

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

GLÁUCIA MARIA GARCIA MAIA

**INVENTÁRIO DA ICTIOFAUNA DO ALTO RIO PARAÍBA DO SUL E
CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DAS ESPÉCIES ENCONTRADAS**

Orientador: Dr. Claudio de Oliveira

BOTUCATU – SP

2012

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

GLÁUCIA MARIA GARCIA MAIA

Orientador: Dr. Claudio de Oliveira

**INVENTÁRIO DA ICTIOFAUNA DO ALTO RIO PARAÍBA DO SUL E
CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DAS ESPÉCIES ENCONTRADAS**

Monografia apresentada ao Departamento de Morfologia do Instituto de Biociências da UNESP – Campus de Botucatu, como exigência parcial para a obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

BOTUCATU – SP

2012

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: *SULAMITA SELMA CLEMENTE COLNAGO*

Maia, Gláucia Maria Garcia.

Inventário da ictiofauna do alto rio Paraíba do Sul e caracterização molecular das espécies encontradas / Gláucia Maria Garcia Maia. – Botucatu : [s.n.], 2012

Trabalho de conclusão de curso (bacharelado - Ciências Biológicas) -
Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Claudio de Oliveira

Capes: 20204000

1. Peixe – Identificação. 2. Paraíba do Sul, Rio.

Palavras-chave: Citocromo oxidase e subunidade I; DNA *barcode*; DNA mitocondrial; Ictiofauna; Identificação de espécies.

Laboratório de Biologia e Genética de Peixes

UNESP - Botucatu - SP



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

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr. Cláudio de Oliveira, pela oportunidade, pelo exemplo como pesquisador, por todos os ensinamentos, pela confiança em mim depositada e principalmente pela orientação ao longo de minha trajetória acadêmica. Muito obrigada!

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

À FAPESP, pelo apoio financeiro.

As amigas da Unesp de Botucatu Cláudia, Flávia e Rachel que se tornaram especiais pelo carinho, pelo companheirismo, pelas risadas e momentos de descontração.

Aos companheiros Luiz, Jefferson e Amanda pela paciência, conversas e orientações sempre que foi preciso. Obrigada!

A todos os amigos do Laboratório de Biologia e Genética de Peixes pelo companheirismo e amizade.

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.

À minha família em especial meus pais: Mauro e Leonor, irmã: Mariana e avós: Alcides e Alice que sempre acreditaram em mim, me apoiaram e incentivaram para a conclusão deste trabalho. Amo vocês!

Ao meu namorado, Pedro, pela paciência, carinho e incentivo nos momentos mais difíceis.

*“A possibilidade de realizarmos um sonho é o que
torna a vida interessante.”*
Paulo Coelho

Resumo

O Estado de São Paulo apresenta quatro drenagens: Rio Paraná, Rio Paraíba do Sul, Rio Ribeira de Iguape e rios litorâneos. O rio Paraíba do Sul nasce em São Paulo e drena uma importante faixa de terras da região leste do Estado. Sua ictiofauna tem algumas semelhanças e muitas diferenças em relação às drenagens continentais e costeiras o que realça a importância do presente estudo. Os levantamentos ictiofaunísticos realizados nesta bacia, como nas outras grandes bacias hidrográficas brasileiras, são ainda incompletos e não existe consenso acerca do *status* taxonômico de muitas espécies listadas nesses levantamentos. Considerando o uso promissor do DNA *barcoding* como um sistema global de identificação de espécies, o presente estudo tem por meta realizar um inventário da ictiofauna da porção paulista do rio Paraíba do Sul e, simultaneamente compilar uma biblioteca de sequências referências para o DNA *barcoding* dos peixes encontrados. Foram obtidas e analisadas 354 sequências do gene Citocromo c Oxidase subunidade I (COI) pertencentes a 66 espécies da porção paulista do rio Paraíba do Sul. A distância genética K2P média encontrada entre indivíduos dentro das espécies desta bacia foi de 0,48%, e entre espécies dentro de um mesmo gênero de 9,87%. Cinco pares de espécies (10 espécies) apresentaram baixos valores de divergência genética interespecífica (<2%), porém todas puderam ser corretamente identificadas. Este estudo evidenciou que as espécies de peixes analisadas puderam ser identificadas de forma eficiente, através da utilização da sequência *barcode* gerando dados que podem fornecer subsídios para estudos posteriores desta fauna, além de contribuir com a iniciativa global de caracterizar as espécies de peixes do mundo de um ponto de vista molecular.

Palavras-chave: Ictiofauna; Identificação de espécies; DNA *Barcode*; DNA mitocondrial; Citocromo c Oxidase subunidade I

Abstract

The state of São Paulo has four main drainages: Paraná river, Paraíba do Sul river, Ribeira do Iguape river and coastal rivers. The Paraíba do Sul river is born in Sao Paulo and drains an important range of land east of the state. Its ichthyofauna has some similarities and many differences from the continental and coastal drainages which highlights the importance of this study. Surveys conducted in the ichthyofauna of this basin, as in other large river basins in Brazil, is still incomplete. Moreover, there is no consensus about the taxonomic status of many species listed in these surveys. Considering the promising use of DNA barcode as a global system for species identification, the present study is aimed to establishing an inventory of the ichthyofauna of the São Paulo portion of the river Paraíba do Sul and simultaneously build a DNA barcode reference sequence library for fish found. Were obtained and analyzed 354 sequences of the gene cytochrome oxidase c subunit I (COI) belonging to 66 species of São Paulo portion of the Paraíba do Sul river. The average K2P distance between individuals within species of this basin was 0.48%, and 9,87% between species within a genus. Five pairs of species (10 species) showed low levels of interspecific genetic divergence (<2%),but all could be correctly identified. This study showed that the fish species analyzed could be identified efficiently through the use of barcode generating data that can provide information for further studies of this fauna, besides contributing to the global initiative to characterize the species of fish in the world of a molecular point of view. Five pairs of species (10 species) showed low levels of interspecific genetic divergence (<2%), but all could be correctly identified. This study showed that the fish species analyzed could be identified efficiently through the use of barcode generating data that can provide subsidies for further studies in this fauna, as well as contribute to the global effort to recognize all fish species on Earth from a molecular point of view.

Keywords: Ichthyofauna; Species Identification; DNA *Barcode*; Mitochondrial DNA; Cytochrome c Oxidase subunit I

LISTA DE FIGURAS

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.....15

Figura 2 – Dendrograma compacto obtido por Neighbour-joining (MEGA5.0) com distância K2P , mostrando as 66 espécies analisadas da Bacia do Rio Paraíba do Sul. Em parênteses estão os números de indivíduos sequenciados.....28

Figura 3 – Distribuição dos valores de divergência genética para os 354 espécimes analisados em diferentes categorias taxonômicas.....31

Figura 4 – Valores de divergência genética obtidos na análise por NND para os 354 espécimes analisados.....32

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Média da composição de bases (com desvio padrão) das sequências obtidas dos peixes da bacia do rio Paraíba do Sul.....30

Tabela 2 – Distâncias genéticas (K2P) dentro de diferentes níveis taxonômicos para os 354 espécimes de peixes do rio Paraíba do Sul.....31

Tabela 3 - Pares de espécies que apresentaram valores médios de divergência genética menores que 2%.....32

SUMÁRIO

Resumo	
Abstract	
Lista de figuras	
Lista de tabelas	
1. Introdução	13
1.1.A Bacia do rio Paraíba do Sul	14
1.2. Identificação molecular de espécies (DNA barcoding)	16
2. Objetivos	22
3. Materiais e Métodos	23
3.1 Obtenção de amostras	23
3.2 Métodos	23
3.2.1 Extração de DNA Genômico	23
3.2.1.1 Extração por Tampão de extração	23
3.2.1.2 Extração por Kit Comercial (“DNeasy Tissue Kit” – Qiagen Peqlab)	24
3.2.2 Amplificação da sequência do gene Cox1	25
3.2.3 Purificação das amostras amplificadas	26
3.2.4 Reação de PCR para sequenciamento	26
3.2.5 Limpeza do PCR de sequenciamento	26
3.2.6 Sequenciamento de DNA	27
3.2.7 Análise dos dados	27
4. Resultados	28
5. Discussão	33
6. Conclusão	36
7. Referências Bibliográficas	37
8. Anexos	46

1. Introdução

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). Segundo Castro e Menezes (1998), os peixes, como um todo, sempre tiveram um grande apelo estético, esportivo e alimentar para o ser humano e, por isso, vem sendo estudados, sob diversos ângulos, há muito tempo.

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 A bacia do rio Paraíba do Sul

O rio Paraíba do Sul nasce na confluência dos rios Paraitinga e Paraibuna, tendo um percurso total de 1.120 km, no sentido oeste para leste, numa altitude média de 370m. Seus principais afluentes são os rios Jaguari, o Buquira, o Paraibuna, o Preto, o Pomba e o Muriaé, que se originam nas serras da Mantiqueira e do Mar. Esses dois últimos são os maiores e deságuam, respectivamente, a 140 e a 50 km da foz. A bacia do Paraíba do Sul está situada entre as latitudes 20°26' e 23°39'S e as longitudes de 41° e 46°30'W, possuindo uma área de cerca de 57.000 km², banhando os estados de São Paulo (23,7%) (Figura 1), Minas Gerais (39,6%) e Rio de Janeiro (36,7%) onde deságua. Mesmo localizada entre os maiores centros urbano-industriais do país, ainda abriga uma alta biodiversidade, embora em situação de extrema ameaça (Hilsdorf e Petrere Jr., 2002).

Por muito tempo, esta bacia foi uma excelente área de trabalho para pescadores profissionais. Nas últimas décadas, porém, a diversidade e a quantidade de peixes vem sendo reduzidas por diversos fatores. Os recursos hídricos de todo o vale do Paraíba sofrem impactos desde que a região começou a ser ocupada por fazendas, ainda no período colonial. Essa região passou por vários ciclos agropecuários, desde a implantação das culturas de café e cana-de-açúcar até a formação de pastos para pecuária leiteira. Tais atividades, implantadas sem o devido manejo conservacionista, levaram à derrubada de matas ciliares, ao assoreamento, à poluição das águas (por fertilizantes químicos, pesticidas e outras substâncias) e a inúmeros outros problemas ambientais (Hilsdorf e Petrere Jr., 2002).

Atualmente, somente dois trechos do Paraíba do Sul podem ser navegados: o trecho inferior e o médio superior. O trecho inferior, entre a foz e São Fidélis, numa extensão de aproximadamente 90 km, possui uma declividade de 22 cm/km. Existe uma navegação incipiente efetuada por pequenas embarcações que transportam, essencialmente, materiais de construção para o município de Campos. No trecho médio superior, entre Cachoeira Paulista e Guararema, numa extensão de aproximadamente 280 km, apesar da pequena declividade de 19 cm/km, a navegação restringe-se a embarcações de turismo (Hilsdorf e Petrere Jr., 2002).

Em um recente levantamento ictiofaunístico realizado na bacia do rio Paraíba do Sul foram coletadas 81 espécies pertencentes a 55 gêneros, 29 famílias e nove ordens (Teixeira et al., 2005). Segundo esses autores, no trecho superior do rio (o que corresponde à área a ser estudada no presente projeto) foram coletadas 27 espécies no período de cheia e 24 espécies no período de seca. Castro e Menezes (1998), em uma revisão dos dados de literatura, relatam a ocorrência de 17 famílias e aproximadamente 77 espécies de peixes na parte paulista dessa

bacia, sem discriminá-las nominalmente. Um levantamento minucioso, realizado por Lima (1998), mostrou a presença de 32 espécies na região do alto curso do rio Paraíba do Sul, no Estado de São Paulo. Uma análise das espécies coletadas e disponíveis na coleção do Laboratório de Biologia e Genética de Peixes do Instituto de Biociências, UNESP, campus de Botucatu, mostra a ocorrência de 48 espécies (Anexo 1), das quais 12 foram identificadas apenas no nível de gênero. As divergências verificadas nos números citados acima justificam uma nova e detalhada análise da ictiofauna da porção paulista do rio Paraíba do Sul, principalmente tendo em vista que essa é uma das mais impactadas bacias do Estado.

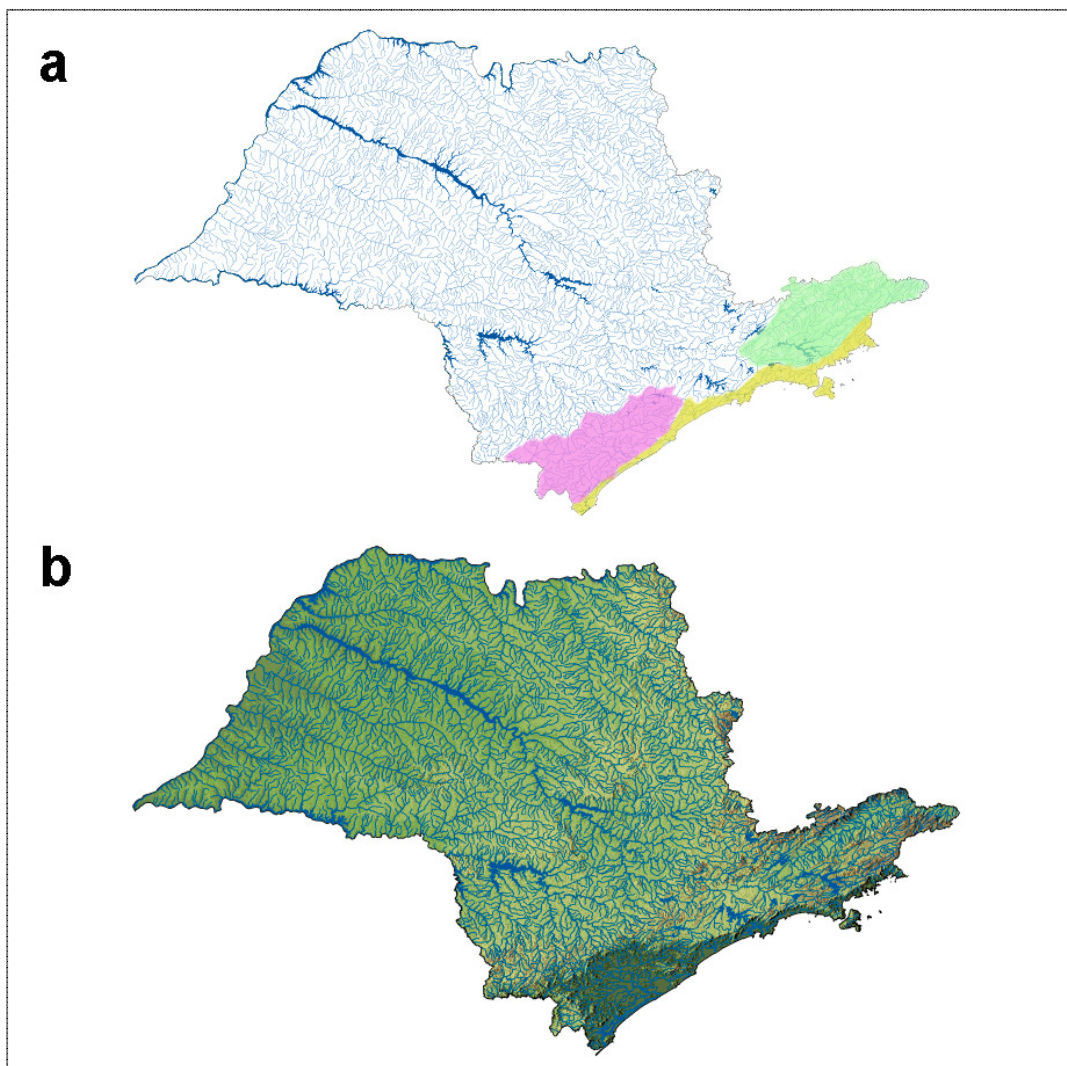


Figura 1. Mapas de São Paulo. (a) hidrografia do Estado (escala 1:250.000): em branco os componentes do sistema do Alto rio Paraná, em rosa os componentes do sistema do rio Ribeira de Iguape, em verde os componentes do sistema do Alto rio Paraíba do Sul e em laranja os

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.

1.2 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).

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 sequências 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 (Avise, 1994) e hoje constituem um dos principais sustentadores desse tipo de investigação. Nos estudos taxonômicos essas ‘novas’ categorias de dados tem 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 a nossa descrição de uma nova espécie de tainha, *Mugil rubrioculus* (Harrison et al., 2007) e de uma nova espécie de *Moenkhausia* (Benine et al., 2009). 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 c Oxidase I* (COI) como um sistema universal de identificação adequado para a maioria das espécies animais (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 gerar um banco de dados de códigos de barra, sequências parciais de DNA do gene COI, da biodiversidade global, com o objetivo de facilitar o processo de automação da identificação das espécies. Para sustentar o caráter de sistema “global” de identificação de animais, o *DNA barcoding* deve envolver padronização, ou seja, as variáveis técnicas e as formas de análise não podem variar amplamente ao analisar-se diferentes grupos mas, ao contrário, serem o mais constantes possíveis. Desta forma a filosofia do *DNA barcoding* indica que *primers* que se aplicam à amplificação do gene COI em uma vasta gama de espécies são preferidos aos específicos. Também por uma questão de padronização, as análises de dados de *barcoding* usam o algoritmo de Neighbor-Joining (NJ) para a representação gráfica das distâncias entre os grupos e o Kimura 2 parâmetros (K2P) como modelo de substituição de nucleotídeos (Casiraghi et al., 2010).

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 sequências de DNA por Tautz et al. (2002, 2003) denominado *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, segundo os proponentes dessa metodologia, na 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 sequências de DNA deixassem de ser um elemento auxiliar na identificação de espécie e passassem 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; Carvalho et al., 2007) 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 *barcoding*, ainda que exista uma similaridade em relação ao uso de sequências de DNA, porém com finalidades totalmente diferentes.

Essencialmente, o que os usuários da metodologia de DNA *barcoding* pretendem é tornar possível a 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).

A princípio, alguns críticos sugeriram que o DNA *barcoding* não seria uma atividade científica porque não visaria testar hipóteses e gerar conhecimento, mas sim 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 sequências encontradas para cada indivíduo, mas sim procuram interpretar as semelhanças e diferenças entre essas sequências 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 uma 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 *barcode gap*. Os proponentes do uso do DNA *barcode* 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 a nível de espécie, enquanto uma diferença abaixo desse limite indicaria uma identidade taxonômica entre as amostras. Além disso, a existência de um *barcode gap* tornaria possível a identificação de espécies não descritas (Hebert et al., 2004b; Smith et al., 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.

Enquanto estudos em peixes (Ward et al., 2005; Hubert et al., 2008; Valdez-Moreno et al., 2009; Ward et al., 2009), aves (Hebert et al., 2004a), artrópodes (Hogg e Hebert, 2004; Barrett e Hebert, 2005; Stahls e Savolainen, 2008) e plantas (Kress et al., 2005) corroboram a existência do *barcode gap*, outros estudos em gastrópodes (Meyer e Paulay, 2005), moscas (Meier et al., 2006) e borboletas (Brower, 2006; 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 COI diferem entre táxons mais antigos e mais recentes, como seria esperado.

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. Por essa razão, no presente estudo, o trabalho foi conduzido em conjunto, por especialistas em Biologia Molecular e Taxonomia de peixes.

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 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.

Segundo Rubinoff (2006), Hajibabaei et al. (2007), Godfray (2007) e Miller (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 *barcode* pode servir como ponto de partida para a seleção de táxons e as sequências de DNA obtidas nos projetos de DNA *barcoding* podem ser adicionadas ao conjunto de sequências 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 ambiguidades. 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 sequenciamento 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.

Há hoje diversas iniciativas voltadas ao estudo de DNA *barcoding* com peixes de todo o mundo (informações podem ser obtidas no sítio www.fishbol.org), incluindo a América do Sul. O presente projeto faz parte de um levantamento mais amplo que pretende gerar um banco de dados de todas as espécies de peixes do Estado de São Paulo e sua respectiva identificação molecular.

2. Objetivos

Considerando o escasso conhecimento que se tem sobre a fauna de peixes da bacia do rio Paraíba do Sul no Estado de São Paulo, considerando a ampla diversidade de peixes dessa bacia, considerando o impacto ambiental que esses corpos d'água vêm enfrentando ao longo de sua história e considerando os dados bastante promissores já obtidos para diversos grupos de plantas e animais com o uso do método de Código de Barras na caracterização de espécies (DNA *barcoding*), como discutido acima, o presente projeto tem por objetivos gerais:

- 1- Realizar um inventário de todas as espécies coletadas na bacia do rio Paraíba do Sul no Estado de São Paulo.
- 2- Realizar o sequenciamento de segmentos parciais do gene mitocondrial COI para todas as espécies de peixes encontradas na bacia do rio Paraíba do Sul no Estado de São Paulo.
- 3- Avaliar a capacidade das sequências do gene COI em discriminar as diferentes espécies presentes nessa bacia hidrográfica.
- 4- Analisar, detalhadamente, os casos de possíveis espécies crípticas, comparando as sequências obtidas no presente estudo com sequências de espécies comuns a outras bacias hidrográficas.
- 5- Criar um sistema de identificação molecular dos peixes da bacia do rio Paraíba do Sul no Estado de São Paulo.

3. Materiais e Métodos

3.1 Obtenção de amostras

Foram realizadas expedições de coleta que acrescentaram diversos lotes e exemplares de peixes à nossa coleção. Os exemplares coletados tiveram um fragmento de músculo, guelra ou nadadeira removido e preservado em etanol 95% sob temperatura de -20°C para estudos moleculares. Todos os espécimes foram identificados por taxonomistas e posteriormente foram fixados em solução de formol 10% e preservados em álcool 70%. Todos os peixes coletados foram depositados na Coleção do Laboratório de Biologia e Genética de Peixes (LBP) do Instituto de Biociências da UNESP - Botucatu.

Dados dos espécimes, incluindo informações do local de coleta (coletores e coordenadas) e da taxonomia dos espécimes, estão registrados no BOLD (www.boldsystems.org), sob o projeto “Fishes from Paraíba do Sul River, Brazil” (código FPSR).

3.2 Métodos

3.2.1 Extração de DNA Genômico

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

3.2.1.1 Extração por tampão salino (Aljanabi & Martinez, 2001)

1. Prepara-se uma solução MIX contendo:

<i>Soluções</i>	Volume
Tampão de Extração - (30 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, 1% SDS)	290,0 l
Proteinase K (10 mg/ml)	10,0 l

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 l de solução de NaCl 5M e mistura-se bem vertendo o tubo vagorosamente.

5. Centrifuga-se a 10.000 rpm por 10 minutos à temperatura ambiente.

6. Remove-se 300 l de sobrenadante e transfere-se para um novo tubo de 1,5 ml.

7. Adiciona-se 600 l 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 μ l de água ultrapura autoclavada. Deixa-se na bancada ou na geladeira por pelo menos 24 horas para hidratação.
13. Aliquota-se o DNA e guarda-se cerca de 150 μ l 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 μ l 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 μ l 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 μ l 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 μ l 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 μ l 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 μ l 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 μ l 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 do COI por PCR

O fragmento de 652 pares de bases da extremidade 5' do gene mitocondrial Citocromo Oxidase subunidade I (COI), correspondente ao *barcode*, foi amplificado usando diferentes combinações de *primers*: Fish F1 5'- TCAACCAACCACAAAGACATTGGCAC - 3', Fish F2 5'- TCGACTAATCATAAAGATATCGGCAC - 3', Fish R1-5' - TAGACTTCTGGGTGGCCAAAGAATCA - 3'; Fish R2 - 5' - ACTTCAGGGTGACCGAAGAATCAGAA - 3', descritos por Ward *et al.* (2005), L6252 - Asn 5'-AAGGCGGGGAAAGCCCCGGCAG-3', H7271 - COXI 5'- TCCTATGTAGCCGAATGGTTCTTTT - 3' desenhados em nosso laboratório e os cocktails C_FishF1t1-C_FishR1t1 e C-VF1LFt1-C_VR1LRt1, com caudas M13 (Ivanova et al., 2007).

A amplificação foi efetuada em termocicladores de PCR utilizando-se de uma solução contendo 6,1 μ l de água ultra pura (milli-Q), 2,0 μ l de tampão para PCR 5x, 0,5 de cada primer (10 μ M), 0,2 de dNTP mix (2 μ M), 0,2 de Phire Hot Start II DNA Polymerase (Finnzymes, Thermo Fisher Scientific, Finland) e 0,5 μ l de DNA template. O programa de PCR consiste em um passo inicial de desnaturação a 98 °C por 5 minutos, seguidos de 30 ciclos de desnaturação a 98 °C por 5 segundos, anelamento a 56 °C por 15 segundos e extensão a 72 °C por 30 segundos, seguido de um passo final de extensão a 72 °C por 1 minuto.

Os segmentos de DNA amplificados foram visualizados em gel de agarose a 1% corados com Blue Green Loading Dye I (LGC Biotecnologia).

3.2.3 Purificação das Amostras Amplificadas

Após checagem da amplificação, os produtos de PCR passaram por reação de limpeza através do kit ExoSap-IT[®] (USB Corporation) seguindo as recomendações do fabricante: Em um tubo *ependorf* prepara-se uma reação contendo 5,0 μ l do DNA amplificado juntamente com 2,0 μ l da solução de ExoSap e leva-se para o termociclador por 60 minutos a 37 °C seguidos de 15 minutos à 80 °C

3.2.4 Reação de Sequenciamento

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

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

<i>Soluções</i>	<i>Volume</i>
DNA (Amplificado e purificado com ExoSap-IT)	1,40 μ l
<i>Primer</i> (10 μ M)	0,35 μ l
Solução Pré-MIX (Kit BigDye)	0,70 μ l
Tampão 5X (Kit Bigdye)	1,05 μ l
H ₂ O Autoclavada	3,50 μ l
<i>Volume Final</i>	7,00 μl

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

Passo	Processo	Temperatura	Tempo
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 μ l de EDTA (125mM);
2. Adiciona-se em cada tubo: 0.7 μ l de Acetato de Sódio (3 M)
3. Homogeneizar e passar no spin brevemente;
4. Adicionar 17,5 μ 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 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 do DNA

As sequências foram obtidas através da técnica de sequenciamento por capilaridade no sequenciador ABI3130 (Perking-Elmer) do Laboratório de Biologia e Genética de Peixes (LBP), no Departamento de Morfologia do Instituto de Biociências da UNESP, campus de Botucatu.

3.2.7 Análise dos Dados

As sequências obtidas foram editadas através dos programas ATGC (*Genetyx Corporation*) e SeqScape v.2.6 (Applied Biosystems, Inc.) para a obtenção de sequências consenso, e o software BioEdit Sequence Alignment Editor (Hall, 1999) foi usado para verificar a existência de indels ou stop códons.

As distâncias genéticas dentro e entre espécies foram calculadas usando o modelo de substituição de nucleotídeos Kimura-2-parâmetros (k2P) (Kimura, 1980), o qual foi escolhido por apresentar um melhor desempenho quando as distâncias genéticas são baixas (Nei e Kumar, 2000; Hebert et al., 2003), como é o caso das comparações entre espécies, e os padrões de divergência sugeridos por estas distâncias foram graficamente representados usando um dendograma de Neighbor-Joining (NJ) com 1000 réplicas de bootstrap feito no MEGA v5.0 (Tamura et al., 2011). O método de NJ é empregado devido ao seu histórico de bom desempenho na análise de grandes conjuntos de dados (Kumar e Gadagkar, 2000; Hebert et al., 2003).

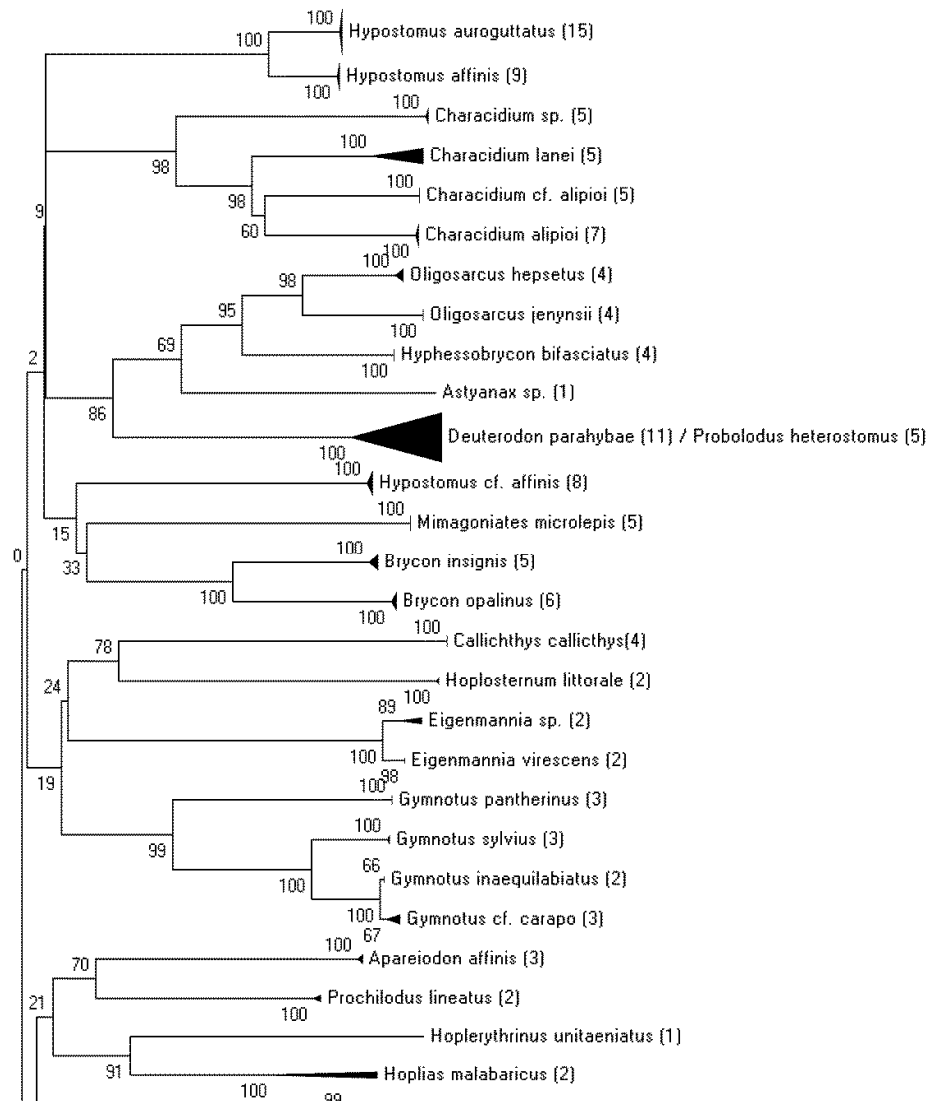
O alinhamento das sequências foi realizado utilizando o programa ClustalW, disponível no DAMBE (Xia e Xie, 2001), ou através das ferramentas do BOLD (Ratnasingham e Hebert, 2007). A composição média de nucleotídeos e as análises de distância ao vizinho mais próximo (NND - Nearest-neighbor distance analysis) foram realizadas utilizando as ferramentas do BOLD (Ratnasingham e Hebert, 2007).

4. Resultados

O número de espécimes analisados foi de 354, variando de um a 21 indivíduos por espécie, com valor médio de 5,3 (Anexo 1). Para 60,6% (40) das espécies foram analisados pelo menos cinco indivíduos de acordo com as recomendações do CBOL (Consortium for The *Barcode* of Life), para a caracterização da sequência *barcode* de uma espécie, uma vez que contemplaria a diversidade intra-específica existente.

Foram obtidas e analisadas 354 sequências de DNA *barcode*, pertencentes a 18 famílias, 45 gêneros e 66 espécies, as quais foram utilizadas para obtenção de um dendograma, através do método de Neighbor-Joining (Anexo 2).

Todos os exemplares foram corretamente agrupados de acordo com sua espécie (Figura 2).



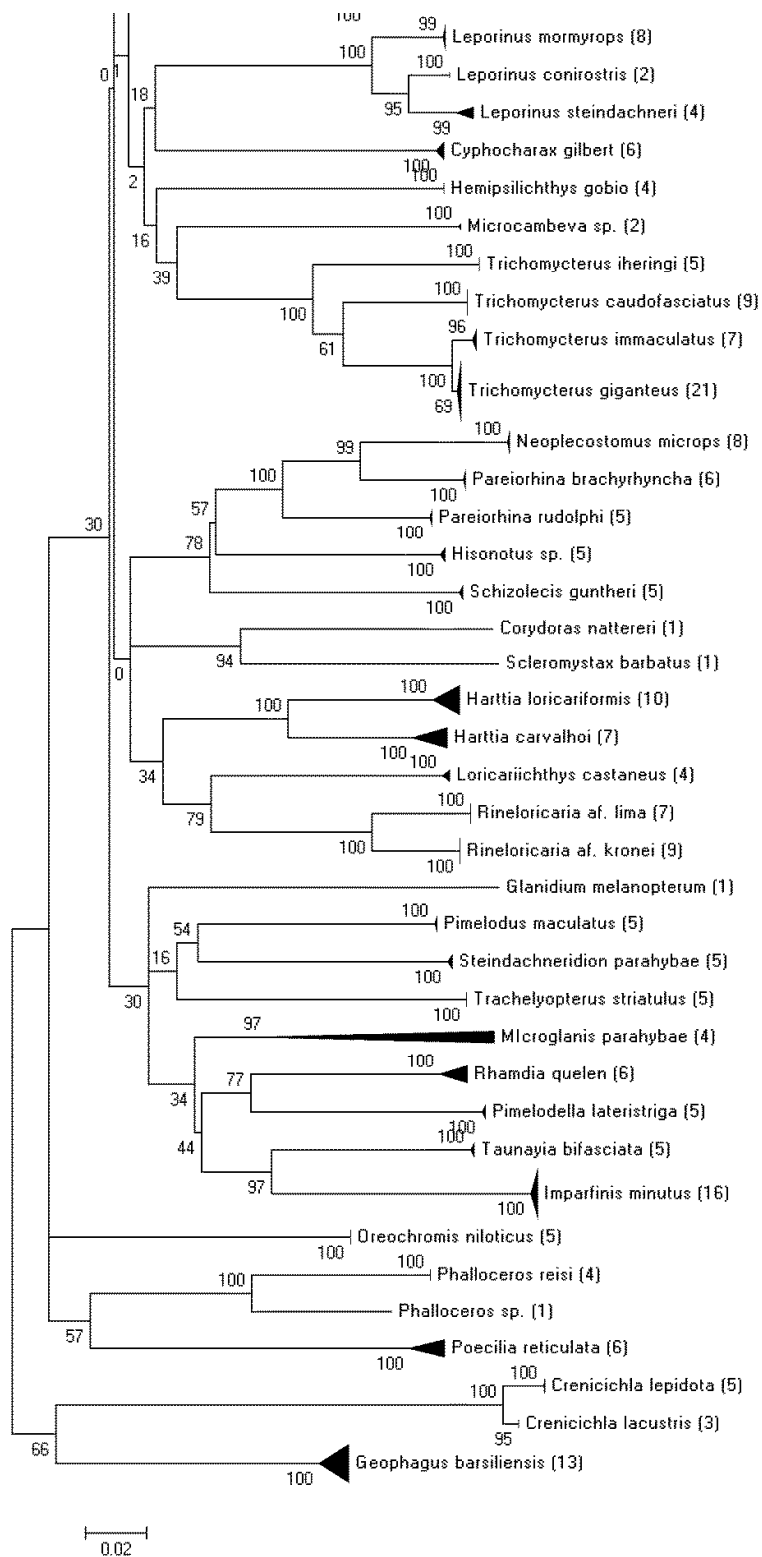


Figura 2. Dendrograma compacto obtido por Neighbour-joining (MEGA5.0) com distância K2P, mostrando as 66 espécies analisadas da Bacia do Rio Paraíba do Sul. Em parênteses estão os números de indivíduos sequenciados

As sequências obtidas apresentaram tamanho médio de 650 pares de bases. Não foram encontradas inserções ou deleções, bem como *stop-codons* (códon terminadores) condizentes com o fato de se tratar de uma região codificante do DNA mitocondrial, sugerindo que não foram sequenciados NUMTs (*nuclear DNA sequences originating from mitochondrial DNA sequences*). Em vertebrados, sequências NUMTs tipicamente possuem um tamanho inferior a 600pb (Zhang & Hewitt 1996). A média das frequências nucleotídicas das sequências obtidas pode ser observada na Tabela 1.

Tabela1. Média da composição de bases (com desvio padrão) das sequências obtidas dos peixes da bacia do rio Paraíba do Sul.

	Mín	Média	Máx	Desvio Padrão
G %	15.64	18.28	20.57	0.053
C %	21.61	27.26	32.85	0.111
A %	21.83	24.16	27.02	0.068
T %	25.95	29.86	35.51	0.103
GC %	39.88	45.54	50.92	0.134
GC % Códon Pós 1	50.61	55.97	60.74	0.093
GC % Códon Pós 2	41.31	42.71	44.61	0.022
GC % Códon Pós 3	24.19	37.94	52.91	0.357

A árvore de Neighbor-Joining (Anexo2) mostra que os espécimes determinados como coespecíficos tendem a se agrupar em unidades relativamente coesas. A distância genética K2P média dentro das espécies (0,48%) foi cerca de 20 vezes inferior à distância média dentro de gêneros (9,87%), portanto há, em média, 20 vezes mais variação entre espécies de um mesmo gênero que entre os indivíduos de uma mesma espécie. A variação genética mostrou-se progressivamente maior nas categorias taxonômicas superiores (Tabela 2). Distribuições nas médias de distância genética K2P intra e interespecíficas de um mesmo gênero, são parcialmente sobrepostas, como podemos observar na Tabela 2, variando de 0 a 14,86% entre indivíduos coespecíficos e 0,664% a 23,165% entre indivíduos co-gênericos. Os gráficos da Figura 3 mostram a distribuição dos valores de divergência genética dentro de cada categoria.

Tabela 2. Distâncias genéticas (K2P) dentro de diferentes níveis taxonômicos para os 354 espécimes de peixes do rio Paraíba do Sul

	Divergência genética (%)						
	N	Taxa	Comparações	Mín	Média	Máx	Desvio Padrão
Dentro de espécies	347	60	1211	0	0.481	14.86	0.035
Dentro de gêneros	348	40	1424	0.664	9.879	23.165	0.159
Dentro de famílias	353	18	5827	1.608	20.337	28.506	0.045
Dentro de ordens	353	5	17603	16.099	23.244	32.525	0.015
Dentro de classes	353	1	36063	18.104	24.954	37.4	0.016

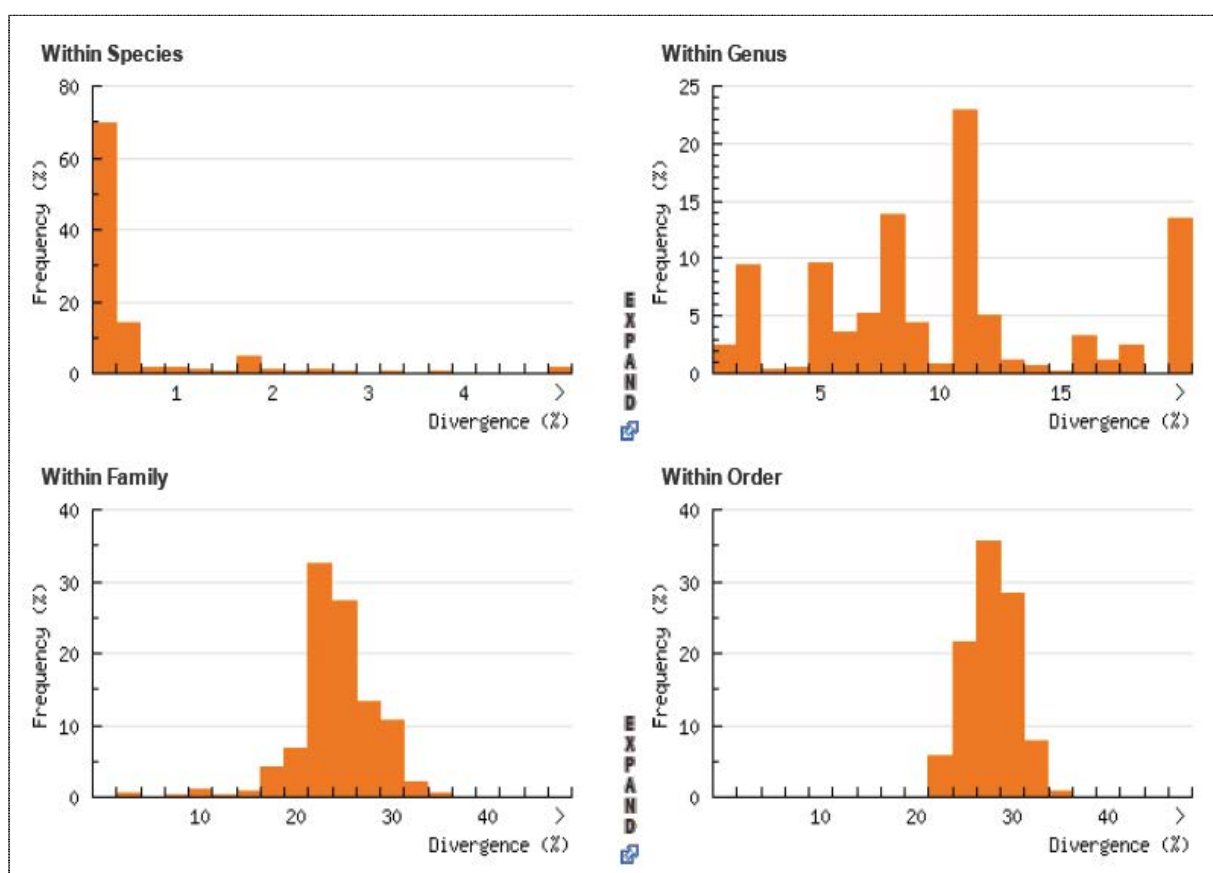


Figura 3. Distribuição dos valores de divergência genética para os 354 espécimes analisados em diferentes categorias taxonômicas.

A análise da distribuição de distância para o vizinho mais próximo (*nearest – neighbor distance -NND*), ou seja, análise da distância genética mínima entre espécies e seus parentes mais próximos, revelou que 87% das médias de variação genética intra-específica estão

abaixo de 1% e mostraram claramente a existência de um “barcode gap” permitindo a discriminação das espécies com alto nível de segurança, com um valor de distância genética K2P médio de 11,22% (variando de 0,66 a 21,32%) entre espécies que apresentaram mais de 2% de divergência genética para a espécie mais próxima (Figura 4).

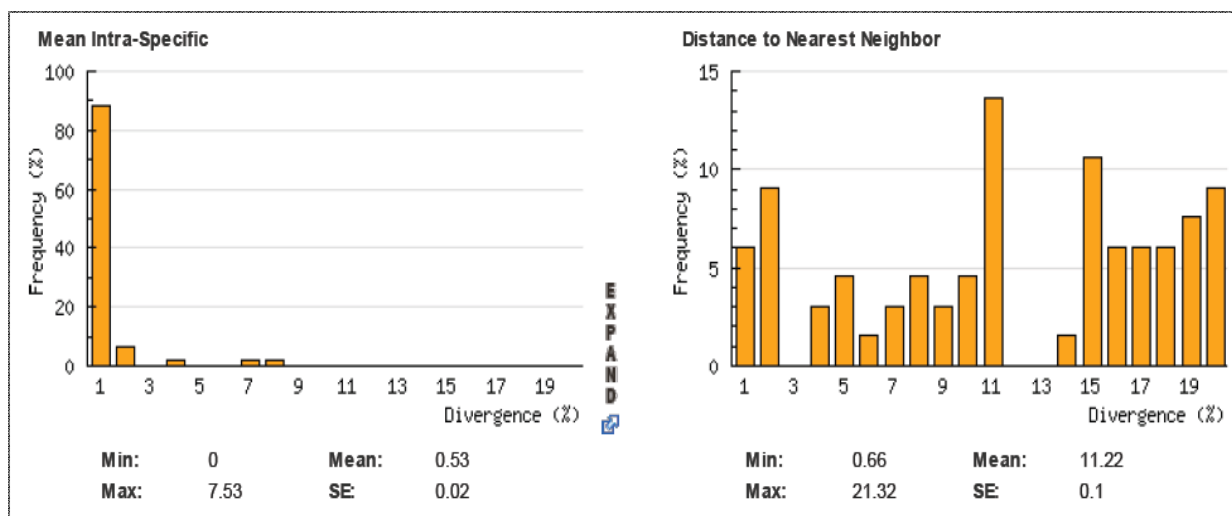


Figura 4. Valores de divergência genética obtidos na análise por NND para os 354 espécimes analisados.

As análises pelo método de NND mostraram cinco pares de espécies com distância genética K2P menores que 2% (Anexo 3, Tabela 3). Ainda que baixos esses valores, permitiram a discriminação entre estes pares de espécies.

Tabela 3. Pares de espécies que apresentaram valores médios de divergência genética menores que 2%.

Pares de Espécies		Divergência (%)
<i>Deuterodon parahybae</i>	<i>Probolodus heterostomus</i>	1,61
<i>Gymnotus cf. carapo</i>	<i>Gymnotus inaequilabiatus</i>	0,66
<i>Eigenmannia sp.</i>	<i>Eigenmannia virescens</i>	1,24
<i>Crenicichla lepidota</i>	<i>Crenicichla lacustres</i>	1,81
<i>Trichomycterus giganteus</i>	<i>Trichomycterus immaculatus</i>	0,93

5. Discussão

A abordagem do DNA *barcoding* surge de uma crescente necessidade de obter conhecimento sobre a biodiversidade de uma forma mais acurada e mais rápida. Pressões, como superexploração, urbanização e perda dos habitats são ameaças reais a todas as formas de vida e a identificação de espécies é o primeiro passo para delinear as ações de conservação. Com relação aos peixes, a identificação errônea ou imprecisa de espécies é um problema significativo para o cultivo de estoques e o controle da pesca (Leonart et al, 2006), e abordagens exclusivamente morfológicas tem limitações para a identificação de indivíduos jovens, avariados ou fragmentados, bem como para a identificação de taxa crípticos.

O sucesso do DNA *barcoding*, depende da distribuição das distâncias genéticas entre indivíduos coespecíficos e co-genéricos dado que falhas no agrupamento utilizando essa técnica são proporcionais à sobreposição entre essas duas distribuições (Meyer, 2005). Neste estudo, a distância genética média aumentou progressivamente em níveis taxonômicos superiores (Tabela 2, Figura 3).

A presente investigação de DNA *barcoding* permitiu a identificação correta das 66 espécies analisadas (100%) por meio das duas metodologias de análises empregadas (distância genética e NJ). Esses resultados são condizentes aos encontrados na literatura sobre a identificação molecular de ictiofaunas pela metodologia do DNA *barcoding*. Ward et al. (2005) analisaram 207 espécies de peixes marinhos da costa australiana, discriminando todas as espécies, Hubert et al. (2008) obtiveram as sequências *barcode* para 190 espécies de peixes de água doce do Canadá, discriminando corretamente 93% das espécies analisadas. Em outro estudo, Valdez-Moreno et al. (2009) avaliaram 61 espécies de peixes de água doce do México e Guatemala discriminando corretamente 93% das espécies. Mais recentemente, Lara et al. (2010) obtiveram as sequências *barcode* de 27 espécies de peixes de água doce de Cuba conseguindo uma resolução de 96%, enquanto que Ward (2009) analisando as sequências *barcode* de 1088 espécies de peixes que se encontravam depositadas no BOLD encontrou uma eficácia de discriminação de 97,5%.

No decorrer do estudo, os indivíduos que apresentaram perfis do gene COI que divergiam do padrão esperado pela sua identificação baseada em caracteres morfológicos eram resubmetidos às avaliações morfológicas, a fim de encontrar possíveis fontes de erro na identificação inicial ou de problemas como a presença de indivíduos pertencentes a duas espécies diferentes no mesmo lote da Coleção. Para alguns indivíduos a inadequação foi comprovada e uma reidentificação consciente pôde ser feita. Porém, para outros, o veredito

molecular e morfológico não coincidiu, ocasionando casos em que indivíduos de duas espécies diferentes compartilham sequências *barcode* próximas entre si. Enquanto a maioria das espécies analisadas apresentou divergência genética entre 3,08 e 21,32% em relação a seu grupo mais próximo, cinco pares de espécies divergiram menos que 2% entre si (Tabela3). Ainda que baixos esses valores permitiram a discriminação entre estes pares de espécies.

O DNA *barcode* utiliza dendogramas como forma de demonstrar graficamente os resultados de distância genética, o que pode gerar alguma confusão entre o real propósito desta abordagem – identificar e delimitar espécies - e a atividade de reconstrução filogenética, na qual são usados cladogramas para representar as relações de parentesco entre grupos. DNA *barcode* não tem sinal filogenético suficiente para resolver relações evolutivas, especialmente em níveis mais profundos, e uma análise filogenética deve levar em consideração muitos *loci* para ter uma resolução adequada e evitar um resultado enviesado pelo comportamento evolutivo de um único gene (Hajibabaei et al., 2007). Indo de acordo com a filosofia de padronização do DNA *barcode*, o Neighbor-Joinig (NJ) é o método construção de árvores escolhido e a correção Kimura-2-parâmetros (K2P) é o modelo de substituição de nucleotídeos utilizado. Comparando o desempenho de diferentes métodos de construção de árvores com dados de *barcode*, Austerlitz et al. (2009) concluem que nenhum dos métodos testados parece ser o melhor em todos os casos, dependendo do tempo de divergência entre os grupos, o tamanho da amostra e o número de espécies analisadas, por exemplo. Quanto à correção utilizada, K2P é considerado o melhor modelo de substituição para distâncias genéticas pequenas (Nei e Khumar, 2000; Felsenstein, 2004).

Desde que foi proposto como um sistema global para a identificação de animais (Hebert et al., 2003b), o DNA *barcoding* tem mostrado um desempenho satisfatório em discriminar com acurácia um grande número de espécies (Frezal e Leblois, 2008), como corrobora o presente trabalho.

Assim que projeto de DNA *barcode* completar 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.

Estudos utilizando marcadores moleculares de DNA mitocondrial foram realizados e permitiram conhecer a variabilidade genética de populações selvagens e em cativeiro do rio Paraíba do Sul, gerando dados valiosos para planejar a formação e o manejo do estoque

reprodutor, indicar áreas para conservação de populações isoladas geneticamente e orientar programas de repovoamento (Hiltsdorf e Petreire Jr., 2002). Com o conhecimento prévio da variabilidade genética dentro e entre populações de espécies pertencentes à bacia do rio Paraíba do Sul, o planejamento e o sucesso de programas de conservação in situ e de repovoamento da ictiofauna terão mais sucesso.

6. Conclusão geral

Os resultados demonstraram a boa eficácia do método molecular (DNA *barcoding*) na correta identificação das espécies de peixes pertencentes à porção analisada da Bacia do rio Paraíba do Sul (100%).

O uso combinado de diferentes abordagens de análise para os dados de DNA *barcoding* foi bastante útil e eficaz, permitindo a discriminação de espécies mesmo com valores de divergência genética baixos.

Com o uso do método de DNA *barcoding*, será possível a qualquer um com acesso a sequenciamento de DNA e internet a identificação de peixes, a partir 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.

7. 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.
- Austerlitz, F.; David, O.; Schaeffer, B.; Bleakley, K.; Olteanu, M.; Leblois, R.; Veuille, M.; Laredo, C. DNA barcode analysis: a comparison of phylogenetic and statistical classification methods. *BMC Bioinformatics*, v.10 Suppl s1, p. 257-68, May 2009.
- 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.
- Avise, J. C. (1994). *Molecular markers, natural history and evolution*. New York: Chapman & Hall.
- Barrett, R. D. H., Hebert, P. D. (2005). Identifying spiders through DNA *barcodes*. *Can J Zool*, 83:481-491.
- Benine, R.C., Mariguela, T.C., Oliveira, C. (2009). New species of *Moenkhausia* Eigenmann, 1903 (Characiformes: Characidae) with comments on the *Moenkhausia oligolepis* species complex. *Neotropical Ichthyology*, 7(2):161-168.
- 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 *Astraptes fulgerator* reassessed (Lepidoptera: HesperIIDae). *Syst Biodiv*, 4(2):127-132.
- Carvalho, M.R., Bockmann, F.A., Amorim, D.S. et al. (2007). Taxonomic Impediment or Impediment to Taxonomy? A Commentary on Systematics and the Cybertaxonomic-Automation Paradigm. *Evol Biol*, 34:140-143.

Casiraghi, M.; Labra, M.; Ferri, E.; galimberti, A.; De Mattia, F. DNA Barcoding: a six question tour to improve user's awareness about the method. *Briefings in Bioinformatics*, v.11, n.4, p.440-53, Jul 2010.

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

Clare, L. E. *et al.*. (2007). DNA barcoding of Neotropical bats: species identification and discovery within Guyana. *Molecular Ecology Notes*, 7: 184-190.

Clement M.; Posada D. & Crandall K. A. (2000). TCS: A computer program to estimate gene genealogies. *Molecular Ecology*, 9:1657–1659.

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.

Edgar, R.C. (2004). MUSCLE: a multiple sequence alignment method with reduced time and space complexity. *BMC Bioinformatics*, 5(1): 113.

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. *Inferring phylogenies*. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts, 2004.

- Felsenstein, J. (1985). Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution*, 39: 783-791.
- Fink, S.V., Fink, W.L. (1981). Interrelationships of the ostariophysan fishes (Teleostei). *Zool J Linn Soc Lond*, 72: 297-353.
- Frezal, L.; Leblois, R. Four years of DNA barcoding: current advances and prospects. *Infect Genet Evol*, v. 8, n. 5, p. 727-36, Sep 2008.
- Godfray, H.C.J. (2007). Linnaeus in the information age. *Nature*, 446:259-260.
- 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.
- Hall, T. A. BoiEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, v. 41, p. 95-98, 1999.
- 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 (supl. A): 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.

Henriques, J.M. Identificação molecular (DNA *Barcode*) dos peixes da bacia do rio Ribeira do Iguape e dos rios costeiros do estado de São Paulo. 2010. p.105. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas A/C Zoologia) – Instituto de Biociências, UNESP, Botucatu, 2010.

Hillis, D. M., Moritz, C., Mable, B. K. (1996). *Molecular Systematics*. Massachusetts: Sinauer Associates Incorporation.

Hilsdorf, A.W.S.; Petrere Jr., M. 2002. Conservação de peixes na bacia do Rio Paraíba do Sul. Ciência Hoje. v.30. 62-65.

Hogg, I.D., Hebert, P.D.N. (2004). Biological identification of springtails (Collembola: Hexapoda) from the Canadian Arctic, using mitochondrial DNA *barcodes*. Can J Zool, 82: 749–754.

Ivanova, N.V., Zemplak, T.S., Hanner, R.H., Hebert, P.D.N. Universal primer cocktails for fish DNA barcoding. Molecular Ecology Notes, v. 7, n. 4, p. 544-548, 2007.

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.

Kimura, M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution*, v. 16, p. 111-120, 1980.

Köhler, F. (2007). From DNA taxonomy to barcoding - how a vague idea evolved into a biosystematic tool. *Zool Reihe*, 83:44-51.

Kress, W.J., Wurdack, K.J., Zimmer, E.A., Weigt, L.A., Janzen, D.H. (2005). Use of DNA barcodes to identify flowering plants. *Proc Natl Acad Sci USA*, 102: 8369-8374.

Kumar, S., Gadadkar, S. Efficiency of the neighbor-joining method in reconstructing deep and shallow evolutionary relationships in large phylogenies. *J. Mol. Evol.*, v. 51, p. 544-553, 2000.

Lima, R.S. (1998). Ictiofuna do alto curso do rio Paraíba do Sul. Dissertação de mestrado. Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo. Não publicada. 221.

Lipscomb, D., Platnick, N., Wheeler, Q. (2003). The intellectual content of taxonomy: a comment on DNA taxonomy. *Trends Ecol Evol*, 18:65-66.

Lleonart, J; Taconet, M; Lamboeuf, M. Integrating information on marine species identification for fishery purposes. *Marine Ecology Progress Series*, v.316, p. 231-238, 2006.

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 CP, Paulay G (2005) DNA barcoding: error rates based on comprehensive sampling. *PLOS Biology* 3: 2229–2238.

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. *Molecular evolution and phylogenetics*. New York, USA: Oxford University Press, 2000.

Nixon, K. C., Wheeler, Q. D. (1990). An amplification of the phylogenetic species concept. *Cladistics*, 6:211–223.

Pereira, LHG. Identificação molecular dos peixes da bacia do Alto Rio Paraná. 2011. p.177. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas A/C Zoologia) – Instituto de Biociências, UNESP, Botucatu, 2011.

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.

Posada, D., Crandall, K.A. (1998). Modeltest: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics*, 14: 817-818.

Ratnasingham, S., Hebert, P.D.N. (2007). Bold: The *barcode* of life data system (www.barcodinglife.org). *Mol Ecol Notes*, 7: 355-364.

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.O. Identificação molecular dos peixes marinhos das regiões sudeste e sul do Brasil com ênfase no estado de São Paulo. 2012. p.77. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas A/C Genética) – Instituto de Biociências, UNESP, Botucatu, 2012.

Rubinoff, D. (2006). DNA barcoding evolves into the familiar. *Cons Biol*, 20:1548-1549.

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., 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.

Stahls, G., Savolainen, E. (2008). MtDNA COI *barcodes* reveal cryptic diversity in the *Baetis vernus* group (Ephemeroptera, Baetidae). *Mol Phylogenet Evol*, 46:82–87.

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.

Swofford, D.L. (2002). PAUP* - Phylogenetic analysis using parsimony (*and other methods). Version 4.0b10. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates.

Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., Kumar, S. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution*, v. 28, n. 10, p. 2731-2739, Oct 2011.

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.

Teixeira, T.P., Pinto, B.C.T., Terra, B.F., Estiliano, E.O., Gracia, D., Araújo, F.G. (2005). Diversidade das assembléias de peixes nas quatro unidades geográficas do rio Paraíba do Sul. *Iheringia, Sér Zool, Porto Alegre*, 95(4):347-357.

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.

Valdez-Moreno, M., Ivanova, N. V., Elías-Gutiérrez, M., Contreras-Balderas, S., & Hebert, P. D. N. 2009. Probing diversity in freshwater fishes from Mexico and Guatemala with DNA *barcodes*. *J Fish Biol*, 74(2): 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.

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.

Ward, R.D., Hanner, R., Hebert, P.D.N. 2009. The campaign to DNA *barcode* all fishes, FISH-BOL. J Fish Biol, 74:329–356.

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>. 01/05/2007.

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).

8. Anexos

Anexo 1. Lista dos espécimes analisados no presente trabalho.

Número do Bold	Voucher	COI pb	Data de Coleta	Espécie
FPSR066-09	LBPV-29063	655	09-Apr-2008	<i>Apareiodon affinis</i>
FPSR067-09	LBPV-29064	655	09-Apr-2008	<i>Apareiodon affinis</i>
FPSR068-09	LBPV-29065	655	09-Apr-2008	<i>Apareiodon affinis</i>
FPSR408-11	LBPV- 49764	599	20-Oct-2010	<i>Astyanax sp.</i>
FPSR259-09	LBPV-16077	652	03-Sep-2004	<i>Brycon insignis</i>
FPSR260-09	LBPV-16078	652	03-Sep-2004	<i>Brycon insignis</i>
FPSR261-09	LBPV-16079	652	03-Sep-2004	<i>Brycon insignis</i>
FPSR262-09	LBPV-16080	652	03-Sep-2004	<i>Brycon insignis</i>
FPSR258-09	LBPV-16076	652	03-Sep-2004	<i>Brycon insignis</i>
FPSR036-09	LBPV-29003	655	01-Apr-2008	<i>Brycon opalinus</i>
FPSR035-09	LBPV-29002	655	01-Apr-2008	<i>Brycon opalinus</i>
FPSR037-09	LBPV-29004	655	01-Apr-2008	<i>Brycon opalinus</i>
FPSR039-09	LBPV-29017	655	01-Apr-2008	<i>Brycon opalinus</i>
FPSR034-09	LBPV-29001	655	01-Apr-2008	<i>Brycon opalinus</i>
FPSR038-09	LBPV-29005	655	01-Apr-2008	<i>Brycon opalinus</i>
FPSR078-09	LBPV-10499	655	25-Jan-2001	<i>Callichthys callichthys</i>
FPSR080-09	LBPV-7595	652	14-Nov-1999	<i>Callichthys callichthys</i>
FPSR081-09	LBPV-29361	655	02-Apr-2008	<i>Callichthys callichthys</i>
FPSR079-09	LBPV-7587	652	14-Nov-1999	<i>Callichthys callichthys</i>
FPSR283-09	LBPV-40202	652	19-May-2009	<i>Characidium alipioi</i>
FPSR420-11	LBPV- 49776	630	20-Oct-2010	<i>Characidium alipioi</i>
FPSR421-11	LBPV- 49777	630	20-Oct-2010	<i>Characidium alipioi</i>
FPSR286-09	LBPV-40205	652	19-May-2009	<i>Characidium alipioi</i>
FPSR285-09	LBPV-40204	652	19-May-2009	<i>Characidium alipioi</i>
FPSR284-09	LBPV-40203	652	19-May-2009	<i>Characidium alipioi</i>
FPSR282-09	LBPV-40201	652	19-May-2009	<i>Characidium alipioi</i>
FPSR064-09	LBPV-20419	634	29-Aug-2004	<i>Characidium cf. alipioi</i>
FPSR060-09	LBPV-20415	655	29-Aug-2004	<i>Characidium cf. alipioi</i>
FPSR061-09	LBPV-20416	655	29-Aug-2004	<i>Characidium cf. alipioi</i>
FPSR062-09	LBPV-20417	655	29-Aug-2004	<i>Characidium cf. alipioi</i>
FPSR063-09	LBPV-20418	652	29-Aug-2004	<i>Characidium cf. alipioi</i>
FPSR380-11	LBPV- 49740	666	20-Oct-2010	<i>Characidium lanei</i>
FPSR438-11	LBPV- 49794	666	20-Oct-2010	<i>Characidium lanei</i>
FPSR376-11	LBPV- 49736	651	20-Oct-2010	<i>Characidium lanei</i>
FPSR378-11	LBPV- 49738	651	20-Oct-2010	<i>Characidium lanei</i>
FPSR379-11	LBPV- 49739	666	20-Oct-2010	<i>Characidium lanei</i>
FPSR406-11	LBPV- 49762	630	20-Oct-2010	<i>Characidium sp.</i>
FPSR407-11	LBPV- 49763	630	20-Oct-2010	<i>Characidium sp.</i>
FPSR405-11	LBPV- 49761	630	20-Oct-2010	<i>Characidium sp.</i>
FPSR403-11	LBPV- 49759	630	20-Oct-2010	<i>Characidium sp.</i>
FPSR404-11	LBPV- 49760	630	20-Oct-2010	<i>Characidium sp.</i>
FPSR082-09	LBPV-29094	655	09-Apr-2008	<i>Corydoras nattereri</i>
FPSR230-09	LBPV-29099	652	09-Apr-2008	<i>Crenicichla lacustris</i>
FPSR229-09	LBPV-29098	652	09-Apr-2008	<i>Crenicichla lacustris</i>
FPSR228-09	LBPV-29077	649	09-Apr-2008	<i>Crenicichla lacustris</i>

FPSR354-11	LBPV- 49714	627	20-Oct-2010	<i>Crenicichla lepidota</i>
FPSR351-11	LBPV- 49711	627	20-Oct-2010	<i>Crenicichla lepidota</i>
FPSR352-11	LBPV- 49712	627	20-Oct-2010	<i>Crenicichla lepidota</i>
FPSR353-11	LBPV- 49713	627	20-Oct-2010	<i>Crenicichla lepidota</i>
FPSR355-11	LBPV- 49715	627	20-Oct-2010	<i>Crenicichla lepidota</i>
FPSR266-09	LBPV-16054	652	03-Sep-2004	<i>Cyphocharax gilbert</i>
FPSR373-11	LBPV- 49733	660	20-Oct-2010	<i>Cyphocharax gilbert</i>
FPSR263-09	LBPV-16051	652	03-Sep-2004	<i>Cyphocharax gilbert</i>
FPSR265-09	LBPV-16053	652	03-Sep-2004	<i>Cyphocharax gilbert</i>
FPSR264-09	LBPV-16052	642	03-Sep-2004	<i>Cyphocharax gilbert</i>
FPSR287-09	LBPV-16050	652	03-Sep-2004	<i>Cyphocharax gilbert</i>
FPSR366-11	LBPV- 49726	584	20-Oct-2010	<i>Deuterodon parahybae</i>
FPSR040-09	LBPV-36321	652	03-Apr-2008	<i>Deuterodon parahybae</i>
FPSR045-09	LBPV-36326	652	03-Apr-2008	<i>Deuterodon parahybae</i>
FPSR389-11	LBPV- 49745	668	20-Oct-2010	<i>Deuterodon parahybae</i>
FPSR386-11	LBPV- 49742	0	20-Oct-2010	<i>Deuterodon parahybae</i>
FPSR372-11	LBPV- 49732	658	20-Oct-2010	<i>Deuterodon parahybae</i>
FPSR388-11	LBPV- 49744	618	20-Oct-2010	<i>Deuterodon parahybae</i>
FPSR371-11	LBPV- 49731	583	20-Oct-2010	<i>Deuterodon parahybae</i>
FPSR370-11	LBPV- 49730	415	20-Oct-2010	<i>Deuterodon parahybae</i>
FPSR369-11	LBPV- 49729	646	20-Oct-2010	<i>Deuterodon parahybae</i>
FPSR364-11	LBPV- 49724	581	20-Oct-2010	<i>Deuterodon parahybae</i>
FPSR365-11	LBPV- 49725	669	20-Oct-2010	<i>Deuterodon parahybae</i>
FPSR367-11	LBPV- 49727	584	20-Oct-2010	<i>Deuterodon parahybae</i>
FPSR345-11	LBPV- 49705	547	20-Oct-2010	<i>Eigenmannia sp.</i>
FPSR346-11	LBPV- 49706	666	20-Oct-2010	<i>Eigenmannia sp.</i>
FPSR267-09	LBPV-20372	652	30-Aug-2004	<i>Eigenmannia virescens</i>
FPSR281-09	LBPV-40199	652	19-May-2009	<i>Eigenmannia virescens</i>
FPSR247-09	LBPV-16082	652	03-Sep-2004	<i>Geophagus brasiliensis</i>
FPSR417-11	LBPV- 49773	686	20-Oct-2010	<i>Geophagus brasiliensis</i>
FPSR375-11	LBPV- 49735	677	20-Oct-2010	<i>Geophagus brasiliensis</i>
FPSR233-09	LBPV-29369	652	02-Apr-2008	<i>Geophagus brasiliensis</i>
FPSR231-09	LBPV-29367	652	02-Apr-2008	<i>Geophagus brasiliensis</i>
FPSR232-09	LBPV-29368	652	02-Apr-2008	<i>Geophagus brasiliensis</i>
FPSR374-11	LBPV- 49734	677	20-Oct-2010	<i>Geophagus brasiliensis</i>
FPSR246-09	LBPV-16081	652	03-Sep-2004	<i>Geophagus brasiliensis</i>
FPSR250-09	LBPV-16085	652	03-Sep-2004	<i>Geophagus brasiliensis</i>
FPSR249-09	LBPV-16084	652	03-Sep-2004	<i>Geophagus brasiliensis</i>
FPSR248-09	LBPV-16083	652	03-Sep-2004	<i>Geophagus brasiliensis</i>
FPSR235-09	LBPV-29371	620	02-Apr-2008	<i>Geophagus brasiliensis</i>
FPSR234-09	LBPV-29370	620	02-Apr-2008	<i>Geophagus brasiliensis</i>
FPSR077-09	LBPV-29124	655	09-Apr-2008	<i>Glanidium melanopterum</i>
FPSR358-11	LBPV- 49718	610	20-Oct-2010	<i>Gymnotus cf. carapo</i>
FPSR356-11	LBPV- 49716	610	20-Oct-2010	<i>Gymnotus cf. carapo</i>
FPSR357-11	LBPV- 49717	610	20-Oct-2010	<i>Gymnotus cf. carapo</i>
FPSR076-09	LBPV-7071	655	14-Nov-1999	<i>Gymnotus inaequilabiatus</i>
FPSR070-09	LBPV-29097	655	09-Apr-2008	<i>Gymnotus inaequilabiatus</i>
FPSR073-09	LBPV-7279	652	13-Nov-1999	<i>Gymnotus pantherinus</i>
FPSR072-09	LBPV-7278	652	13-Nov-1999	<i>Gymnotus pantherinus</i>
FPSR071-09	LBPV-7277	652	13-Nov-1999	<i>Gymnotus pantherinus</i>
FPSR074-09	LBPV-7069	652	14-Nov-1999	<i>Gymnotus sylvius</i>
FPSR075-09	LBPV-7070	655	14-Nov-1999	<i>Gymnotus sylvius</i>

FPSR069-09	LBPV-29096	655	09-Apr-2008	<i>Gymnotus sylvius</i>
FPSR306-11	LBPV- 21354	666	25-Mar-2004	<i>Harttia carvalhoi</i>
FPSR099-09	LBPV-37787	652	27-Mar-2009	<i>Harttia carvalhoi</i>
FPSR100-09	LBPV-37788	655	27-Mar-2009	<i>Harttia carvalhoi</i>
FPSR101-09	LBPV-37789	655	27-Mar-2009	<i>Harttia carvalhoi</i>
FPSR102-09	LBPV-37790	655	27-Mar-2009	<i>Harttia carvalhoi</i>
FPSR103-09	LBPV-37791	655	27-Mar-2009	<i>Harttia carvalhoi</i>
FPSR305-11	LBPV- 21353	666	25-Mar-2004	<i>Harttia carvalhoi</i>
FPSR106-09	LBPV-21364	655	25-Mar-2004	<i>Harttia loricariformis</i>
FPSR107-09	LBPV-21365	655	25-Mar-2004	<i>Harttia loricariformis</i>
FPSR108-09	LBPV-21366	655	25-Mar-2004	<i>Harttia loricariformis</i>
FPSR414-11	LBPV- 49770	685	20-Oct-2010	<i>Harttia loricariformis</i>
FPSR413-11	LBPV- 49769	685	20-Oct-2010	<i>Harttia loricariformis</i>
FPSR415-11	LBPV- 49771	685	20-Oct-2010	<i>Harttia loricariformis</i>
FPSR412-11	LBPV- 49768	685	20-Oct-2010	<i>Harttia loricariformis</i>
FPSR104-09	LBPV-21362	655	25-Mar-2004	<i>Harttia loricariformis</i>
FPSR416-11	LBPV- 49772	685	20-Oct-2010	<i>Harttia loricariformis</i>
FPSR105-09	LBPV-21363	655	25-Mar-2004	<i>Harttia loricariformis</i>
FPSR111-09	LBPV-29328	655	01-Apr-2008	<i>Hemipsilichthys gobio</i>
FPSR109-09	LBPV-29326	655	01-Apr-2008	<i>Hemipsilichthys gobio</i>
FPSR110-09	LBPV-29327	655	01-Apr-2008	<i>Hemipsilichthys gobio</i>
FPSR112-09	LBPV-29329	655	01-Apr-2008	<i>Hemipsilichthys gobio</i>
FPSR448-11	LBPV- 49804	637	20-Oct-2010	<i>Hisonotus sp.</i>
FPSR447-11	LBPV- 49803	703	20-Oct-2010	<i>Hisonotus sp.</i>
FPSR451-11	LBPV- 49807	703	20-Oct-2010	<i>Hisonotus sp.</i>
FPSR450-11	LBPV- 49806	703	20-Oct-2010	<i>Hisonotus sp.</i>
FPSR449-11	LBPV- 49805	703	20-Oct-2010	<i>Hisonotus sp.</i>
FPSR244-09	LBPV-16065	652	04-Sep-2004	<i>Hoplerythrinus unitaeniatus</i>
FPSR065-09	LBPV-29125	655	08-Apr-2008	<i>Hoplias malabaricus</i>
FPSR392-11	LBPV- 49748	672	20-Oct-2010	<i>Hoplias malabaricus</i>
FPSR269-09	LBPV-16094	652	03-Sep-2004	<i>Hoplosternum littorale</i>
FPSR268-09	LBPV-16093	652	03-Sep-2004	<i>Hoplosternum littorale</i>
FPSR047-09	LBPV-28465	652	01-Jan-2008	<i>Hyphessobrycon bifasciatus</i>
FPSR049-09	LBPV-28467	652	01-Jan-2008	<i>Hyphessobrycon bifasciatus</i>
FPSR048-09	LBPV-28466	652	01-Jan-2008	<i>Hyphessobrycon bifasciatus</i>
FPSR051-09	LBPV-28469	652	01-Jan-2008	<i>Hyphessobrycon bifasciatus</i>
FPSR444-11	LBPV- 49801	659	20-Oct-2010	<i>Hypostomus affinis</i>
FPSR121-09	LBPV-29113	655	09-Apr-2008	<i>Hypostomus affinis</i>
FPSR119-09	LBPV-29111	655	09-Apr-2008	<i>Hypostomus affinis</i>
FPSR118-09	LBPV-29110	655	09-Apr-2008	<i>Hypostomus affinis</i>
FPSR117-09	LBPV-29109	655	09-Apr-2008	<i>Hypostomus affinis</i>
FPSR127-09	LBPV-29354	655	02-Apr-2008	<i>Hypostomus affinis</i>
FPSR128-09	LBPV-29355	655	02-Apr-2008	<i>Hypostomus affinis</i>
FPSR445-11	LBPV- 49802	564	20-Oct-2010	<i>Hypostomus affinis</i>
FPSR120-09	LBPV-29112	655	09-Apr-2008	<i>Hypostomus affinis</i>
FPSR130-09	LBPV-37753	655	27-Mar-2009	<i>Hypostomus auroguttatus</i>
FPSR115-09	LBPV-29100	655	09-Apr-2008	<i>Hypostomus auroguttatus</i>
FPSR116-09	LBPV-29108	655	09-Apr-2008	<i>Hypostomus auroguttatus</i>
FPSR122-09	LBPV-29082	655	09-Apr-2008	<i>Hypostomus auroguttatus</i>
FPSR123-09	LBPV-29083	655	09-Apr-2008	<i>Hypostomus auroguttatus</i>
FPSR124-09	LBPV-29084	652	09-Apr-2008	<i>Hypostomus auroguttatus</i>
FPSR125-09	LBPV-29085	655	09-Apr-2008	<i>Hypostomus auroguttatus</i>

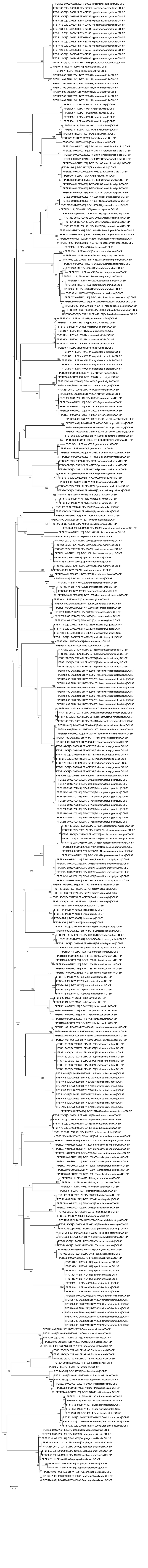
FPSR126-09	LBPV-29086	655	09-Apr-2008	<i>Hypostomus auroguttatus</i>
FPSR129-09	LBPV-37752	655	27-Mar-2009	<i>Hypostomus auroguttatus</i>
FPSR131-09	LBPV-37754	655	27-Mar-2009	<i>Hypostomus auroguttatus</i>
FPSR132-09	LBPV-37755	655	27-Mar-2009	<i>Hypostomus auroguttatus</i>
FPSR133-09	LBPV-37756	655	27-Mar-2009	<i>Hypostomus auroguttatus</i>
FPSR134-09	LBPV-37784	655	27-Mar-2009	<i>Hypostomus auroguttatus</i>
FPSR135-09	LBPV-37785	655	27-Mar-2009	<i>Hypostomus auroguttatus</i>
FPSR136-09	LBPV-37786	655	27-Mar-2009	<i>Hypostomus auroguttatus</i>
FPSR307-11	LBPV- 21329	645	24-Mar-2004	<i>Hypostomus cf. affinis</i>
FPSR310-11	LBPV- 21332	666	24-Mar-2004	<i>Hypostomus cf. affinis</i>
FPSR311-11	LBPV- 21333	666	24-Mar-2004	<i>Hypostomus cf. affinis</i>
FPSR312-11	LBPV- 21346	666	24-Mar-2004	<i>Hypostomus cf. affinis</i>
FPSR313-11	LBPV- 21347	666	24-Mar-2004	<i>Hypostomus cf. affinis</i>
FPSR315-11	LBPV- 21349	666	24-Mar-2004	<i>Hypostomus cf. affinis</i>
FPSR308-11	LBPV- 21330	666	24-Mar-2004	<i>Hypostomus cf. affinis</i>
FPSR316-11	LBPV- 21350	666	24-Mar-2004	<i>Hypostomus cf. affinis</i>
FPSR083-09	LBPV-29806	655	02-Apr-2008	<i>Imparfinis minutus</i>
FPSR317-11	LBPV- 21341	666	24-Mar-2004	<i>Imparfinis minutus</i>
FPSR318-11	LBPV- 21342	666	24-Mar-2004	<i>Imparfinis minutus</i>
FPSR319-11	LBPV- 21343	666	24-Mar-2004	<i>Imparfinis minutus</i>
FPSR278-09	LBPV-40191	652		<i>Imparfinis minutus</i>
FPSR279-09	LBPV-40192	652		<i>Imparfinis minutus</i>
FPSR320-11	LBPV- 21344	666	24-Mar-2004	<i>Imparfinis minutus</i>
FPSR321-11	LBPV- 21345	666	24-Mar-2004	<i>Imparfinis minutus</i>
FPSR280-09	LBPV-40193	652	19-May-2009	<i>Imparfinis minutus</i>
FPSR411-11	LBPV- 49767	655	20-Oct-2010	<i>Imparfinis minutus</i>
FPSR087-09	LBPV-29810	655	02-Apr-2008	<i>Imparfinis minutus</i>
FPSR086-09	LBPV-29809	655	02-Apr-2008	<i>Imparfinis minutus</i>
FPSR085-09	LBPV-29808	655	02-Apr-2008	<i>Imparfinis minutus</i>
FPSR084-09	LBPV-29807	655	02-Apr-2008	<i>Imparfinis minutus</i>
FPSR409-11	LBPV- 49765	655	20-Oct-2010	<i>Imparfinis minutus</i>
FPSR410-11	LBPV- 49766	655	20-Oct-2010	<i>Imparfinis minutus</i>
FPSR006-09	LBPV-29075	655	09-Apr-2008	<i>Leporinus conirostris</i>
FPSR350-11	LBPV- 49710	540	20-Oct-2010	<i>Leporinus conirostris</i>
FPSR002-09	LBPV-29071	655	09-Apr-2008	<i>Leporinus mormyrops</i>
FPSR005-09	LBPV-29074	655	09-Apr-2008	<i>Leporinus mormyrops</i>
FPSR004-09	LBPV-29073	655	09-Apr-2008	<i>Leporinus mormyrops</i>
FPSR003-09	LBPV-29072	655	09-Apr-2008	<i>Leporinus mormyrops</i>
FPSR001-09	LBPV-29070	655	09-Apr-2008	<i>Leporinus mormyrops</i>
FPSR457-11	LBPV- 29074	666	09-Apr-2008	<i>Leporinus mormyrops</i>
FPSR456-11	LBPV- 29073	666	09-Apr-2008	<i>Leporinus mormyrops</i>
FPSR455-11	LBPV- 29072	666	09-Apr-2008	<i>Leporinus mormyrops</i>
FPSR348-11	LBPV- 49708	666	20-Oct-2010	<i>Leporinus steindachneri</i>
FPSR349-11	LBPV- 49709	666	20-Oct-2010	<i>Leporinus steindachneri</i>
FPSR347-11	LBPV- 49707	626	20-Oct-2010	<i>Leporinus steindachneri</i>
FPSR245-09	LBPV-16073	652	03-Sep-2004	<i>Leporinus steindachneri</i>
FPSR251-09	LBPV-16092	652	03-Sep-2004	<i>Loricariichthys castaneus</i>
FPSR292-09	LBPV-16091	652	03-Sep-2004	<i>Loricariichthys castaneus</i>
FPSR291-09	LBPV-16090	652	03-Sep-2004	<i>Loricariichthys castaneus</i>
FPSR290-09	LBPV-16089	652	03-Sep-2004	<i>Loricariichthys castaneus</i>
FPSR382-11	LBPV- 50957	666	20-Oct-2010	<i>Microcambeva sp.</i>
FPSR383-11	LBPV- 50958	666	20-Oct-2010	<i>Microcambeva sp.</i>

FPSR395-11	LBPV- 49751	657	20-Oct-2010	<i>Microglanis parahybae</i>
FPSR393-11	LBPV- 49741	657	20-Oct-2010	<i>Microglanis parahybae</i>
FPSR397-11	LBPV- 49753	657	20-Oct-2010	<i>Microglanis parahybae</i>
FPSR396-11	LBPV- 49752	657	20-Oct-2010	<i>Microglanis parahybae</i>
FPSR441-11	LBPV- 49797	670	20-Oct-2010	<i>Mimagoniates microlepis</i>
FPSR439-11	LBPV- 49795	669	20-Oct-2010	<i>Mimagoniates microlepis</i>
FPSR443-11	LBPV- 49799	670	20-Oct-2010	<i>Mimagoniates microlepis</i>
FPSR442-11	LBPV- 49798	670	20-Oct-2010	<i>Mimagoniates microlepis</i>
FPSR440-11	LBPV- 49796	670	20-Oct-2010	<i>Mimagoniates microlepis</i>
FPSR140-09	LBPV-37782	655	27-Mar-2009	<i>Neoplecostomus microps</i>
FPSR139-09	LBPV-37781	655	27-Mar-2009	<i>Neoplecostomus microps</i>
FPSR141-09	LBPV-37783	655	27-Mar-2009	<i>Neoplecostomus microps</i>
FPSR242-09	LBPV-21355b	655	25-Mar-2004	<i>Neoplecostomus microps</i>
FPSR170-09	LBPV-37493	652	27-Mar-2009	<i>Neoplecostomus microps</i>
FPSR113-09	LBPV-21355	652	25-Mar-2004	<i>Neoplecostomus microps</i>
FPSR137-09	LBPV-37779	655	27-Mar-2009	<i>Neoplecostomus microps</i>
FPSR138-09	LBPV-37780	655	27-Mar-2009	<i>Neoplecostomus microps</i>
FPSR288-09	LBPV-16056	652	03-Sep-2004	<i>Oligosarcus hepsetus</i>
FPSR289-09	LBPV-16057	652	03-Sep-2004	<i>Oligosarcus hepsetus</i>
FPSR362-11	LBPV- 49722	683	20-Oct-2010	<i>Oligosarcus hepsetus</i>
FPSR270-09	LBPV-16058	652	03-Sep-2004	<i>Oligosarcus hepsetus</i>
FPSR052-09	LBPV-29353	464	02-Apr-2008	<i>Oligosarcus jenynsii</i>
FPSR054-09	LBPV-29104	652	09-Apr-2008	<i>Oligosarcus jenynsii</i>
FPSR055-09	LBPV-29105	652	09-Apr-2008	<i>Oligosarcus jenynsii</i>
FPSR053-09	LBPV-29400	655	02-Apr-2008	<i>Oligosarcus jenynsii</i>
FPSR239-09	LBPV-29375	652	02-Apr-2008	<i>Oreochromis niloticus</i>
FPSR238-09	LBPV-29374	580	02-Apr-2008	<i>Oreochromis niloticus</i>
FPSR237-09	LBPV-29373	652	02-Apr-2008	<i>Oreochromis niloticus</i>
FPSR236-09	LBPV-29372	652	02-Apr-2008	<i>Oreochromis niloticus</i>
FPSR240-09	LBPV-29376	585	02-Apr-2008	<i>Oreochromis niloticus</i>
FPSR145-09	LBPV-29869	655	31-May-2008	<i>Pareiorhina brachyrhyncha</i>
FPSR146-09	LBPV-29870	655	31-May-2008	<i>Pareiorhina brachyrhyncha</i>
FPSR142-09	LBPV-29866	655	31-May-2008	<i>Pareiorhina brachyrhyncha</i>
FPSR147-09	LBPV-29871	655	31-May-2008	<i>Pareiorhina brachyrhyncha</i>
FPSR143-09	LBPV-29867	652	31-May-2008	<i>Pareiorhina brachyrhyncha</i>
FPSR144-09	LBPV-29868	655	31-May-2008	<i>Pareiorhina brachyrhyncha</i>
FPSR149-09	LBPV-37775	655	27-Mar-2009	<i>Pareiorhina rudolphi</i>
FPSR148-09	LBPV-37774	655	27-Mar-2009	<i>Pareiorhina rudolphi</i>
FPSR150-09	LBPV-37776	655	27-Mar-2009	<i>Pareiorhina rudolphi</i>
FPSR151-09	LBPV-37777	655	27-Mar-2009	<i>Pareiorhina rudolphi</i>
FPSR152-09	LBPV-37778	655	27-Mar-2009	<i>Pareiorhina rudolphi</i>
FPSR220-09	LBPV-9180	620	24-Jan-2001	<i>Phalloceros reisi</i>
FPSR222-09	LBPV-9178	620	24-Jan-2001	<i>Phalloceros reisi</i>
FPSR219-09	LBPV-9181	620	24-Jan-2001	<i>Phalloceros reisi</i>
FPSR221-09	LBPV-9182	652	24-Jan-2001	<i>Phalloceros reisi</i>
FPSR435-11	LBPV- 49791	685	20-Oct-2010	<i>Phalloceros sp.</i>
FPSR255-09	LBPV-20207	652	03-Sep-2004	<i>Pimelodella lateristriga</i>
FPSR256-09	LBPV-20208	652	03-Sep-2004	<i>Pimelodella lateristriga</i>
FPSR252-09	LBPV-20204	652	03-Sep-2004	<i>Pimelodella lateristriga</i>
FPSR253-09	LBPV-20205	652	03-Sep-2004	<i>Pimelodella lateristriga</i>
FPSR254-09	LBPV-20206	652	03-Sep-2004	<i>Pimelodella lateristriga</i>
FPSR177-09	LBPV-29137	655	08-Apr-2008	<i>Pimelodus maculatus</i>

FPSR173-09	LBPV-29133	655	08-Apr-2008	<i>Pimelodus maculatus</i>
FPSR174-09	LBPV-29134	655	08-Apr-2008	<i>Pimelodus maculatus</i>
FPSR175-09	LBPV-29135	655	08-Apr-2008	<i>Pimelodus maculatus</i>
FPSR176-09	LBPV-29136	655	08-Apr-2008	<i>Pimelodus maculatus</i>
FPSR436-11	LBPV- 49792	660	20-Oct-2010	<i>Poecilia reticulata</i>
FPSR223-09	LBPV-29427	620	02-Apr-2008	<i>Poecilia reticulata</i>
FPSR225-09	LBPV-29429	652	02-Apr-2008	<i>Poecilia reticulata</i>
FPSR226-09	LBPV-29430	652	02-Apr-2008	<i>Poecilia reticulata</i>
FPSR227-09	LBPV-29431	649	02-Apr-2008	<i>Poecilia reticulata</i>
FPSR224-09	LBPV-29428	620	02-Apr-2008	<i>Poecilia reticulata</i>
FPSR021-09	LBPV-29092	608	09-Apr-2008	<i>Probolodus heterostomus</i>
FPSR057-09	LBPV-29142	652	08-Apr-2008	<i>Probolodus heterostomus</i>
FPSR058-09	LBPV-29129	652	08-Apr-2008	<i>Probolodus heterostomus</i>
FPSR059-09	LBPV-29130	652	08-Apr-2008	<i>Probolodus heterostomus</i>
FPSR056-09	LBPV-29141	652	08-Apr-2008	<i>Probolodus heterostomus</i>
FPSR276-09	LBPV-16071	652	03-Sep-2004	<i>Prochilodus lineatus</i>
FPSR277-09	LBPV-16072	652	03-Sep-2004	<i>Prochilodus lineatus</i>
FPSR098-09	LBPV-29360	622	02-Apr-2008	<i>Rhamdia quelen</i>
FPSR452-11	LBPV- 49808	620	20-Oct-2010	<i>Rhamdia quelen</i>
FPSR094-09	LBPV-29356	635	02-Apr-2008	<i>Rhamdia quelen</i>
FPSR095-09	LBPV-29357	655	02-Apr-2008	<i>Rhamdia quelen</i>
FPSR096-09	LBPV-29358	649	02-Apr-2008	<i>Rhamdia quelen</i>
FPSR097-09	LBPV-29359	652	02-Apr-2008	<i>Rhamdia quelen</i>
FPSR162-09	LBPV-29120	655	08-Apr-2008	<i>Rineloricaria af. kronei</i>
FPSR157-09	LBPV-29076	655	09-Apr-2008	<i>Rineloricaria af. kronei</i>
FPSR166-09	LBPV-29101	655	09-Apr-2008	<i>Rineloricaria af. kronei</i>
FPSR163-09	LBPV-29121	655	08-Apr-2008	<i>Rineloricaria af. kronei</i>
FPSR165-09	LBPV-29123	655	08-Apr-2008	<i>Rineloricaria af. kronei</i>
FPSR164-09	LBPV-29122	655	08-Apr-2008	<i>Rineloricaria af. kronei</i>
FPSR167-09	LBPV-29102	655	09-Apr-2008	<i>Rineloricaria af. kronei</i>
FPSR158-09	LBPV-29081	655	09-Apr-2008	<i>Rineloricaria af. kronei</i>
FPSR161-09	LBPV-29119	655	08-Apr-2008	<i>Rineloricaria af. kronei</i>
FPSR168-09	LBPV-29103	655	09-Apr-2008	<i>Rineloricaria af. lima</i>
FPSR155-09	LBPV-29380	655	02-Apr-2008	<i>Rineloricaria af. lima</i>
FPSR154-09	LBPV-29379	655	02-Apr-2008	<i>Rineloricaria af. lima</i>
FPSR159-09	LBPV-29139	652	08-Apr-2008	<i>Rineloricaria af. lima</i>
FPSR160-09	LBPV-29140	655	08-Apr-2008	<i>Rineloricaria af. lima</i>
FPSR153-09	LBPV-29378	655	02-Apr-2008	<i>Rineloricaria af. lima</i>
FPSR156-09	LBPV-29381	655	02-Apr-2008	<i>Rineloricaria af. lima</i>
FPSR171-09	LBPV-37494	510	27-Mar-2009	<i>Schizolecis guntheri</i>
FPSR243-09	LBPV-29862b	655	31-May-2008	<i>Schizolecis guntheri</i>
FPSR172-09	LBPV-37495	637	27-Mar-2009	<i>Schizolecis guntheri</i>
FPSR169-09	LBPV-37744	655	27-Mar-2009	<i>Schizolecis guntheri</i>
FPSR114-09	LBPV-29862	655	31-May-2008	<i>Schizolecis guntheri</i>
FPSR425-11	LBPV- 49781	522	20-Oct-2010	<i>Scleromystax barbatus</i>
FPSR293-10	LBPV-42007	652	15-Dec-2009	<i>Steindachneridion parahybae</i>
FPSR297-10	LBPV-42011	652	15-Dec-2009	<i>Steindachneridion parahybae</i>
FPSR296-10	LBPV-42010	652	15-Dec-2009	<i>Steindachneridion parahybae</i>
FPSR295-10	LBPV-42009	652	15-Dec-2009	<i>Steindachneridion parahybae</i>
FPSR294-10	LBPV-42008	652	15-Dec-2009	<i>Steindachneridion parahybae</i>
FPSR092-09	LBPV-7903	655	15-Mar-2000	<i>Taunayia bifasciata</i>
FPSR088-09	LBPV-8164	655	15-Mar-2000	<i>Taunayia bifasciata</i>

FPSR089-09	LBPV-7838	652	15-Mar-2000	<i>Taunayia bifasciata</i>
FPSR091-09	LBPV-7902	652	15-Mar-2000	<i>Taunayia bifasciata</i>
FPSR093-09	LBPV-8720	655	05-Sep-2000	<i>Taunayia bifasciata</i>
FPSR271-09	LBPV-16059	652	03-Sep-2004	<i>Trachelyopterus striatulus</i>
FPSR272-09	LBPV-16060	652	03-Sep-2004	<i>Trachelyopterus striatulus</i>
FPSR273-09	LBPV-16061	652	03-Sep-2004	<i>Trachelyopterus striatulus</i>
FPSR274-09	LBPV-16062	652	03-Sep-2004	<i>Trachelyopterus striatulus</i>
FPSR275-09	LBPV-16063	652	03-Sep-2004	<i>Trachelyopterus striatulus</i>
FPSR199-09	LBPV-29805	652	02-Apr-2008	<i>Trichomycterus caudofasciatus</i>
FPSR198-09	LBPV-29804	650	02-Apr-2008	<i>Trichomycterus caudofasciatus</i>
FPSR197-09	LBPV-29803	652	02-Apr-2008	<i>Trichomycterus caudofasciatus</i>
FPSR196-09	LBPV-29802	652	02-Apr-2008	<i>Trichomycterus caudofasciatus</i>
FPSR195-09	LBPV-29801	652	02-Apr-2008	<i>Trichomycterus caudofasciatus</i>
FPSR194-09	LBPV-29397	652	02-Apr-2008	<i>Trichomycterus caudofasciatus</i>
FPSR193-09	LBPV-29396	652	02-Apr-2008	<i>Trichomycterus caudofasciatus</i>
FPSR192-09	LBPV-29395	655	02-Apr-2008	<i>Trichomycterus caudofasciatus</i>
FPSR191-09	LBPV-29394	655	02-Apr-2008	<i>Trichomycterus caudofasciatus</i>
FPSR201-09	LBPV-29896	652	01-Apr-2008	<i>Trichomycterus giganteus</i>
FPSR179-09	LBPV-37738	655	27-Mar-2009	<i>Trichomycterus giganteus</i>
FPSR180-09	LBPV-37739	655	27-Mar-2009	<i>Trichomycterus giganteus</i>
FPSR181-09	LBPV-37770	655	27-Mar-2009	<i>Trichomycterus giganteus</i>
FPSR182-09	LBPV-37771	655	27-Mar-2009	<i>Trichomycterus giganteus</i>
FPSR183-09	LBPV-37772	655	27-Mar-2009	<i>Trichomycterus giganteus</i>
FPSR184-09	LBPV-37773	655	27-Mar-2009	<i>Trichomycterus giganteus</i>
FPSR190-09	LBPV-29393	655	02-Apr-2008	<i>Trichomycterus giganteus</i>
FPSR200-09	LBPV-29895	649	01-Apr-2008	<i>Trichomycterus giganteus</i>
FPSR178-09	LBPV-37737	655	27-Mar-2009	<i>Trichomycterus giganteus</i>
FPSR202-09	LBPV-29897	652	01-Apr-2008	<i>Trichomycterus giganteus</i>
FPSR203-09	LBPV-29898	652	01-Apr-2008	<i>Trichomycterus giganteus</i>
FPSR204-09	LBPV-29899	649	01-Apr-2008	<i>Trichomycterus giganteus</i>
FPSR210-09	LBPV-37740	652	27-Mar-2009	<i>Trichomycterus giganteus</i>
FPSR211-09	LBPV-37741	652	27-Mar-2009	<i>Trichomycterus giganteus</i>
FPSR212-09	LBPV-37742	652	27-Mar-2009	<i>Trichomycterus giganteus</i>
FPSR213-09	LBPV-37763	652	27-Mar-2009	<i>Trichomycterus giganteus</i>
FPSR214-09	LBPV-37764	652	27-Mar-2009	<i>Trichomycterus giganteus</i>
FPSR215-09	LBPV-37765	652	27-Mar-2009	<i>Trichomycterus giganteus</i>
FPSR216-09	LBPV-37766	652	27-Mar-2009	<i>Trichomycterus giganteus</i>
FPSR217-09	LBPV-37767	649	27-Mar-2009	<i>Trichomycterus giganteus</i>
FPSR209-09	LBPV-37736	649	27-Mar-2009	<i>Trichomycterus iheringi</i>
FPSR208-09	LBPV-37735	652	27-Mar-2009	<i>Trichomycterus iheringi</i>
FPSR207-09	LBPV-37734	652	27-Mar-2009	<i>Trichomycterus iheringi</i>
FPSR206-09	LBPV-37733	652	27-Mar-2009	<i>Trichomycterus iheringi</i>
FPSR205-09	LBPV-37732	649	27-Mar-2009	<i>Trichomycterus iheringi</i>
FPSR189-09	LBPV-20414	655	29-Aug-2004	<i>Trichomycterus immaculatus</i>
FPSR298-10	LBPV-14445	652	25-Mar-2004	<i>Trichomycterus immaculatus</i>
FPSR299-10	LBPV-14443	618	25-Mar-2004	<i>Trichomycterus immaculatus</i>
FPSR188-09	LBPV-20413	655	29-Aug-2004	<i>Trichomycterus immaculatus</i>
FPSR187-09	LBPV-20412	655	29-Aug-2004	<i>Trichomycterus immaculatus</i>
FPSR186-09	LBPV-20411	655	29-Aug-2004	<i>Trichomycterus immaculatus</i>
FPSR185-09	LBPV-20410	655	29-Aug-2004	<i>Trichomycterus immaculatus</i>

Anexo 2. Dendrograma obtido por *Neighbour-Joining* a partir das distâncias genéticas K2P obtidas para 354 sequências *barcode* analisadas de amostras da bacia do rio Paraíba do Sul.



Anexo 3. Distâncias interespecíficas e distâncias de cada espécie ao seu vizinho mais próximo para as 66 espécies de peixes analisadas.

Espécie	Distância intra-sp média (%)	Distância intra-sp máxima (%)	Espécie mais próxima	Indivíduo mais próximo (nearest neighbor)	Distância ao vizinho mais próximo (%)
<i>Leporinus conirostris</i>	0	0	<i>Leporinus steindachneri</i>	FPSR245-09	3.08
<i>Leporinus mormyrops</i>	0.1	0.31	<i>Leporinus conirostris</i>	FPSR350-11	4.1
<i>Leporinus steindachneri</i>	0.69	1.29	<i>Leporinus conirostris</i>	FPSR350-11	3.08
<i>Astyanax sp.</i>	N/A	N/A	<i>Oligosarcus jenynsii</i>	FPSR054-09	14.84
<i>Brycon insignis</i>	0.34	0.62	<i>Brycon opalinus</i>	FPSR037-09	9.85
<i>Brycon opalinus</i>	0.15	0.46	<i>Brycon insignis</i>	FPSR259-09	9.85
<i>Deuterodon parahybae</i>	3.46	7.36	<i>Probolodus heterostomus</i>	FPSR057-09	1.61
<i>Hyphessobrycon bifasciatus</i>	0	0	<i>Oligosarcus hepsetus</i>	FPSR270-09	9.37
<i>Mimagoniates microlepis</i>	0	0	<i>Leporinus mormyrops</i>	FPSR457-11	18.96
<i>Oligosarcus hepsetus</i>	0.31	0.62	<i>Oligosarcus jenynsii</i>	FPSR052-09	7.22
<i>Oligosarcus jenynsii</i>	0	0	<i>Oligosarcus hepsetus</i>	FPSR288-09	7.22
<i>Probolodus heterostomus</i>	0.13	0.33	<i>Deuterodon parahybae</i>	FPSR364-11	1.61
<i>Characidium alipioi</i>	0.09	0.32	<i>Characidium cf. alipioi</i>	FPSR064-09	10.08
<i>Characidium cf. alipioi</i>	0	0	<i>Characidium alipioi</i>	FPSR421-11	10.08
<i>Characidium lanei</i>	1.56	3.53	<i>Characidium alipioi</i>	FPSR421-11	10.09
<i>Characidium sp.</i>	0.1	0.16	<i>Characidium alipioi</i>	FPSR421-11	15.26
<i>Cyphocharax gilbert</i>	0.35	0.8	<i>Leporinus conirostris</i>	FPSR006-09	17.72
<i>Hoplerythrinus unitaeniatus</i>	N/A	N/A	<i>Hoplias malabaricus</i>	FPSR392-11	17.8
<i>Hoplias malabaricus</i>	6.88	6.88	<i>Hoplerythrinus unitaeniatus</i>	FPSR244-09	17.8
<i>Apareiodon affinis</i>	0.21	0.31	<i>Prochilodus lineatus</i>	FPSR276-09	16.1

<i>Prochilodus lineatus</i>	0.46	0.46	<i>Apareiodon affinis</i>	FPSR066-09	16.1
<i>Phalloceros reisi</i>	0	0	<i>Phalloceros sp.</i>	FPSR435-11	10.42
<i>Phalloceros sp.</i>	N/A	N/A	<i>Phalloceros reisi</i>	FPSR221-09	10.42
<i>Poecilia reticulata</i>	0.76	2.31	<i>Geophagus brasiliensis</i>	FPSR233-09	20.99
<i>Gymnotus cf. carapo</i>	0.56	0.83	<i>Gymnotus inaequilabiatus</i>	FPSR076-09	0.66
<i>Gymnotus inaequilabiatus</i>	0	0	<i>Gymnotus cf. carapo</i>	FPSR356-11	0.66
<i>Gymnotus pantherinus</i>	0	0	<i>Gymnotus sylvius</i>	FPSR074-09	13.68
<i>Gymnotus sylvius</i>	0.1	0.15	<i>Gymnotus inaequilabiatus</i>	FPSR076-09	5.13
<i>Eigenmannia sp.</i>	1.29	1.29	<i>Eigenmannia virescens</i>	FPSR267-09	1.24
<i>Eigenmannia virescens</i>	0	0	<i>Eigenmannia sp.</i>	FPSR346-11	1.24
<i>Crenicichla lacustris</i>	0	0	<i>Crenicichla lepidota</i>	FPSR354-11	1.81
<i>Crenicichla lepidota</i>	0.1	0.16	<i>Crenicichla lacustris</i>	FPSR230-09	1.81
<i>Geophagus brasiliensis</i>	1.46	3.2	<i>Oreochromis niloticus</i>	FPSR239-09	20.22
<i>Oreochromis niloticus</i>	0	0	<i>Rhamdia quelen</i>	FPSR452-11	18.9
<i>Glanidium melanopterum</i>	N/A	N/A	<i>Pimelodus maculatus</i>	FPSR177-09	19.95
<i>Trachelyopterus striatulus</i>	0	0	<i>Steindachneridion parahybae</i>	FPSR293-10	18.2
<i>Callichthys callichthys</i>	0	0	<i>Hoplosternum littorale</i>	FPSR268-09	21.32
<i>Corydoras nattereri</i>	N/A	N/A	<i>Scleromystax barbatus</i>	FPSR425-11	16.75
<i>Hoplosternum littorale</i>	0.15	0.15	<i>Callichthys callichthys</i>	FPSR078-09	21.32
<i>Scleromystax barbatus</i>	N/A	N/A	<i>Corydoras nattereri</i>	FPSR082-09	16.75
<i>Imparfinis minutus</i>	0.21	0.47	<i>Imparfinis sp.</i>	FPSR321-11	0.31
<i>Imparfinis sp.</i>	0	0	<i>Imparfinis minutus</i>	FPSR085-09	0.31
<i>Pimelodella lateristriga</i>	0.15	0.31	<i>Rhamdia quelen</i>	FPSR096-09	14.29
<i>Rhamdia quelen</i>	0.59	1.82	<i>Pimelodella lateristriga</i>	FPSR255-09	14.29

<i>Taunayia bifasciata</i>	0.15	0.31	<i>Imparfinis minutus</i>	FPSR411-11	14.81
<i>Harttia carvalhoi</i>	1.09	2.36	<i>Harttia loricariformis</i>	FPSR414-11	10.07
<i>Harttia loricariformis</i>	0.95	1.72	<i>Harttia carvalhoi</i>	FPSR306-11	10.07
<i>Hemipsilichthys gobio</i>	0	0	<i>Harttia loricariformis</i>	FPSR106-09	18.41
<i>Hisonotus sp.</i>	0.13	0.32	<i>Pareiorhina brachyrhyncha</i>	FPSR145-09	14.78
<i>Hypostomus affinis</i>	0.06	0.18	<i>Hypostomus auroguttatus</i>	FPSR130-09	4.64
<i>Hypostomus auroguttatus</i>	0.04	0.31	<i>Hypostomus affinis</i>	FPSR121-09	4.64
<i>Hypostomus cf. affinis</i>	0.37	1.1	<i>Brycon opalinus</i>	FPSR037-09	19.07
<i>Loricariichthys castaneus</i>	0.31	0.46	<i>Rineloricaria af. Kronei</i>	FPSR162-09	16
<i>Neoplecostomus micros</i>	0.08	0.15	<i>Pareiorhina brachyrhyncha</i>	FPSR146-09	8.22
<i>Pareiorhina brachyrhyncha</i>	0.05	0.15	<i>Neoplecostomus micros</i>	FPSR140-09	8.22
<i>Pareiorhina rudolphi</i>	0.06	0.15	<i>Pareiorhina brachyrhyncha</i>	FPSR145-09	10.03
<i>Rineloricaria af. Kronei</i>	0	0	<i>Rineloricaria af. lima</i>	FPSR168-09	6.13
<i>Rineloricaria af. lima</i>	0	0	<i>Rineloricaria af. kronei</i>	FPSR162-09	6.13
<i>Schizolecis guntheri</i>	0.18	0.4	<i>Hisonotus sp.</i>	FPSR447-11	14.78
<i>Pimelodus maculatus</i>	0.06	0.15	<i>Steindachneridion parahybae</i>	FPSR293-10	15.98
<i>Steindachneridion parahybae</i>	0.12	0.31	<i>Pimelodus maculatus</i>	FPSR177-09	15.98
<i>Microglanis parahybae</i>	7.53	14.86	<i>Pimelodus maculatus</i>	FPSR177-09	18.12
<i>Microcambeva sp.</i>	0.15	0.15	<i>Trichomycterus giganteus</i>	FPSR204-09	17.87
<i>Trichomycterus caudofasciatus</i>	0	0	<i>Trichomycterus giganteus</i>	FPSR201-09	7.88
<i>Trichomycterus giganteus</i>	0.12	0.47	<i>Trichomycterus immaculatus</i>	FPSR188-09	0.93
<i>Trichomycterus iheringi</i>	0	0	<i>Trichomycterus giganteus</i>	FPSR204-09	10.06
<i>Trichomycterus immaculatus</i>	0.16	0.46	<i>Trichomycterus giganteus</i>	FPSR180-09	0.93

