	35484	658	17-Nov-2008	Isbrueckerichthys epakmos
FBCR524-09	LBP-35483	LBP2008111701	35483	658	17-Nov-2008	Isbrueckerichthys epakmos
FBCR523-09	LBP-33012	LBP2008090302	33012	658	03-Sep-2008	Isbrueckerichthys epakmos
FBCR522-09	LBP-33010	LBP2008090302	33010	658	03-Sep-2008	Isbrueckerichthys epakmos
FBCR521-09	LBP-33009	LBP2008090302	33009	0	03-Sep-2008	Isbrueckerichthys epakmos
FBCR249-09	LBP-34851	LBP2008110602	34851	658	06-Nov-2008	Isbrueckerichthys sp.
FBCR248-09	LBP-34850	LBP2008110602	34850	658	06-Nov-2008	Isbrueckerichthys sp.
FBCR247-09	LBP-34849	LBP2008110602	34849	648	06-Nov-2008	Isbrueckerichthys sp.
FBCR246-09	LBP-34848	LBP2008110602	34848	658	06-Nov-2008	Isbrueckerichthys sp.
FBCR245-09	LBP-34847	LBP2008110602	34847	0	06-Nov-2008	Isbrueckerichthys sp.
FBCR347-09	LBP-35682	LBP2008111801	35682	658	18-Nov-2008	Ituglanis proops
FBCR346-09	LBP-35681	LBP2008111801	35681	658	18-Nov-2008	Ituglanis proops
FBCR345-09	LBP-35680	LBP2008111801	35680	658	18-Nov-2008	Ituglanis proops
FBCR344-09	LBP-35679	LBP2008111801	35679	658	18-Nov-2008	Ituglanis proops
FBCR343-09	LBP-35678	LBP2008111801	35678	658	18-Nov-2008	Ituglanis proops
FBCR340-09	LBP-18600	LBP2005072501	18600	658	25-Jul-2005	Ituglanis proops
FBCR239-09	LBP-35466	LBP2008110602	35466	658	06-Nov-2008	Kronichthys sp.
FBCR238-09	LBP-35465	LBP2008110602	35465	520	06-Nov-2008	Kronichthys sp.
FBCR237-09	LBP-35464	LBP2008110602	35464	658	06-Nov-2008	Kronichthys sp.
FBCR236-09	LBP-35463	LBP2008110602	35463	658	06-Nov-2008	Kronichthys sp.
FBCR235-09	LBP-35462	LBP2008110602	35462	658	06-Nov-2008	Kronichthys sp.
FBCR234-09	LBP-18607	LBP2005072502	18607	658	25-Jul-2005	Kronichthys sp.
FBCR233-09	LBP-18605	LBP2005072502	18605	658	25-Jul-2005	Kronichthys sp.
FBCR232-09	LBP-18604	LBP2005072502	18604	658	25-Jul-2005	Kronichthys sp.
FBCR231-09	LBP-18603	LBP2005072502	18603	658	25-Jul-2005	Kronichthys sp.
FBCR230-09	LBP-17425	LBP2005030901	17425	658	09-Mar-2005	Kronichthys sp.
FBCR229-09	LBP-17424	LBP2005030901	17424	658	09-Mar-2005	Kronichthys sp.
FBCR228-09	LBP-17423	LBP2005030901	17423	658	09-Mar-2005	Kronichthys sp.
FBCR227-09	LBP-17422	LBP2005030901	17422	658	09-Mar-2005	Kronichthys sp.
FBCR226-09	LBP-17421	LBP2005030901	17421	658	09-Mar-2005	Kronichthys sp.
FBCR535-09	LBP-6338	LBP1999082301	6338	658	23-Aug-1999	Kronichthys subteres
FBCR225-09	LBP-6339	LBP1999082301	6339	658	23-Aug-1999	Kronichthys subteres
FBCR224-09	LBP-6325	LBP1999082301	6325	658	23-Aug-1999	Kronichthys subteres
FBCR223-09	LBP-6350	LBP1999082301	6350	658	23-Aug-1999	Kronichthys subteres
FBCR222-09	LBP-6337	LBP1999082301	6337	658	23-Aug-1999	Kronichthys subteres
FBCR221-09	LBP-6331	LBP1999082301	6331	658	23-Aug-1999	Kronichthys subteres
FBCR288-09	LBP-35735	LBP2008111804	35735	658	18-Nov-2008	Lampiella gibbosus
FBCR287-09	LBP-35734	LBP2008111804	35734	657	18-Nov-2008	Lampiella gibbosus
FBCR286-09	LBP-35733	LBP2008111804	35733	658	18-Nov-2008	Lampiella gibbosus
FBCR284-09	LBP-35731	LBP2008111804	35731	658	18-Nov-2008	Lampiella gibbosus

## Continuação do Apêndice 2.

FBCR454-09	LBP-35337	LBP2008112001	35337	656	20-Nov-2008	Leptolebias aureoguttatus
FBCR453-09	LBP-35336	LBP2008112001	35336	656	20-Nov-2008	Leptolebias aureoguttatus
FBCR452-09	LBP-35335	LBP2008112001	35335	656	20-Nov-2008	Leptolebias aureoguttatus
FBCR451-09	LBP-35334	LBP2008112001	35334	637	20-Nov-2008	Leptolebias aureoguttatus
FBCR450-09	LBP-35333	LBP2008112001	35333	656	20-Nov-2008	Leptolebias aureoguttatus
FBCR353-09	LBP-35370	LBP2008111901	35370	658	19-Nov-2008	Listrura camposi
FBCR352-09	LBP-35363	LBP2008111901	35363	658	19-Nov-2008	Listrura camposi
FBCR351-09	LBP-35362	LBP2008111901	35362	658	19-Nov-2008	Listrura camposi
FBCR350-09	LBP-35361	LBP2008111901	35361	658	19-Nov-2008	Listrura camposi
FBCR349-09	LBP-35360	LBP2008111901	35360	658	19-Nov-2008	Listrura camposi
FBCR348-09	LBP-35359	LBP2008111901	35359	658	19-Nov-2008	Listrura camposi
FBCR220-09	LBP-35551	LBP2008111902	35551	658	19-Nov-2008	Loricariichthys castaneus
FBCR219-09	LBP-35550	LBP2008111902	35550	658	19-Nov-2008	Loricariichthys castaneus
FBCR218-09	LBP-35549	LBP2008111902	35549	658	19-Nov-2008	Loricariichthys castaneus
FBCR217-09	LBP-35548	LBP2008111902	35548	658	19-Nov-2008	Loricariichthys castaneus
FBCR216-09	LBP-35547	LBP2008111902	35547	658	19-Nov-2008	Loricariichthys castaneus
FBCR464-09	LBP-35542	LBP2008111902	35542	655	19-Nov-2008	Lycengraulis sp.
FBCR463-09	LBP-35541	LBP2008111902	35541	655	19-Nov-2008	Lycengraulis sp.
FBCR462-09	LBP-35540	LBP2008111902	35540	658	19-Nov-2008	Lycengraulis sp.
FBCR461-09	LBP-35539	LBP2008111902	35539	658	19-Nov-2008	Lycengraulis sp.
FBCR460-09	LBP-35538	LBP2008111902	35538	658	19-Nov-2008	Lycengraulis sp.
FBCR335-09	LBP-35719	LBP2008111804	35719	658	18-Nov-2008	Microglanis cottoides
FBCR334-09	LBP-35390	LBP2008111702	35390	658	17-Nov-2008	Microglanis cottoides
FBCR333-09	LBP-35389	LBP2008111702	35389	658	17-Nov-2008	Microglanis cottoides
FBCR331-09	LBP-35387	LBP2008111702	35387	658	17-Nov-2008	Microglanis cottoides
FBCR330-09	LBP-35386	LBP2008111702	35386	658	17-Nov-2008	Microglanis cottoides
FBCR025-09	LBP-33452	LBP2008090301	33452	685	03-Sep-2008	Mimagoniates lateralis
FBCR024-09	LBP-33451	LBP2008090301	33451	686	03-Sep-2008	Mimagoniates lateralis
FBCR023-09	LBP-33450	LBP2008090301	33450	685	03-Sep-2008	Mimagoniates lateralis
FBCR022-09	LBP-33449	LBP2008090301	33449	687	03-Sep-2008	Mimagoniates lateralis
FBCR021-09	LBP-33448	LBP2008090301	33448	689	03-Sep-2008	Mimagoniates lateralis
FBCR471-09	LBP-35691	LBP2008111804	35691	656	18-Nov-2008	Mimagoniates microlepis
FBCR469-09	LBP-35689	LBP2008111804	35689	656	18-Nov-2008	Mimagoniates microlepis
FBCR468-09	LBP-35688	LBP2008111804	35688	656	18-Nov-2008	Mimagoniates microlepis
FBCR467-09	LBP-35687	LBP2008111804	35687	656	18-Nov-2008	Mimagoniates microlepis
FBCR466-09	LBP-33073	LBP2008090201	33073	656	02-Sep-2008	Mimagoniates microlepis
FBCR465-09	LBP-33072	LBP2008090201	33072	656	02-Sep-2008	Mimagoniates microlepis
FBCR020-09	LBP-33043	LBP2008090301	33043	658	03-Sep-2008	Mimagoniates microlepis
FBCR019-09	LBP-33042	LBP2008090301	33042	658	03-Sep-2008	Mimagoniates microlepis
FBCR018-09	LBP-33041	LBP2008090301	33041	658	03-Sep-2008	Mimagoniates microlepis
FBCR017-09	LBP-33040	LBP2008090301	33040	658	03-Sep-2008	Mimagoniates microlepis
FBCR016-09	LBP-33039	LBP2008090301	33039	640	03-Sep-2008	Mimagoniates microlepis
FBCR255-09	LBP-9735	PNXMZ2000051104	9735	647	11-May-2000	Neoplecostomus ribeirensis
FBCR254-09	LBP-9734	PNXMZ2000051104	9734	646	11-May-2000	Neoplecostomus ribeirensis
FBCR260-09	LBP-34841	LBP2008111701	34841	658	17-Nov-2008	Neoplecostomus sp.
FBCR259-09	LBP-34840	LBP2008111701	34840	658	17-Nov-2008	Neoplecostomus sp.
FBCR258-09	LBP-34839	LBP2008111701	34839	644	17-Nov-2008	Neoplecostomus sp.
FBCR257-09	LBP-34838	LBP2008111701	34838	658	17-Nov-2008	Neoplecostomus sp.
FBCR256-09	LBP-34837	LBP2008111701	34837	658	17-Nov-2008	Neoplecostomus sp.
FBCR289-09	LBP-35380	LBP2008111702	35380	659	17-Nov-2008	Otocinclus vittatus
FBCR291-09	LBP-35654b	LBP2008111801	35654	655	18-Nov-2008	Parotocinclus maculicauda

## Continuação do Apêndice 2.

FBCR280-09	LBP-35703	LBP2008111804	35703	658	18-Nov-2008	Parotocinclus maculicauda
FBCR279-09	LBP-35702	LBP2008111804	35702	658	18-Nov-2008	Parotocinclus maculicauda
FBCR278-09	LBP-35701	LBP2008111804	35701	658	18-Nov-2008	Parotocinclus maculicauda
FBCR277-09	LBP-35700	LBP2008111804	35700	658	18-Nov-2008	Parotocinclus maculicauda
FBCR276-09	LBP-35699	LBP2008111804	35699	658	18-Nov-2008	Parotocinclus maculicauda
FBCR275-09	LBP-35677	LBP2008111801	35677	658	18-Nov-2008	Parotocinclus maculicauda
FBCR274-09	LBP-35676	LBP2008111801	35676	658	18-Nov-2008	Parotocinclus maculicauda
FBCR273-09	LBP-35675	LBP2008111801	35675	658	18-Nov-2008	Parotocinclus maculicauda
FBCR272-09	LBP-35674	LBP2008111801	35674	658	18-Nov-2008	Parotocinclus maculicauda
FBCR271-09	LBP-35673	LBP2008111801	35673	658	18-Nov-2008	Parotocinclus maculicauda
FBCR270-09	LBP-35672	LBP2008111801	35672	523	18-Nov-2008	Parotocinclus maculicauda
FBCR269-09	LBP-35430	LBP2008110602	35430	658	06-Nov-2008	Parotocinclus maculicauda
FBCR268-09	LBP-35429	LBP2008110602	35429	658	06-Nov-2008	Parotocinclus maculicauda
FBCR267-09	LBP-35428	LBP2008110602	35428	658	06-Nov-2008	Parotocinclus maculicauda
FBCR266-09	LBP-35427	LBP2008110602	35427	658	06-Nov-2008	Parotocinclus maculicauda
FBCR265-09	LBP-35426	LBP2008110602	35426	658	06-Nov-2008	Parotocinclus maculicauda
FBCR264-09	LBP-11173	LBP2002140802	11173	658	14-Aug-2002	Parotocinclus maculicauda
FBCR263-09	LBP-11172	LBP2002140802	11172	658	14-Aug-2002	Parotocinclus maculicauda
FBCR262-09	LBP-11171	LBP2002140802	11171	658	14-Aug-2002	Parotocinclus maculicauda
FBCR261-09	LBP-11170	LBP2002140802	11170	658	14-Aug-2002	Parotocinclus maculicauda
FBCR437-09	LBP-35660	LBP2008111801	35660	656	18-Nov-2008	Phalloceros caudimaculatus
FBCR436-09	LBP-35659	LBP2008111801	35659	656	18-Nov-2008	Phalloceros caudimaculatus
FBCR435-09	LBP-35434	LBP2008110602	35434	656	06-Nov-2008	Phalloceros caudimaculatus
FBCR434-09	LBP-35433	LBP2008110602	35433	656	06-Nov-2008	Phalloceros caudimaculatus
FBCR433-09	LBP-35432	LBP2008110602	35432	656	06-Nov-2008	Phalloceros caudimaculatus
FBCR432-09	LBP-35431	LBP2008110602	35431	639	06-Nov-2008	Phalloceros caudimaculatus
FBCR444-09	LBP-36079	LBP2008112002	36079	656	20-Nov-2008	Phalloceros reisi
FBCR443-09	LBP-36078	LBP2008112002	36078	656	20-Nov-2008	Phalloceros reisi
FBCR442-09	LBP-36077	LBP2008112002	36077	656	20-Nov-2008	Phalloceros reisi
FBCR441-09	LBP-36076	LBP2008112002	36076	656	20-Nov-2008	Phalloceros reisi
FBCR440-09	LBP-36075	LBP2008112002	36075	656	20-Nov-2008	Phalloceros reisi
FBCR439-09	LBP-35765	LBP2008111901	35765	656	19-Nov-2008	Phalloceros reisi
FBCR438-09	LBP-35747	LBP2008111804	35747	656	18-Nov-2008	Phalloceros reisi
FBCR544-10	LBP-34921		34921	685		Pimelodella kronei
FBCR543-10	LBP-34920		34920	683		Pimelodella kronei
FBCR542-10	LBP-34919		34919	679		Pimelodella kronei
FBCR541-10	LBP-34918		34918	686		Pimelodella kronei
FBCR540-10	LBP-34917		34917	678		Pimelodella kronei
FBCR520-09	LBP-34916		34916	656		Pimelodella kronei
FBCR174-09	LBP-33104	LBP2008090201	33104	658	02-Sep-2008	Pimelodella transitoria
FBCR173-09	LBP-33103	LBP2008090201	33103	658	02-Sep-2008	Pimelodella transitoria
FBCR172-09	LBP-33102	LBP2008090201	33102	658	02-Sep-2008	Pimelodella transitoria
FBCR171-09	LBP-33101	LBP2008090201	33101	658	02-Sep-2008	Pimelodella transitoria
FBCR170-09	LBP-33100	LBP2008090201	33100	658	02-Sep-2008	Pimelodella transitoria

## Continuação do Apêndice 2.

FBCR360-09	LBP-35554	LBP2008111902	35554	658	19-Nov-2008	<i>Pimelodus maculatus</i>
FBCR359-09	LBP-35553	LBP2008111902	35553	658	19-Nov-2008	<i>Pimelodus maculatus</i>
FBCR358-09	LBP-35552	LBP2008111902	35552	658	19-Nov-2008	<i>Pimelodus maculatus</i>
FBCR159-09	LBP-35556	LBP2008111902	35556	672	19-Nov-2008	<i>Pimelodus maculatus</i>
FBCR131-09	LBP-35585	LBP2008111902	35585	658	19-Nov-2008	<i>Prochilodus lineatus</i>
FBCR282-09	LBP-8763	LBP1999081101	8763	656	08-Nov-1999	<i>Pseudotocinclus juquiai</i>
FBCR281-09	LBP-7564	LBP1999081101	7564	658	08-Nov-1999	<i>Pseudotocinclus juquiai</i>
FBCR005-09	LBP-38405	LBP 2009052705	38405	658	27-May-2009	<i>Rachoviscus crassiceps</i>
FBCR004-09	LBP-38404	LBP 2009052705	38404	658	27-May-2009	<i>Rachoviscus crassiceps</i>
FBCR003-09	LBP-38403	LBP 2009052705	38403	650	27-May-2009	<i>Rachoviscus crassiceps</i>
FBCR002-09	LBP-38402	LBP 2009052705	38402	658	27-May-2009	<i>Rachoviscus crassiceps</i>
FBCR001-09	LBP-38401	LBP 2009052705	38401	658	27-May-2009	<i>Rachoviscus crassiceps</i>
FBCR158-09	LBP-35582	LBP2008111902	35582	658	19-Nov-2008	<i>Rhamdia quelen</i>
FBCR157-09	LBP-35588	LBP2008111902	35588	658	19-Nov-2008	<i>Rhamdia quelen</i>
FBCR156-09	LBP-35531	LBP 2008111802	35531	658	18-Nov-2008	<i>Rhamdia quelen</i>
FBCR155-09	LBP-35504	LBP2008111904	35504	658	19-Nov-2008	<i>Rhamdia quelen</i>
FBCR153-09	LBP-35797	LBP2008111903	35797	658	19-Nov-2008	<i>Rhamdia quelen</i>
FBCR152-09	LBP-35739	LBP2008111804	35739	658	18-Nov-2008	<i>Rhamdia quelen</i>
FBCR151-09	LBP-35502	LBP2008111801	35502	658	18-Nov-2008	<i>Rhamdia quelen</i>
FBCR150-09	LBP-35501	LBP2008111801	35501	658	18-Nov-2008	<i>Rhamdia quelen</i>
FBCR149-09	LBP-35395	LBP2008111702	35395	658	17-Nov-2008	<i>Rhamdia quelen</i>
FBCR148-09	LBP-35394	LBP2008111702	35394	658	17-Nov-2008	<i>Rhamdia quelen</i>
FBCR147-09	LBP-35393	LBP2008111702	35393	658	17-Nov-2008	<i>Rhamdia quelen</i>
FBCR146-09	LBP-35392	LBP2008111702	35392	658	17-Nov-2008	<i>Rhamdia quelen</i>
FBCR145-09	LBP-35391	LBP2008111702	35391	658	17-Nov-2008	<i>Rhamdia quelen</i>
FBCR144-09	LBP-35461	LBP2008110602	35461	658	06-Nov-2008	<i>Rhamdia quelen</i>
FBCR143-09	LBP-35460	LBP2008110602	35460	658	06-Nov-2008	<i>Rhamdia quelen</i>
FBCR534-09	LBP-35584	LBP2008111902	35584	658	19-Nov-2008	<i>Rineloricaria sp.</i>
FBCR215-09	LBP-35583	LBP2008111902	35583	658	19-Nov-2008	<i>Rineloricaria sp.</i>
FBCR214-09	LBP-33087	LBP2008090201	33087	658	02-Sep-2008	<i>Rineloricaria sp.</i>
FBCR213-09	LBP-33086	LBP2008090201	33086	658	02-Sep-2008	<i>Rineloricaria sp.</i>
FBCR212-09	LBP-33085	LBP2008090201	33085	658	02-Sep-2008	<i>Rineloricaria sp.</i>
FBCR211-09	LBP-33084	LBP2008090201	33084	641	02-Sep-2008	<i>Rineloricaria sp.</i>
FBCR210-09	LBP-33083	LBP2008090201	33083	658	02-Sep-2008	<i>Rineloricaria sp.</i>
FBCR209-09	LBP-35713	LBP2008111804	35713	658	18-Nov-2008	<i>Rineloricaria sp.</i>
FBCR208-09	LBP-35712	LBP2008111804	35712	658	18-Nov-2008	<i>Rineloricaria sp.</i>
FBCR207-09	LBP-35711	LBP2008111804	35711	658	18-Nov-2008	<i>Rineloricaria sp.</i>
FBCR206-09	LBP-35710	LBP2008111804	35710	658	18-Nov-2008	<i>Rineloricaria sp.</i>
FBCR205-09	LBP-35709	LBP2008111804	35709	658	18-Nov-2008	<i>Rineloricaria sp.</i>
FBCR204-09	LBP-35708	LBP2008111804	35708	658	18-Nov-2008	<i>Rineloricaria sp.</i>
FBCR203-09	LBP-35707	LBP2008111804	35707	658	18-Nov-2008	<i>Rineloricaria sp.</i>
FBCR202-09	LBP-35706	LBP2008111804	35706	658	18-Nov-2008	<i>Rineloricaria sp.</i>
FBCR201-09	LBP-35705	LBP2008111804	35705	658	18-Nov-2008	<i>Rineloricaria sp.</i>
FBCR199-09	LBP-35459	LBP2008110602	33459	658	06-Nov-2008	<i>Rineloricaria sp.</i>
FBCR198-09	LBP-35458	LBP2008110602	33458	658	06-Nov-2008	<i>Rineloricaria sp.</i>
FBCR197-09	LBP-35457	LBP2008110602	33457	658	06-Nov-2008	<i>Rineloricaria sp.</i>
FBCR196-09	LBP-35456	LBP2008110602	35456	658	06-Nov-2008	<i>Rineloricaria sp.</i>
FBCR195-09	LBP-35455	LBP2008110602	35455	658	06-Nov-2008	<i>Rineloricaria sp.</i>
FBCR194-09	LBP-11176	LBP2002140802	11176	658	14-Aug-2002	<i>Rineloricaria sp.</i>
FBCR449-09	LBP-35770	LBP2008111901	35770	656	19-Nov-2008	<i>Rivulus santensis</i>

## Continuação do Apêndice 2.

FBCR447-09	LBP-35768	LBP2008111901	35768	656	19-Nov-2008	Rivulus santensis
FBCR446-09	LBP-35767	LBP2008111901	35767	656	19-Nov-2008	Rivulus santensis
FBCR445-09	LBP-35766	LBP2008111901	35766	656	19-Nov-2008	Rivulus santensis
FBCR299-09	LBP-36084	LBP2008112002	36084	658	20-Nov-2008	Schizolecis guntheri
FBCR298-09	LBP-36083	LBP2008112002	36083	658	20-Nov-2008	Schizolecis guntheri
FBCR297-09	LBP-36082	LBP2008112002	36082	658	20-Nov-2008	Schizolecis guntheri
FBCR296-09	LBP-36081	LBP2008112002	36081	657	20-Nov-2008	Schizolecis guntheri
FBCR295-09	LBP-36080	LBP2008112002	36080	0	20-Nov-2008	Schizolecis guntheri
FBCR512-09	LBP-32801	LBP2008090301	32801	656	03-Sep-2008	Scleromystax barbatus
FBCR511-09	LBP-32800	LBP2008090301	32800	656	03-Sep-2008	Scleromystax barbatus
FBCR510-09	LBP-11188	LBP2002140803	11188	656	14-Aug-2002	Scleromystax barbatus
FBCR509-09	LBP-11163	LBP2002140802	11163	565	14-Aug-2002	Scleromystax barbatus
FBCR182-09	LBP-32797	LBP2008090201	32797	658	02-Sep-2008	Scleromystax barbatus
FBCR181-09	LBP-32796	LBP2008090201	32796	658	02-Sep-2008	Scleromystax barbatus
FBCR180-09	LBP-35721	LBP2008111804	35721	640	18-Nov-2008	Scleromystax barbatus
FBCR179-09	LBP-35720	LBP2008111804	35720	658	18-Nov-2008	Scleromystax barbatus
FBCR178-09	LBP-35442	LBP2008110602	35442	658	06-Nov-2008	Scleromystax barbatus
FBCR177-09	LBP-35441	LBP2008110602	35441	658	06-Nov-2008	Scleromystax barbatus
FBCR142-09	LBP-5166	LBP1997081501	5166	658	15-Dec-1997	Scleromystax barbatus
FBCR140-09	LBP-5167	LBP1997081501	5167	658	15-Dec-1997	Scleromystax barbatus
FBCR139-09	LBP-5176	LBP1997081501	5176	637	15-Dec-1997	Scleromystax barbatus
FBCR138-09	LBP-5164	LBP1997081501	5164	658	15-Dec-1997	Scleromystax barbatus
FBCR137-09	LBP-5163	LBP1997081501	5163	658	15-Dec-1997	Scleromystax barbatus
FBCR136-09	LBP-5168	LBP1997081501	5168	658	15-Dec-1997	Scleromystax barbatus
FBCR135-09	LBP-5169	LBP1997081501	5169	658	15-Dec-1997	Scleromystax barbatus
FBCR134-09	LBP-5160	LBP1997081501	5160	658	15-Dec-1997	Scleromystax barbatus
FBCR133-09	LBP-4588	LBP1997032701	4588	658	27-Mar-1997	Scleromystax barbatus
FBCR132-09	LBP-4523	LBP1997032701	4523	610	27-Mar-1997	Scleromystax barbatus
FBCR193-09	LBP-32808	LBP2008090301	32808	658	03-Sep-2008	Scleromystax macropterus
FBCR192-09	LBP-32807	LBP2008090301	32807	658	03-Sep-2008	Scleromystax macropterus
FBCR191-09	LBP-32805	LBP2008090301	32805	658	03-Sep-2008	Scleromystax macropterus
FBCR190-09	LBP-32804	LBP2008090301	32804	658	03-Sep-2008	Scleromystax macropterus
FBCR189-09	LBP-32803	LBP2008090301	32803	658	03-Sep-2008	Scleromystax macropterus
FBCR188-09	LBP-36040	LBP2008112002	36040	658	20-Nov-2008	Scleromystax macropterus
FBCR187-09	LBP-36039	LBP2008112002	36039	658	20-Nov-2008	Scleromystax macropterus
FBCR186-09	LBP-36038	LBP2008112002	36038	658	20-Nov-2008	Scleromystax macropterus
FBCR185-09	LBP-36037	LBP2008112002	36037	658	20-Nov-2008	Scleromystax macropterus
FBCR184-09	LBP-36036	LBP2008112002	36036	658	20-Nov-2008	Scleromystax macropterus
FBCR519-09	LBP-32789	LBP2008090201	32789	656	02-Sep-2008	Scleromystax prionotos
FBCR518-09	LBP-32788	LBP2008090201	32788	656	02-Sep-2008	Scleromystax prionotos
FBCR517-09	LBP-32787	LBP2008090201	32787	656	02-Sep-2008	Scleromystax prionotos
FBCR516-09	LBP-32786	LBP2008090201	32786	656	02-Sep-2008	Scleromystax prionotos
FBCR515-09	LBP-11108	LBP2002140803	11108	656	15-Aug-2002	Scleromystax prionotos
FBCR507-09	LBP-35384	LBP2008111702	35384	656	17-Nov-2008	Scleromystax prionotos
FBCR506-09	LBP-35383	LBP2008111702	35383	656	17-Nov-2008	Scleromystax prionotos
FBCR504-09	LBP-35381	LBP2008111702	35381	656	17-Nov-2008	Scleromystax prionotos
FBCR431-09	LBP-36041	LBP2008112002	36041	656	20-Nov-2008	Synbranchus marmoratus
FBCR430-09	LBP-35525	LBP2008111702	35525	656	17-Nov-2008	Synbranchus marmoratus
FBCR429-09	LBP-35524	LBP2008111702	35524	656	17-Nov-2008	Synbranchus marmoratus

## Continuação do Apêndice 2.

FBCR338-09	LBP-17411	LBP2005030901	17411	658	09-Mar-2005	Trichomycterus sp.
FBCR536-09	LBP-38417		38417	656	18-Nov-2008	Trichomycterus zonatus
FBCR341-09	LBP-35740	LBP2008111804	35740	658	18-Nov-2008	Trichomycterus zonatus
FBCR337-09	LBP-11204	LBP2002140804	11204	658	14-Aug-2002	Trichomycterus zonatus
FBCR336-09	LBP-11203	LBP2002140804	11203	658	14-Aug-2002	Trichomycterus zonatus
FBCR339-09	LBP-17412	LBP2005030901	17412	658	09-Mar-2005	Trichomycterus sp.

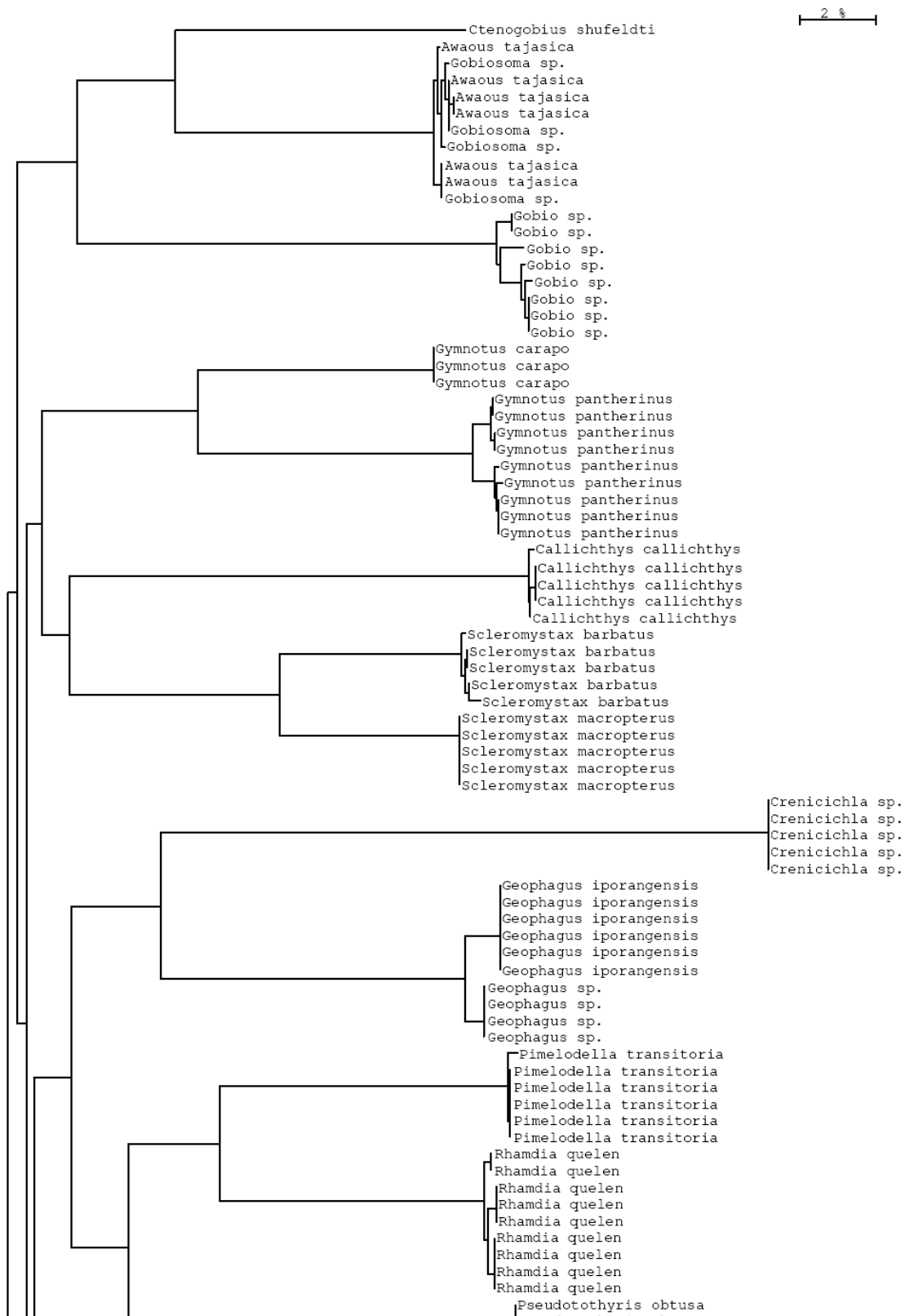


**Apêndice 3** - Dendrograma obtido por Neighbour-joining, pelo método Kimura-2-parâmetros, obtidos a partir de 308 sequências de espécimes coletados nos rios costeiros do estado de São Paulo.

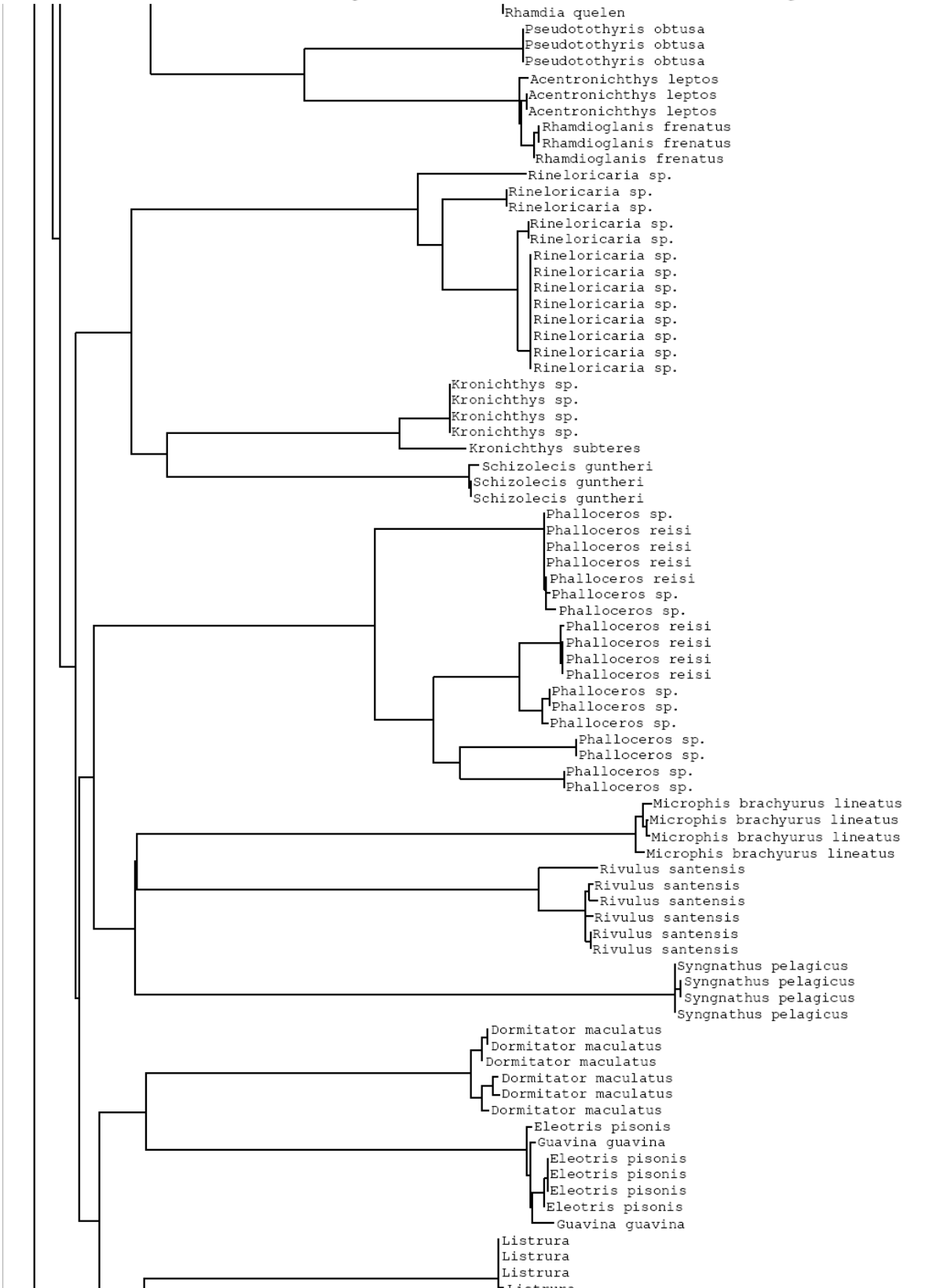
### BOLD TaxonID Tree

Project : Fishes from Brazilian Coastal Rivers part II [FBCRB]  
Date : 4-February-2010  
Data Type : Nucleotide  
Distance Model : Kimura 2 Parameter  
Codon Positions : 1st, 2nd, 3rd  
Labels :  
Colorization :  
  
Sequence Count : 308  
Species count : 49  
Genus count : 38  
Family count : 16  
Unidentified : 6

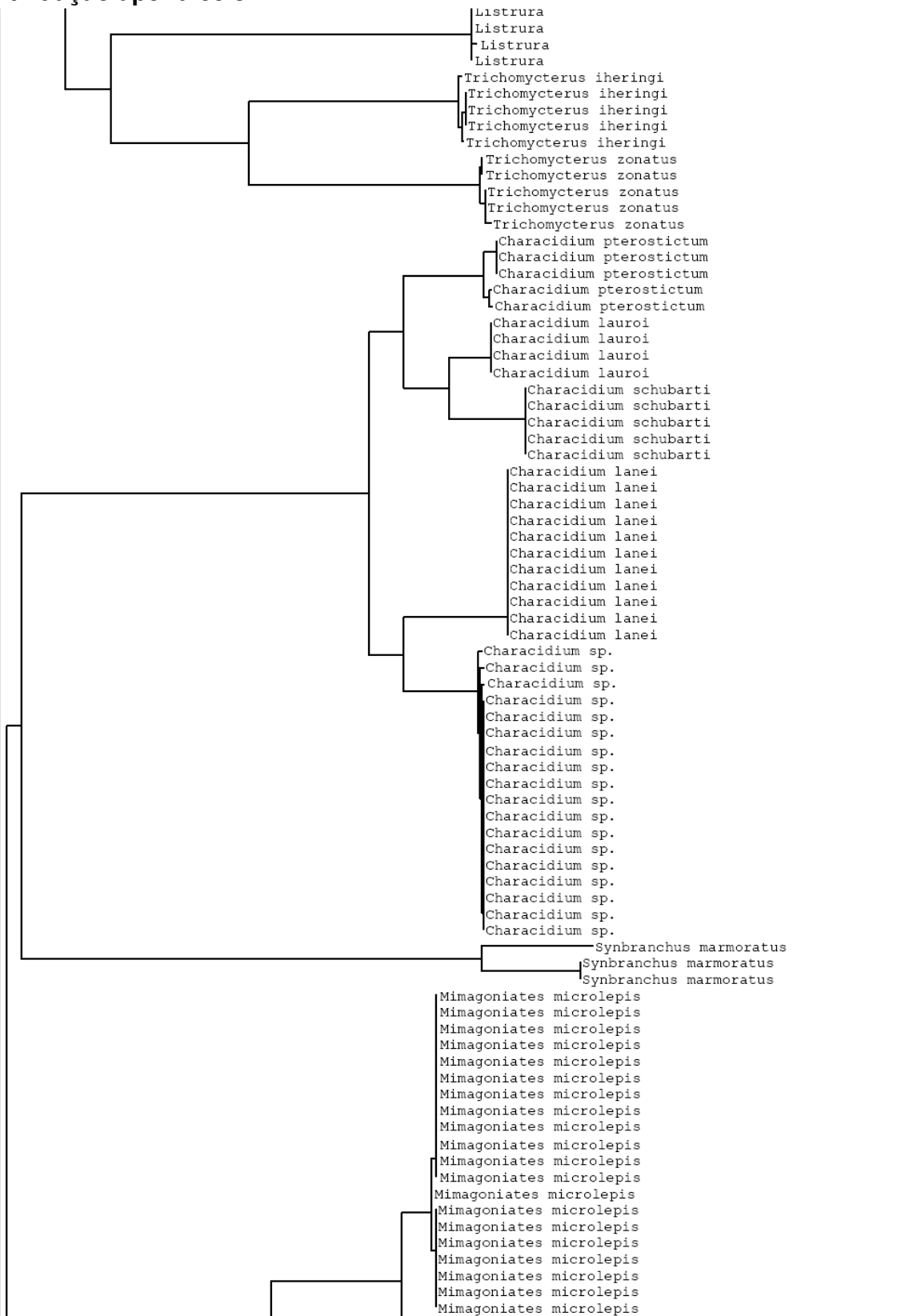
Continuação do apêndice 3.



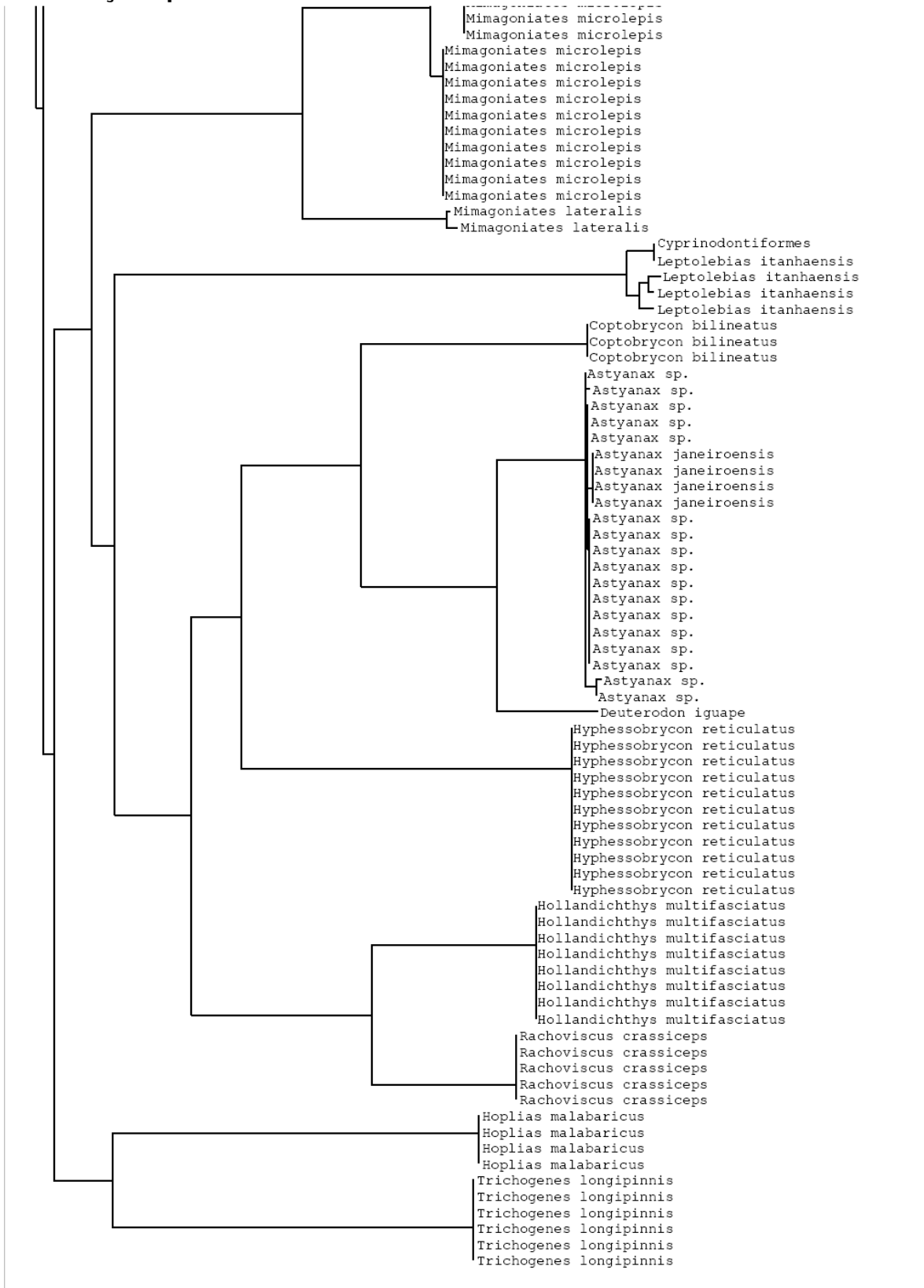
**Continuação apêndice 3.**



Continuação apêndice 3.



Continuação apêndice 3.



## Apendice 4 - Detalhes das espécies e espécimes dos rios costeiros do estado de São Paulo que foram utilizados nesta análise.

**Project:** Fishes from Brazilian Coastal Rivers part II **User:** Jefferson M. Henriques

**Created :** 04-February-2010

Process ID	Sample ID	Field Num	Catalog Num	COI-5P Seq. Length	Collection Date	Identification
FBCRB223-09	LBP-37016	LBP2008121202	37016	658	12-Dec-2008	Acentronichthys leptos
FBCRB222-09	LBP-37015	LBP2008121202	37015	658	12-Dec-2008	Acentronichthys leptos
FBCRB221-09	LBP-37014	LBP2008121202	37014	656	12-Dec-2008	Acentronichthys leptos
FBCRB061-09	LBP-38186	LBP2009052703	38186	658	27-May-2009	Astyanax janeiroensis
FBCRB058-09	LBP-38183	LBP2009052703	38183	658	27-May-2009	Astyanax janeiroensis
FBCRB055-09	LBP-38154	LBP2009052701	38154	658	27-May-2009	Astyanax janeiroensis
FBCRB053-09	LBP-38122	LBP2009052701	38122	658	27-May-2009	Astyanax janeiroensis
FBCRB118-09	LBP-37022	LBP2008121203	37022	658	12-Dec-2008	Astyanax sp.
FBCRB117-09	LBP-37021	LBP2008121203	37021	658	12-Dec-2008	Astyanax sp.
FBCRB116-09	LBP-37020	LBP2008121203	37020	658	12-Dec-2008	Astyanax sp.
FBCRB115-09	LBP-37019	LBP2008121203	37019	649	12-Dec-2008	Astyanax sp.
FBCRB084-09	LBP-22430	LBP2006180801	22430	640	18-Aug-2006	Astyanax sp.
FBCRB083-09	LBP-22429	LBP2006180801	22429	658	18-Aug-2006	Astyanax sp.
FBCRB082-09	LBP-22428	LBP2006180801	22428	658	18-Aug-2006	Astyanax sp.
FBCRB081-09	LBP-22427	LBP2006180801	22427	648	18-Aug-2006	Astyanax sp.
FBCRB080-09	LBP-22426	LBP2006180801	22426	658	18-Aug-2006	Astyanax sp.
FBCRB079-09	LBP-21174	LBP2006052601	21174	658	26-May-2006	Astyanax sp.
FBCRB078-09	LBP-21173	LBP2006052601	21173	658	26-May-2006	Astyanax sp.
FBCRB077-09	LBP-21172	LBP2006052601	21172	651	26-May-2006	Astyanax sp.
FBCRB047-09	LBP-37152	LBP2008121203	37152	652	12-Dec-2008	Astyanax sp.
FBCRB046-09	LBP-37151	LBP2008121203	37151	658	12-Dec-2008	Astyanax sp.
FBCRB045-09	LBP-37150	LBP2008121203	37150	658	12-Dec-2008	Astyanax sp.
FBCRB041-09	LBP-37039	LBP2008121101	37039	560	11-Dec-2008	Astyanax sp.
FBCRB039-09	LBP-21164	LBP2006052601	21164	609	26-May-2006	Astyanax sp.
FBCRB240-09	LBP-37091	LBP2008121102	37091	658	11-Dec-2008	Awaous tajasica
FBCRB239-09	LBP-37090	LBP2008121102	37090	652	11-Dec-2008	Awaous tajasica
FBCRB238-09	LBP-37089	LBP2008121102	37089	653	11-Dec-2008	Awaous tajasica
FBCRB237-09	LBP-37088	LBP2008121102	37088	651	11-Dec-2008	Awaous tajasica
FBCRB236-09	LBP-37065	LBP2008121101	37065	658	11-Dec-2008	Awaous tajasica
FBCRB235-09	LBP-37064	LBP2008121101	37064	658	11-Dec-2008	Awaous tajasica
FBCRB145-09	LBP-38524	LBP2009081301	38524	658	13-Aug-2009	Callichthys callichthys
FBCRB144-09	LBP-38523	LBP2009081301	38523	658	13-Aug-2009	Callichthys callichthys
FBCRB143-09	LBP-38521	LBP2009081301	38521	658	13-Aug-2009	Callichthys callichthys
FBCRB142-09	LBP-38502	LBP2009081301	38502	658	13-Aug-2009	Callichthys callichthys
FBCRB141-09	LBP-38501	LBP2009081301	38501	658	13-Aug-2009	Callichthys callichthys
FBCRB345-09	LBP-33732		33732	656		Characidium lanei
FBCRB344-09	LBP-33729		33729	656		Characidium lanei
FBCRB343-09	LBP-33726		33726	656		Characidium lanei
FBCRB342-09	LBP-33725		33725	656		Characidium lanei
FBCRB097-09	LBP-37052	LBP2008121101	37052	658	11-Dec-2008	Characidium lanei
FBCRB096-09	LBP-37051	LBP2008121101	37051	658	11-Dec-2008	Characidium lanei
FBCRB095-09	LBP-37050	LBP2008121101	37050	658	11-Dec-2008	Characidium lanei
FBCRB094-09	LBP-37049	LBP2008121101	37049	658	11-Dec-2008	Characidium lanei
FBCRB093-09	LBP-37048	LBP2008121101	37048	658	11-Dec-2008	Characidium lanei
FBCRB086-09	LBP-21166	LBP2006052601	21166	658	26-May-2006	Characidium lanei
FBCRB085-09	LBP-19654	LBP2005060801	19654	658	06-Aug-2005	Characidium lanei

## Continuação do apêndice 4.

FBCRB341-09	LBP-33724		33724	656		Characidium lauroi
FBCRB340-09	LBP-33723		33723	656		Characidium lauroi
FBCRB338-09	LBP-33721		33721	656		Characidium lauroi
FBCRB337-09	LBP-33720		33720	656		Characidium lauroi
FBCRB350-09	LBP-37901		37901	657		Characidium pterostictum
FBCRB349-09	LBP-37906		37906	657		Characidium pterostictum
FBCRB348-09	LBP-37915		37915	657		Characidium pterostictum
FBCRB347-09	LBP-37913		37913	656		Characidium pterostictum
FBCRB346-09	LBP-37902		37902	656		Characidium pterostictum
FBCRB355-09	LBP-36195		36195	657		Characidium schubarti
FBCRB354-09	LBP-36196		36196	657		Characidium schubarti
FBCRB353-09	LBP-36197		36197	657		Characidium schubarti
FBCRB352-09	LBP-36040b		36040	657		Characidium schubarti
FBCRB351-09	LBP-36038b		36038	657		Characidium schubarti
FBCRB336-09	LBP-31384		31384	656		Characidium sp.
FBCRB335-09	LBP-31383		31383	656		Characidium sp.
FBCRB334-09	LBP-31382		31382	656		Characidium sp.
FBCRB333-09	LBP-31381		31381	656		Characidium sp.
FBCRB332-09	LBP-31380		31380	656		Characidium sp.
FBCRB104-09	LBP-38255	LBP2009052801	38255	658	28-May-2009	Characidium sp.
FBCRB103-09	LBP-38254	LBP2009052801	38254	658	28-May-2009	Characidium sp.
FBCRB102-09	LBP-38253	LBP2009052801	38253	654	28-May-2009	Characidium sp.
FBCRB101-09	LBP-38252	LBP2009052801	38252	658	28-May-2009	Characidium sp.
FBCRB100-09	LBP-38251	LBP2009052801	38251	658	28-May-2009	Characidium sp.
FBCRB099-09	LBP-38420	LBP2009052703	38420	658	27-May-2009	Characidium sp.
FBCRB098-09	LBP-38419	LBP2009052703	38419	658	27-May-2009	Characidium sp.
FBCRB092-09	LBP-33049b	LBP2008090301	33049	658	03-Sep-2008	Characidium sp.
FBCRB091-09	LBP-33048b	LBP2008090301	33048	658	03-Sep-2008	Characidium sp.
FBCRB090-09	LBP-33047	LBP2008090301	33047	658	03-Sep-2008	Characidium sp.
FBCRB089-09	LBP-33046	LBP2008090301	33046	658	03-Sep-2008	Characidium sp.
FBCRB088-09	LBP-33045	LBP2008090301	33045	658	03-Sep-2008	Characidium sp.
FBCRB087-09	LBP-33044	LBP2008090301	33044	658	03-Sep-2008	Characidium sp.
FBCRB365-09	LBP-40251		40251	657		Coptobrycon bilineatus
FBCRB363-09	LBP-40249		40249	657		Coptobrycon bilineatus
FBCRB362-09	LBP-40248		40248	657		Coptobrycon bilineatus
FBCRB290-09	LBP-38244	LBP2009052801	38244	656	28-May-2009	Crenicichla sp.
FBCRB289-09	LBP-38243	LBP2009052801	38243	656	28-May-2009	Crenicichla sp.
FBCRB288-09	LBP-38242	LBP2009052801	38242	656	28-May-2009	Crenicichla sp.
FBCRB287-09	LBP-38241	LBP2009052801	38241	656	28-May-2009	Crenicichla sp.
FBCRB286-09	LBP-38240	LBP2009052801	38240	656	28-May-2009	Crenicichla sp.
FBCRB241-09	LBP-37149	LBP2008121202	37149	484	12-Dec-2008	Ctenogobius shufeldti
FBCRB377-09	LBP-38418	LBP2009081301	38418	657	13-Aug-2009	Cyprinodontiformes
FBCRB051-09	LBP-38120	LBP2009052701	38120	658	27-May-2009	Deuterodon iguape
FBCRB262-09	LBP-37184	LBP2008121203	37184	656	12-Dec-2008	Dormitator maculatus
FBCRB261-09	LBP-37183	LBP2008121203	37183	656	12-Dec-2008	Dormitator maculatus
FBCRB260-09	LBP-37182	LBP2008121203	37182	656	12-Dec-2008	Dormitator maculatus
FBCRB259-09	LBP-37074	LBP2008121102	37074	656	11-Dec-2008	Dormitator maculatus
FBCRB258-09	LBP-37073	LBP2008121102	37073	658	11-Dec-2008	Dormitator maculatus
FBCRB257-09	LBP-37072	LBP2008121102	37072	641	11-Dec-2008	Dormitator maculatus
FBCRB234-09	LBP-37087	LBP2008121102	37087	578	11-Dec-2008	Eleotris pisonis
FBCRB233-09	LBP-37086	LBP2008121102	37086	656	11-Dec-2008	Eleotris pisonis

## Continuação do apêndice 4.

FBCRB231-09	LBP-37084	LBP2008121102	37084	656	11-Dec-2008	Eleotris pisonis
FBCRB230-09	LBP-37083	LBP2008121102	37083	656	11-Dec-2008	Eleotris pisonis
FBCRB284-09	LBP-37176	LBP2008121203	37176	656	12-Dec-2008	Geophagus iporangensis
FBCRB283-09	LBP-37079	LBP2008121102	37079	656	11-Dec-2008	Geophagus iporangensis
FBCRB282-09	LBP-37078	LBP2008121102	37078	655	11-Dec-2008	Geophagus iporangensis
FBCRB278-09	LBP-24218	LBP2006111701	24218	656	17-Nov-2006	Geophagus iporangensis
FBCRB277-09	LBP-24217	LBP2006111701	24217	656	17-Nov-2006	Geophagus iporangensis
FBCRB275-09	LBP-21150	LBP2006052601	21150	656	26-May-2006	Geophagus iporangensis
FBCRB331-09	LBP-38180	LBP2009052703	38180	656	27-May-2009	Geophagus sp.
FBCRB285-09	LBP-38238	LBP2009052801	38238	656	28-May-2009	Geophagus sp.
FBCRB280-09	LBP-38141	LBP2009052701	38141	656	27-May-2009	Geophagus sp.
FBCRB279-09	LBP-38140	LBP2009052701	38140	656	27-May-2009	Geophagus sp.
FBCRB255-09	LBP-38264	LBP2008121101	38264	658	11-Dec-2008	Gobiosoma sp.
FBCRB254-09	LBP-38263	LBP2008121101	38263	658	11-Dec-2008	Gobiosoma sp.
FBCRB253-09	LBP-38262	LBP2008121101	38262	658	11-Dec-2008	Gobiosoma sp.
FBCRB252-09	LBP-38261	LBP2008121101	38261	658	11-Dec-2008	Gobiosoma sp.
FBCRB249-09	LBP-38236	LBP2009052801	38236	658	28-May-2009	Gobio sp.
FBCRB248-09	LBP-36100b	LBP2008111903	36100	658	19-Nov-2008	Gobio sp.
FBCRB247-09	LBP-36099b	LBP2008111903	36099	658	19-Nov-2008	Gobio sp.
FBCRB246-09	LBP-36003b	LBP2008111903	36003	658	19-Nov-2008	Gobio sp.
FBCRB245-09	LBP-36002b	LBP2008111903	36002	658	19-Nov-2008	Gobio sp.
FBCRB244-09	LBP-36001b	LBP2008111903	36001	655	19-Nov-2008	Gobio sp.
FBCRB229-09	LBP-19653	LBP2005080601	19653	658	06-Aug-2005	Gobio sp.
FBCRB228-09	LBP-19652	LBP2005080601	19652	658	06-Aug-2005	Gobio sp.
FBCRB264-09	LBP-37181	LBP2008121203	37981	656	12-Dec-2008	Guavina guavina
FBCRB263-09	LBP-37063	LBP2008121101	37063	656	11-Dec-2008	Guavina guavina
FBCRB330-09	LBP-38198	LBP2009052704	38198	656	27-May-2009	Gymnotus carapo
FBCRB329-09	LBP-38197	LBP2009052704	38197	656	27-May-2009	Gymnotus carapo
FBCRB328-09	LBP-38139	LBP2009052701	38139	656	27-May-2009	Gymnotus carapo
FBCRB327-09	LBP-38209	LBP2009052705	38209	656	27-May-2009	Gymnotus pantherinus
FBCRB326-09	LBP-11144	LBP2002081401	11144	656	14-Aug-2002	Gymnotus pantherinus
FBCRB325-09	LBP-37171	LBP2008121203	37171	656	12-Dec-2008	Gymnotus pantherinus
FBCRB324-09	LBP-37057	LBP2008121101	37057	656	11-Dec-2008	Gymnotus pantherinus
FBCRB323-09	LBP-33026	LBP2008090301	33026	656	03-Sep-2008	Gymnotus pantherinus
FBCRB322-09	LBP-33024	LBP2008090301	33024	656	03-Sep-2008	Gymnotus pantherinus
FBCRB321-09	LBP-24213	LBP2006111701	24213	656	17-Nov-2006	Gymnotus pantherinus
FBCRB320-09	LBP-22413	LBP2006180802	22413	656	18-Aug-2006	Gymnotus pantherinus
FBCRB319-09	LBP-21162	LBP2006052601	21162	656	26-May-2006	Gymnotus pantherinus
FBCRB076-09	LBP-38219	LBP2009052705	38219	658	27-May-2009	Hollandichthys multifasciatus
FBCRB075-09	LBP-38218	LBP2009052705	38218	648	27-May-2009	Hollandichthys multifasciatus
FBCRB074-09	LBP-38217	LBP2009052705	38217	658	27-May-2009	Hollandichthys multifasciatus
FBCRB073-09	LBP-11140	LBP2002140803	11140	470	17-Aug-2002	Hollandichthys multifasciatus
FBCRB072-09	LBP-11141	LBP2002140802	11141	658	16-Aug-2002	Hollandichthys multifasciatus
FBCRB071-09	LBP-11139	LBP2002140801	11139	658	15-Aug-2002	Hollandichthys multifasciatus
FBCRB070-09	LBP-11142	LBP2002140801	11142	658	14-Aug-2002	Hollandichthys multifasciatus
FBCRB069-09	LBP-11093	LBP2002081301	11093	499	13-Aug-2002	Hollandichthys multifasciatus
FBCRB133-09	LBP-38246	LBP2009052801	38246	658	28-May-2009	Hoplias malabaricus
FBCRB132-09	LBP-38208	LBP2009052705	38208	659	27-May-2009	Hoplias malabaricus
FBCRB131-09	LBP-38207	LBP2009052705	37207	658	27-May-2009	Hoplias malabaricus



## Continuação do apêndice 4.

FBCRB129-09	LBP-38225	LBP2009052705	38225	659	27-May-2009	Hyphessobrycon reticulatus
FBCRB128-09	LBP-38117	LBP2009052701	38117	659	27-May-2009	Hyphessobrycon reticulatus
FBCRB127-09	LBP-38116	LBP2009052701	38116	659	27-May-2009	Hyphessobrycon reticulatus
FBCRB126-09	LBP-38115	LBP2009052701	38115	659	27-May-2009	Hyphessobrycon reticulatus
FBCRB125-09	LBP-38114	LBP2009052701	38114	659	27-May-2009	Hyphessobrycon reticulatus
FBCRB124-09	LBP-33033	LBP2008090301	33033	677	03-Sep-2008	Hyphessobrycon reticulatus
FBCRB123-09	LBP-33032	LBP2008090301	33032	659	03-Sep-2008	Hyphessobrycon reticulatus
FBCRB122-09	LBP-33031	LBP2008090301	33031	659	03-Sep-2008	Hyphessobrycon reticulatus
FBCRB121-09	LBP-33030	LBP2008090301	33030	659	03-Sep-2008	Hyphessobrycon reticulatus
FBCRB120-09	LBP-33029	LBP2008090301	33029	641	03-Sep-2008	Hyphessobrycon reticulatus
FBCRB109-09	LBP-11151	LBP2002081401	11151	659	14-Aug-2002	Hyphessobrycon reticulatus
FBCRB171-09	LBP-38157	LBP2009052701	38157	583	27-May-2009	Kronichthys sp.
FBCRB170-09	LBP-38156	LBP2009052701	38156	658	27-May-2009	Kronichthys sp.
FBCRB169-09	LBP-21381	LBP2003031402	21381	658	14-Mar-2003	Kronichthys sp.
FBCRB167-09	LBP-21379	LBP2003031402	21379	658	14-Mar-2003	Kronichthys sp.
FBCRB381-09	LBP-6335	LBP1999082301	6335	658	11-Oct-2007	Kronichthys subteres
FBCRB315-09	LBP-37854	LBP 2009052705	37854	656	27-May-2009	Leptolebias itanhaensis
FBCRB314-09	LBP-37853	LBP 2009052705	37853	656	27-May-2009	Leptolebias itanhaensis
FBCRB313-09	LBP-37852	LBP 2009052705	37852	656	27-May-2009	Leptolebias itanhaensis
FBCRB312-09	LBP-37851	LBP 2009052705	37851	656	27-May-2009	Leptolebias itanhaensis
FBCRB197-09	LBP-22420	LBP2006180802	22420	658	18-Aug-2006	Listrura
FBCRB196-09	LBP-22419	LBP2006180802	22419	658	18-Aug-2006	Listrura
FBCRB195-09	LBP-22418	LBP2006180802	22418	658	18-Aug-2006	Listrura
FBCRB194-09	LBP-22417	LBP2006180802	22417	658	18-Aug-2006	Listrura
FBCRB193-09	LBP-22416	LBP2006180802	22416	658	18-Aug-2006	Listrura
FBCRB274-09	LBP-37139	LBP2008121102	37139	656	11-Dec-2008	Listrura Microphis brachyurus lineatus
FBCRB272-09	LBP-37099	LBP2008121102	37099	656	11-Dec-2008	Microphis brachyurus lineatus
FBCRB271-09	LBP-37098	LBP2008121102	37098	656	11-Dec-2008	Microphis brachyurus lineatus
FBCRB270-09	LBP-37097	LBP2008121102	37097	656	11-Dec-2008	Microphis brachyurus lineatus
FBCRB017-09	LBP-38201	LBP2009052704	38201	658	27-May-2009	Mimagoniates lateralis
FBCRB016-09	LBP-38431	LBP2009052704	38431	657	27-May-2009	Mimagoniates lateralis
FBCRB037-09	LBP-38447	LBP2009052801	38447	658	28-May-2009	Mimagoniates microlepis
FBCRB036-09	LBP-38446	LBP2009052801	38446	658	31-May-2009	Mimagoniates microlepis
FBCRB035-09	LBP-38445	LBP2009052801	38445	658	30-May-2009	Mimagoniates microlepis
FBCRB034-09	LBP-38444	LBP2009052801	38444	658	29-May-2009	Mimagoniates microlepis
FBCRB033-09	LBP-38443	LBP2009052801	38443	656	28-May-2009	Mimagoniates microlepis
FBCRB032-09	LBP-37027	LBP2008121203	37027	658	12-Dec-2008	Mimagoniates microlepis
FBCRB031-09	LBP-37026	LBP2008121203	37026	658	12-Dec-2008	Mimagoniates microlepis
FBCRB030-09	LBP-37025	LBP2008121203	37025	658	12-Dec-2008	Mimagoniates microlepis
FBCRB029-09	LBP-37024	LBP2008121203	37024	658	12-Dec-2008	Mimagoniates microlepis
FBCRB028-09	LBP-37023	LBP2008121203	37023	658	12-Dec-2008	Mimagoniates microlepis
FBCRB027-09	LBP-37047	LBP2008121101	37047	658	11-Dec-2008	Mimagoniates microlepis
FBCRB026-09	LBP-37046	LBP2008121101	37046	658	11-Dec-2008	Mimagoniates microlepis
FBCRB025-09	LBP-37045	LBP2008121101	37045	658	11-Dec-2008	Mimagoniates microlepis
FBCRB024-09	LBP-37044	LBP2008121101	37044	658	11-Dec-2008	Mimagoniates microlepis
FBCRB023-09	LBP-37043	LBP2008121101	37043	658	11-Dec-2008	Mimagoniates microlepis
FBCRB022-09	LBP-33043b	LBP2008090301	33043	682	03-Sep-2008	Mimagoniates microlepis
FBCRB021-09	LBP-33042b	LBP2008090301	33042	683	03-Sep-2008	Mimagoniates microlepis
FBCRB020-09	LBP-33041b	LBP2008090301	33041	694	03-Sep-2008	Mimagoniates microlepis

## Continuação do apêndice 4.

FBCRB018-09	LBP-33039b	LBP2008090301	33039	680	03-Sep-2008	Mimagoniates microlepis
FBCRB015-09	LBP-38430	LBP2009052704	38430	658	27-May-2009	Mimagoniates microlepis
FBCRB014-09	LBP-38423	LBP2009052703	38423	658	27-May-2009	Mimagoniates microlepis
FBCRB013-09	LBP-38422	LBP2009052703	38422	658	27-May-2009	Mimagoniates microlepis
FBCRB012-09	LBP-38421	LBP2009052703	38421	655	27-May-2009	Mimagoniates microlepis
FBCRB011-09	LBP-38188	LBP2009052703	38188	658	27-May-2009	Mimagoniates microlepis
FBCRB010-09	LBP-38187	LBP2009052703	38187	658	27-May-2009	Mimagoniates microlepis
FBCRB009-09	LBP-38127	LBP2009052701	38127	658	27-May-2009	Mimagoniates microlepis
FBCRB008-09	LBP-38126	LBP2009052701	38126	655	27-May-2009	Mimagoniates microlepis
FBCRB007-09	LBP-38125	LBP2009052701	38125	658	27-May-2009	Mimagoniates microlepis
FBCRB006-09	LBP-38124	LBP2009052701	38124	658	27-May-2009	Mimagoniates microlepis
FBCRB382-09	LBP-38429	LBP2009052703	38429	656	27-May-2009	Phalloceros reisi
FBCRB305-09	LBP-38428	LBP2009052703	38428	656	27-May-2009	Phalloceros reisi
FBCRB303-09	LBP-38134	LBP2009052701	38134	656	27-May-2009	Phalloceros reisi
FBCRB302-09	LBP-38133	LBP2009052701	38133	656	27-May-2009	Phalloceros reisi
FBCRB301-09	LBP-37142	LBP2008121201	37142	656	12-Dec-2008	Phalloceros reisi
FBCRB300-09	LBP-37141	LBP2008121201	37141	656	12-Dec-2008	Phalloceros reisi
FBCRB299-09	LBP-37003	LBP2008121102	37003	656	11-Dec-2008	Phalloceros reisi
FBCRB298-09	LBP-37002	LBP2008121102	37002	656	11-Dec-2008	Phalloceros reisi
FBCRB360-09	LBP-40469		40469	657		Phalloceros sp.
FBCRB359-09	LBP-40468		40468	657		Phalloceros sp.
FBCRB358-09	LBP-40247		40247	657		Phalloceros sp.
FBCRB297-09	LBP-22439	LBP2006180801	22439	656	18-Aug-2006	Phalloceros sp.
FBCRB296-09	LBP-22438	LBP2006180801	22438	656	18-Aug-2006	Phalloceros sp.
FBCRB295-09	LBP-21176	LBP2006052601	21176	656	26-May-2006	Phalloceros sp.
FBCRB294-09	LBP-21175	LBP2006052601	21175	656	26-May-2006	Phalloceros sp.
FBCRB293-09	LBP-19655	LBP2005080601	19655	604	06-Aug-2005	Phalloceros sp.
FBCRB292-09	LBP-11133	LBP2002081401	11133	656	14-Aug-2002	Phalloceros sp.
FBCRB291-09	LBP-11132	LBP2002081401	11132	656	14-Aug-2002	Phalloceros sp.
FBCRB220-09	LBP-38234	LBP2009052801	38234	658	28-May-2009	Pimelodella transitoria
FBCRB219-09	LBP-38194	LBP2009052703	38194	658	27-May-2009	Pimelodella transitoria
FBCRB218-09	LBP-38193	LBP2009052703	38193	658	27-May-2009	Pimelodella transitoria
FBCRB217-09	LBP-37071	LBP2008121102	37071	658	11-Dec-2008	Pimelodella transitoria
FBCRB216-09	LBP-37053	LBP2008121101	37053	658	11-Dec-2008	Pimelodella transitoria
FBCRB215-09	LBP-24219	LBP2006111701	24219	658	17-Nov-2006	Pimelodella transitoria
FBCRB164-09	LBP-33055	LBP2008090301	33055	658	03-Sep-2008	Pseudotothyris obtusa
FBCRB163-09	LBP-33054	LBP2008090301	33054	658	03-Sep-2008	Pseudotothyris obtusa
FBCRB162-09	LBP-33053	LBP2008090301	33053	658	03-Sep-2008	Pseudotothyris obtusa
FBCRB138-09	LBP-38405b	LBP2009052705	38405	706	27-May-2009	Rachoviscus crassiceps
FBCRB137-09	LBP-38404b	LBP2009052705	38404	706	27-May-2009	Rachoviscus crassiceps
FBCRB136-09	LBP-38403b	LBP2009052705	38403	706	27-May-2009	Rachoviscus crassiceps
FBCRB135-09	LBP-38402b	LBP2009052705	38402	706	27-May-2009	Rachoviscus crassiceps
FBCRB134-09	LBP-38401b	LBP2009052705	38401	706	27-May-2009	Rachoviscus crassiceps
FBCRB214-09	LBP-37163	LBP2008121203	37163	658	12-Dec-2008	Rhamdia quelen
FBCRB213-09	LBP-37162	LBP2008121203	37162	658	12-Dec-2008	Rhamdia quelen
FBCRB212-09	LBP-37161	LBP2008121203	37161	658	12-Dec-2008	Rhamdia quelen
FBCRB211-09	LBP-37160	LBP2008121203	37160	658	12-Dec-2008	Rhamdia quelen
FBCRB210-09	LBP-37159	LBP2008121203	37159	658	12-Dec-2008	Rhamdia quelen
FBCRB209-09	LBP-38233	LBP2009052801	38233	658	28-May-2009	Rhamdia quelen
FBCRB208-09	LBP-38199	LBP2009052704	38199	658	27-May-2009	Rhamdia quelen
FBCRB207-09	LBP-37054	LBP2008121101	37054	658	11-Dec-2008	Rhamdia quelen

## Continuação do apêndice 4.

FBCRB227-09	LBP-38152	LBP2009052701	38152	617	27-May-2009	Rhamdioglanis frenatus
FBCRB226-09	LBP-38151	LBP2009052701	38151	658	27-May-2009	Rhamdioglanis frenatus
FBCRB225-09	LBP-38150	LBP2009052701	38150	658	27-May-2009	Rhamdioglanis frenatus
FBCRB380-09	LBP-38083	LBP2009052801	38083	657	28-May-2009	Rineloricaria sp.
FBCRB379-09	LBP-21378	LBP2003031402	21378	657	14-Mar-2003	Rineloricaria sp.
FBCRB378-09	LBP-29377	LBP2008040203	29377	657	02-Apr-2008	Rineloricaria sp.
FBCRB186-09	LBP-38087	LBP2009052801	38087	0	28-May-2009	Rineloricaria sp.
FBCRB185-09	LBP-38086	LBP2009052801	38086	658	28-May-2009	Rineloricaria sp.
FBCRB184-09	LBP-38085	LBP2009052801	38085	658	28-May-2009	Rineloricaria sp.
FBCRB183-09	LBP-38427	LBP2009052703	38427	658	27-May-2009	Rineloricaria sp.
FBCRB180-09	LBP-37165	LBP2008121203	37165	658	12-Dec-2008	Rineloricaria sp.
FBCRB179-09	LBP-37164	LBP2008121203	37164	658	12-Dec-2008	Rineloricaria sp.
FBCRB177-09	LBP-37029	LBP2008121203	37029	658	12-Dec-2008	Rineloricaria sp.
FBCRB176-09	LBP-37028	LBP2008121203	37028	674	12-Dec-2008	Rineloricaria sp.
FBCRB175-09	LBP-21377	LBP2003031402	21377	658	14-Mar-2003	Rineloricaria sp.
FBCRB174-09	LBP-21375	LBP2003031401	21375	658	14-Mar-2003	Rineloricaria sp.
FBCRB173-09	LBP-21374	LBP2003031401	21374	653	14-Mar-2003	Rineloricaria sp.
FBCRB311-09	LBP-38200	LBP2009052701	38200	656	27-May-2009	Rivulus santensis
FBCRB310-09	LBP-33059	LBP2008090301	33059	656	03-Sep-2008	Rivulus santensis
FBCRB309-09	LBP-33058	LBP2008090301	33058	656	03-Sep-2008	Rivulus santensis
FBCRB308-09	LBP-37863	LBP 2009052705	37863	656	27-May-2009	Rivulus santensis
FBCRB307-09	LBP-37862	LBP 2009052705	37862	656	27-May-2009	Rivulus santensis
FBCRB306-09	LBP-37861	LBP 2009052705	37861	656	27-May-2009	Rivulus santensis
FBCRB161-09	LBP-38455	LBP2003031401	38455	658	11-Dec-2008	Schizolecis guntheri
FBCRB159-09	LBP-38453	LBP2003031401	38453	608	11-Dec-2008	Schizolecis guntheri
FBCRB158-09	LBP-38452	LBP2003031401	38452	658	11-Dec-2008	Schizolecis guntheri
FBCRB156-09	LBP-21373	LBP2003031401	21373	658	14-Mar-2003	Scleromystax barbatus
FBCRB155-09	LBP-21372	LBP2003031401	21372	658	14-Mar-2003	Scleromystax barbatus
FBCRB154-09	LBP-21371	LBP2003031401	21371	658	14-Mar-2003	Scleromystax barbatus
FBCRB153-09	LBP-21370	LBP2003031401	21370	658	14-Mar-2003	Scleromystax barbatus
FBCRB152-09	LBP-21369	LBP2003031401	21369	658	14-Mar-2003	Scleromystax barbatus
FBCRB151-09	LBP-11088	LBP2002130802	11088	627	13-Aug-2002	Scleromystax barbatus
FBCRB150-09	LBP-38434	LBP2009052701	38434	645	27-May-2009	Scleromystax macropterus
FBCRB149-09	LBP-38433	LBP2009052701	38433	645	27-May-2009	Scleromystax macropterus
FBCRB148-09	LBP-38216	LBP2009052701	38216	658	27-May-2009	Scleromystax macropterus
FBCRB147-09	LBP-38215	LBP2009052701	38215	572	27-May-2009	Scleromystax macropterus
FBCRB146-09	LBP-38214	LBP2009052701	38214	658	27-May-2009	Scleromystax macropterus
FBCRB318-09	LBP-38266	LBP2008121101	38266	656	11-Dec-2008	Synbranchus marmoratus
FBCRB317-09	LBP-38245	LBP2009052801	38245	656	28-May-2009	Synbranchus marmoratus
FBCRB316-09	LBP-21146	LBP2006052601	21146	656	26-May-2006	Synbranchus marmoratus
FBCRB268-09	LBP-37096	LBP2008121102	37096	656	11-Dec-2008	Syngnathus pelagicus
FBCRB267-09	LBP-37095	LBP2008121102	37095	656	11-Dec-2008	Syngnathus pelagicus
FBCRB266-09	LBP-37094	LBP2008121102	37094	656	11-Dec-2008	Syngnathus pelagicus
FBCRB265-09	LBP-37093	LBP2008121102	37093	656	11-Dec-2008	Syngnathus pelagicus
FBCRB192-09	LBP-22412	LBP2006180803	22412	658	18-Aug-2006	Trichogenes longipinnis
FBCRB191-09	LBP-22411	LBP2006180803	22411	658	18-Aug-2006	Trichogenes longipinnis
FBCRB190-09	LBP-22410	LBP2006180803	22410	658	18-Aug-2006	Trichogenes longipinnis
FBCRB189-09	LBP-22409	LBP2006180803	22409	658	18-Aug-2006	Trichogenes longipinnis
FBCRB188-09	LBP-22408	LBP2006180803	22408	656	18-Aug-2006	Trichogenes longipinnis

#### Continuação do apêndice 4.

FBCRB371-09	LBP-40474		40474	657		Trichomycterus iheringi
FBCRB370-09	LBP-40473		40473	657		Trichomycterus iheringi
FBCRB369-09	LBP-40472		40472	657		Trichomycterus iheringi
FBCRB368-09	LBP-40471		40471	657		Trichomycterus iheringi
FBCRB367-09	LBP-40253		40253	657		Trichomycterus iheringi
FBCRB205-09	LBP-37147	LBP2008121202	37147	658	12-Dec-2008	Trichomycterus zonatus
FBCRB204-09	LBP-37146	LBP2008121202	37146	658	12-Dec-2008	Trichomycterus zonatus
FBCRB203-09	LBP-37145	LBP2008121202	37145	658	12-Dec-2008	Trichomycterus zonatus
FBCRB202-09	LBP-37144	LBP2008121202	37144	658	12-Dec-2008	Trichomycterus zonatus
FBCRB201-09	LBP-37143	LBP2008121202	37143	615	12-Dec-2008	Trichomycterus zonatus

**Apendice 5** - Dendrograma obtido por Neighbour-joining, pelo método Kimura-2-parâmetros, obtidos a partir de 706 sequências de espécimes coletados pertencentes a bacia do rio Ribeira de Iguape e rios costeiros do estado de São Paulo.

### BOLD TaxonID Tree

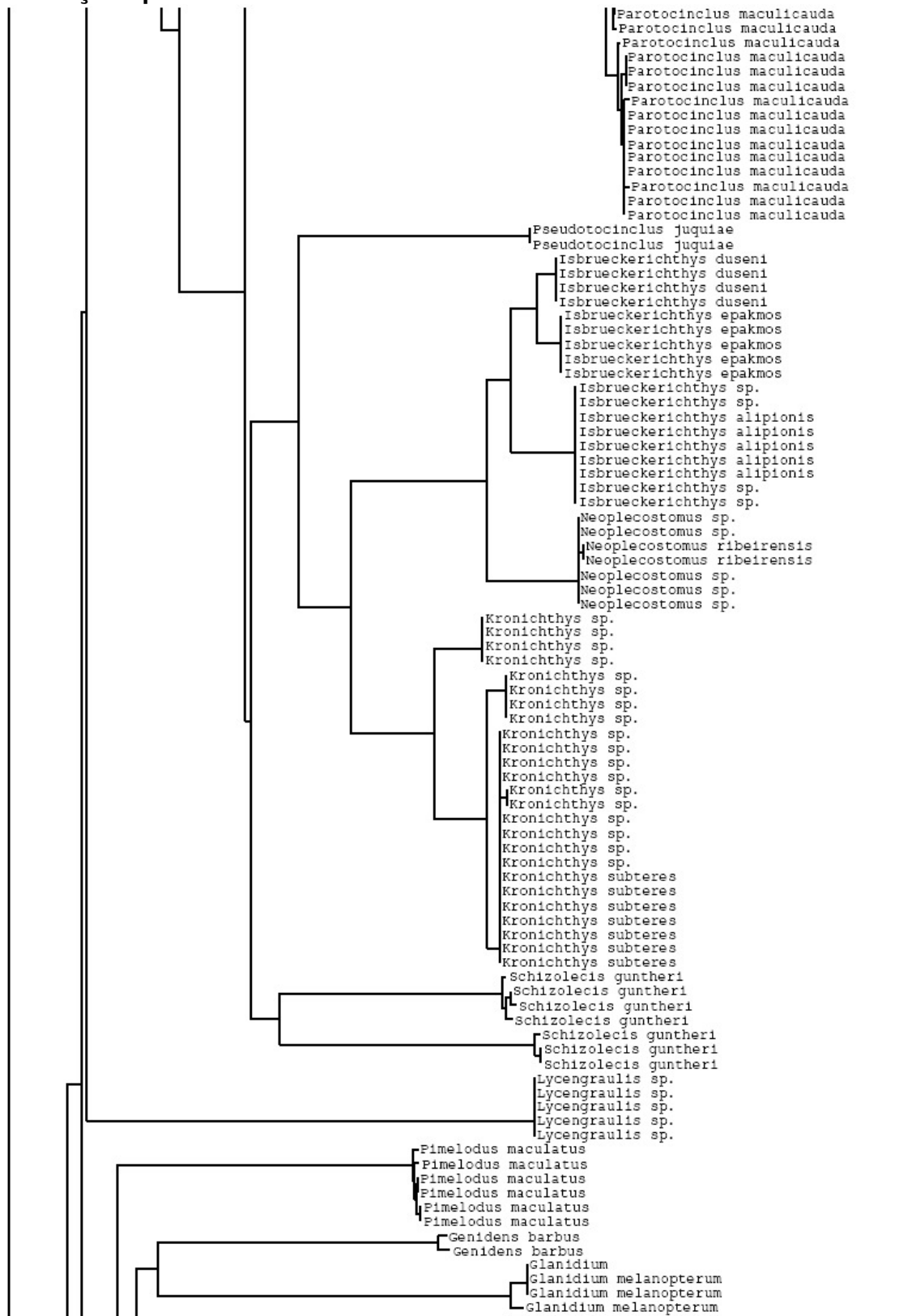
```
Project      : MERGED: {FBCR,FBCRB}
Subprojects  : Fishes from Brazilian coastal rivers[FBCR]
              Fishes from Brazilian Coastal Rivers part II[FBCRB]
Date        : 4-February-2010
Data Type   : Nucleotide
Distance Model : Kimura 2 Parameter
Codon Positions : 1st, 2nd, 3rd
Labels      :
Colorization :

Sequence Count : 706
Species count  : 91
Genus count    : 62
Family count   : 23
```





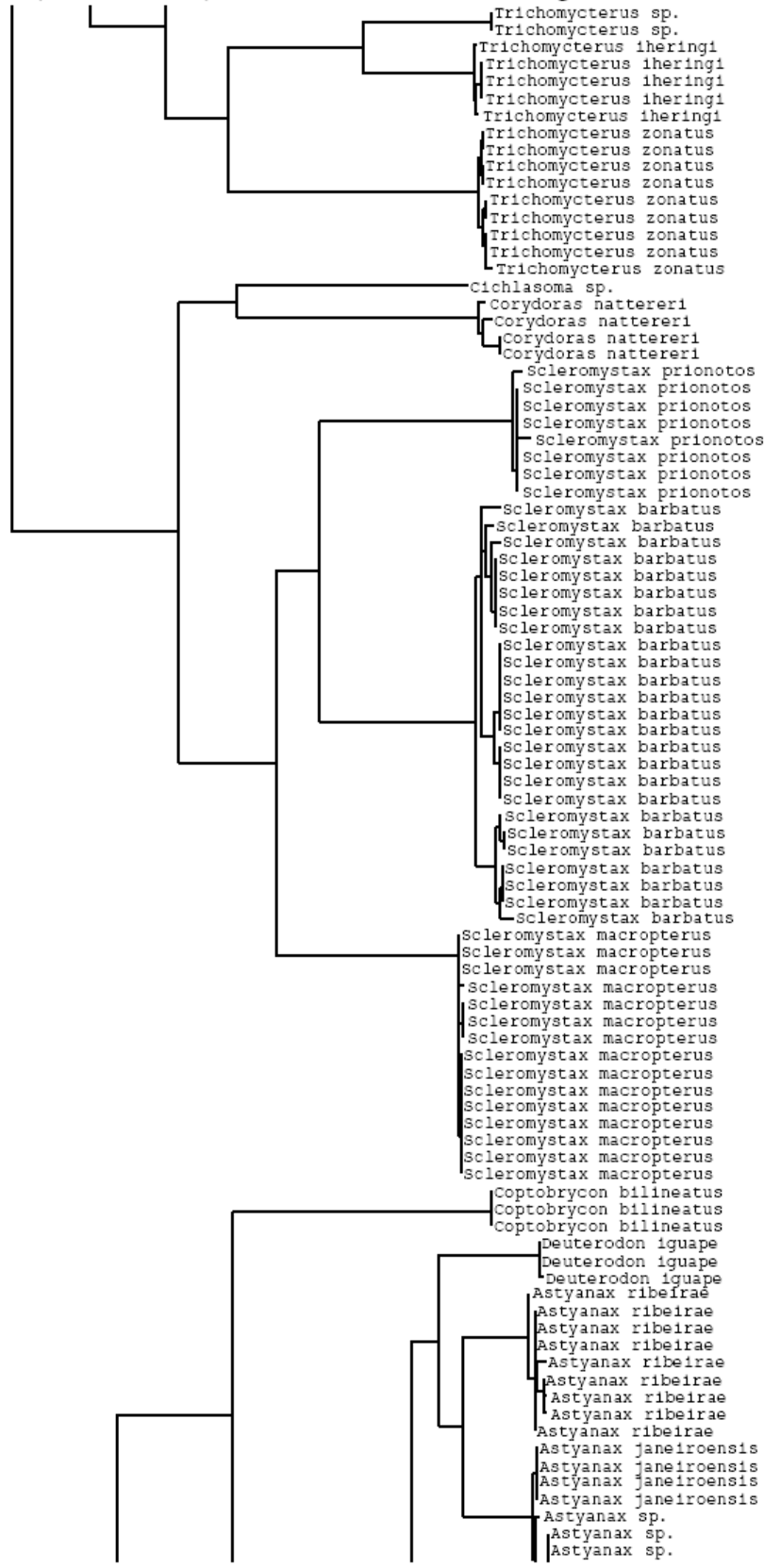
Continuação apêndice 5



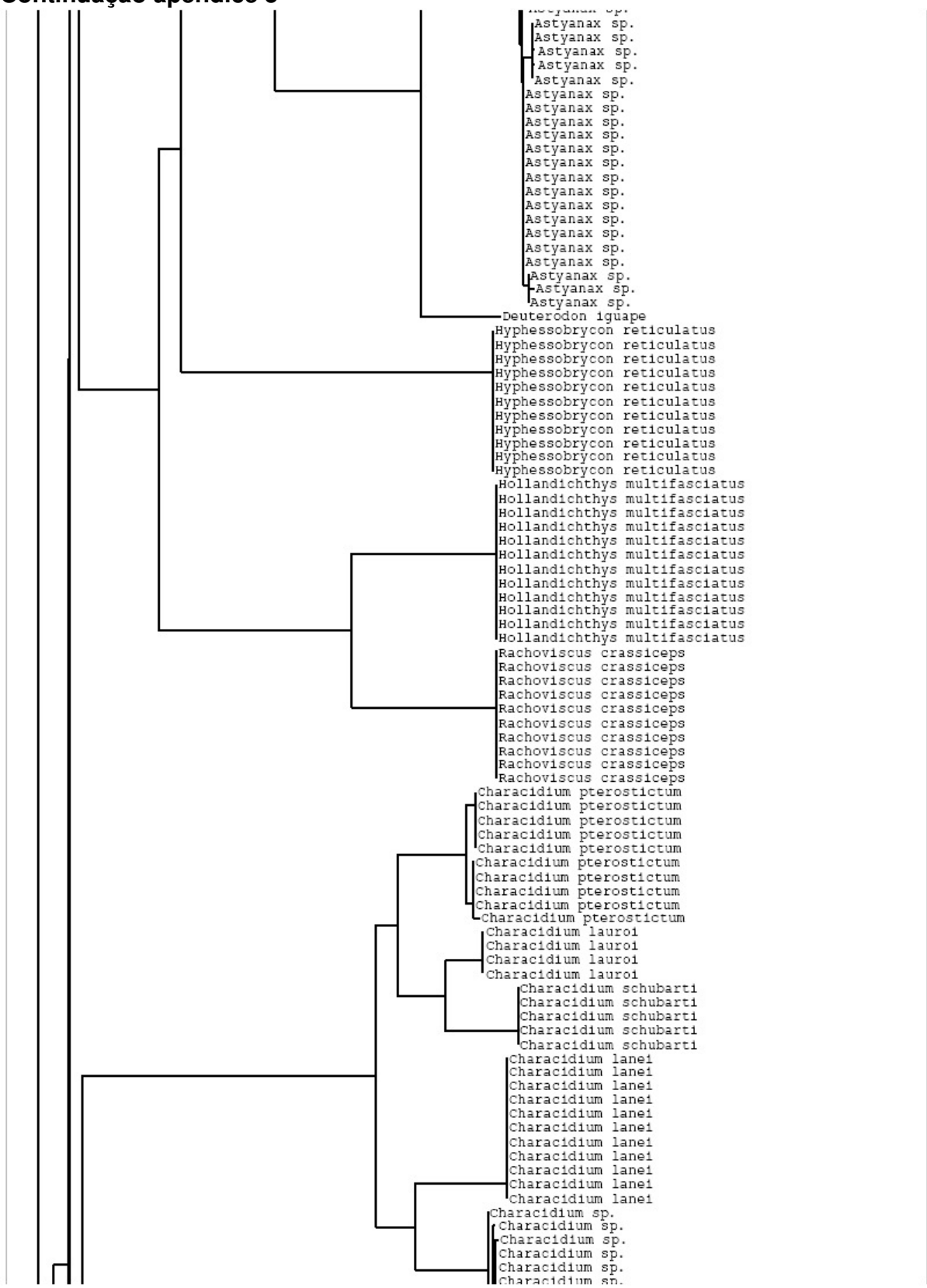




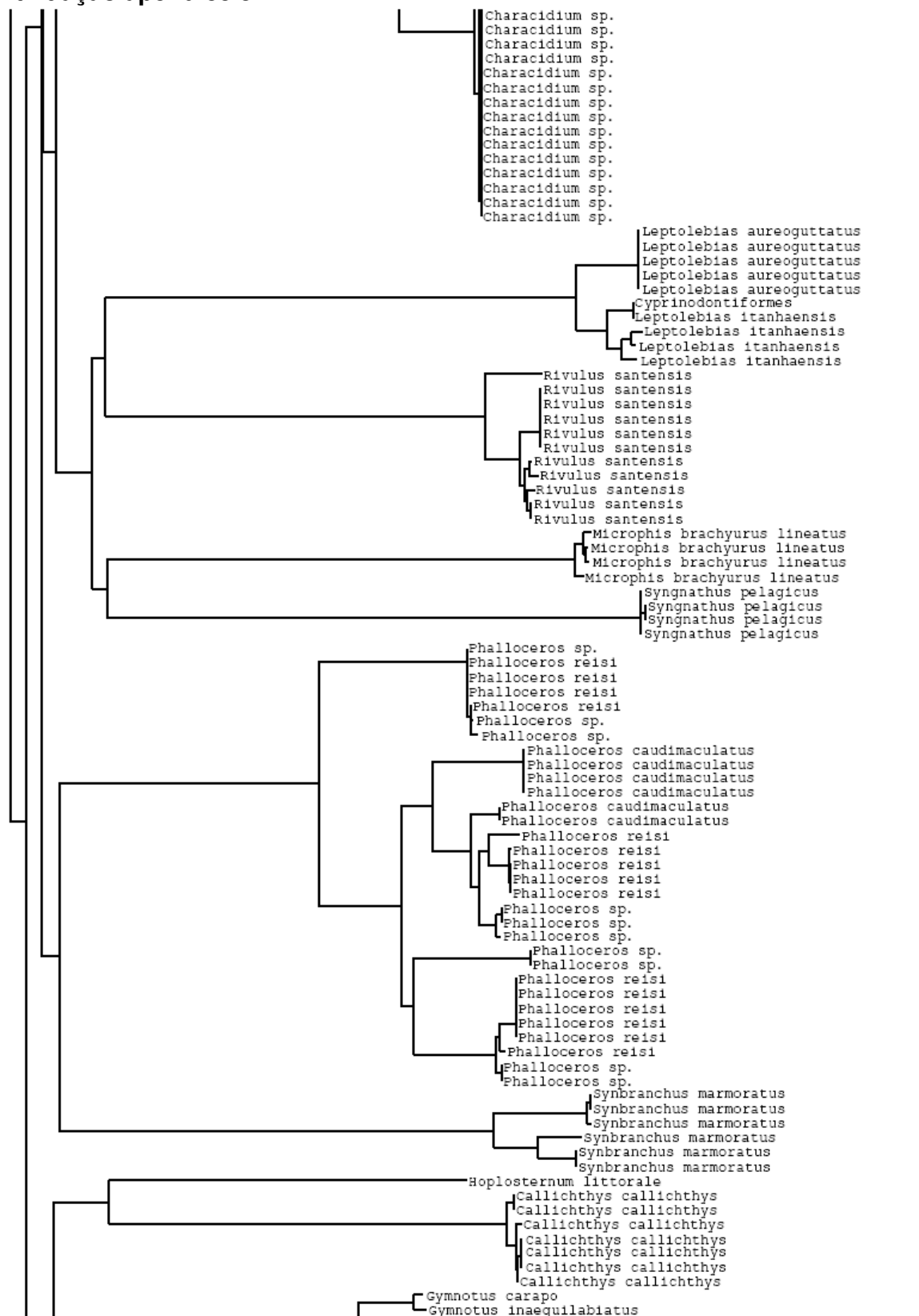
Continuação apêndice 5



Continuação apêndice 5



Continuação apêndice 5



Continuação apêndice 5

