

LETÍCIA SETÚBAL ROLIM

**REAVALIAÇÃO *in silico* DA IDENTIDADE DE RAIAS DO GÊNERO *Dasyatis*
POR MARCADORES DE RAPD.**

Monografia submetida à Coordenação do Curso de Engenharia de Pesca, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do grau de Engenheira de Pesca.

Aprovada em 30/11/2010.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Vicente Vieira Faria (Orientador)
Universidade Federal do Ceará-UFC

Prof. Dr. Manuel Antonio Andrade Furtado Neto
Universidade Federal do Ceará-UFC

Prof. Dr. José Renato de Oliveira César
Universidade Federal do Ceará-UFC



AGRADECIMENTOS

À Deus pela vida e por todos os caminhos destinados.

Aos meus pais, Rui e Tatiana, pelo amor incondicional e por sempre me darem apoio nunca deixando faltar nada em todos os sentidos, não medindo esforços para me proporcionarem o melhor.

Aos meus irmãos, André e Ruísa, pelo incentivo e carinho de sempre.

Aos meus sobrinhos, Luís Eduardo e Carlos Daniel, por toda felicidade proporcionada.

Ao meu namorado, Edivar Filho, que esteve comigo nos momentos mais difíceis e alegres dessa jornada. Por todo companheirismo, pelo amor e apoio.

Ao Professor, Vicente Faria, pela orientação, amizade, paciência e respeito. Sempre disponível para retirar dúvidas e sempre atento ao meu trabalho. Detentor de um enorme conhecimento, didática e muito amor pelo que faz.

À Letícia Vaz por ter permitido esta pesquisa ao ceder as imagens dos géis referente a cinco primers.

Às minhas avós, Zenaide e Undine, por encherem minha vida de amor e alegria.

Às minhas amigas Anúsia, Julianna, Keila, Mayara, Paula, Raquel, Rianne e Stefânia pela amizade e pelo carinho que me proporcionaram em todos os momentos da minha vida.

Às minhas tias, Ana, Camila, Lívia, Rogéria, Silvia, Sônia, por sempre me darem apoio e confiança.

Aos amigos de curso, Carol, Érika, Liana, Diana, Saulo e Micael, pela amizade e sugestões.

À todos aqueles que contribuíram para minha formação acadêmica.

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- R653r Rolim, Letícia Setúbal.
Reavaliação in silico da identidade de raias do gênero *Dasyatis* por marcadores de RAPD / Letícia Setúbal Rolim. – 2010.
39 f. : il. color.
- Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências Agrárias, Curso de Engenharia de Pesca, Fortaleza, 2010.
Orientação: Prof. Dr. Vicente Vieira Faria.
1. *Dasyatis americana*. 2. *Dasyatis centroura*. 3. Identificação de pescado. I. Título.

CDD 639.2

RESUMO

No Ceará, existem conflitos de identificação reportados para gênero *Dasyatis*. Em um estudo, um exemplar de raia desembarcado no porto do Mucuripe, Fortaleza, foi identificado como *Dasyatis centroura*. No entanto, esta identificação foi questionada. A partir de uma re-análise de marcadores RAPD o presente estudo teve como objetivos: (1) Investigar a identidade do exemplar de *Dasyatis* identificado como *D. centroura* e (2) Avaliar o potencial desses marcadores de RAPD para a identificação de raias do gênero *Dasyatis* da região, de um modo geral. A partir de imagens de gel de reações de PCR obtidas, foi feita uma matriz de presença/ ausência correspondente de cada um de cinco *primers*. Cada matriz foi submetida a análises filogenéticas baseadas em parcimônia máxima. Os resultados sugerem que o indivíduo em questão se refere a *Dasyatis americana*. Este resultado foi corroborado pela evidência morfológica. Dessa forma, o registro de ocorrência de *D. centroura* pode ser considerado um erro de identificação. De um modo geral, a técnica de RAPD se mostrou útil para identificação de espécimes do gênero *Dasyatis*, especialmente os *primers* OPC20, OPE 01, OPJ 08 e OPM 01.

Palavras-chaves: *Dasyatis americana*, *Dasyatis centroura*, Identificação de pescado

ABSTRACT

Conflicts regarding the identity of *Dasyatis* stingrays from Ceará have been reported. In one study, a stingray landed by fisheries at Mucuripe Inlet, Fortaleza, CE, was identified as *Dasyatis centroura*. However, this identification has been questioned. Based on a re-analysis of RAPD markers, the present study had as goals: (1) to investigate the identity of the refereed specimen previously identified as *D. centroura* and (2) to evaluate the overall potential of the use of RAPD markers for identification of *Dasyatis* stingrays in the region. Using obtained gel images of RAPD-PCR reactions, presence/absence matrix for each of five primers. Each matrix was submitted to phylogenetic analyses based on maximum parsimony. Results obtained suggest the specimen under investigation is a *Dasyatis americana*. This result is supported by morphological evidence. Therefore, the occurrence record of *D. centroura* may be considered a misidentification. Overall, the RAPD technique may be considered useful for identification of *Dasyatis* stingrays, specially the primers OPC20, OPE 01, OPJ 08 e OPM 01.

Keywords: *Dasyatis americana*, *Dasyatis centroura*, fishery product identification

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Árvore filogenética de raias <i>Dasyatis</i> amostrada no Porto do Mucuripe, Fortaleza, CE.	12
Figura 2	Árvore consenso de 10000 pseudoreplicatas de bootstrap a partir de análises de parcimônia máxima para todos <i>primers</i> combinados.	15
Figura 3	Árvore consenso de 10000 pseudoreplicatas de bootstrap a partir de análises de parcimônia máxima para todos <i>primers</i> combinados	16
Figura 4	Espécime identificado como <i>Dasyatis centroura</i> por Vaz (2005) e Vaz <i>et al.</i> (2006).	17

1 INTRODUÇÃO

No programa de coleta de dados de desembarque pesqueiro no Brasil, ESTATPESCA, todas as espécies de raias são classificadas em uma única categoria (“arraias”) (IBAMA, 2005). No entanto, informações de capturas ao nível de espécies são necessárias para um gerenciamento desse recurso, pois várias espécies de modos de vida diferentes estão incluídas nesta categoria.

A produção pesqueira de raias possui grande importância para o Estado do Ceará (Furtado-Neto & Barros-Júnior, 2006), com destaque para espécies de gênero *Dasyatis*. No entanto, a identificação destas não é trivial. Sendo que inclusive três novas espécies foram descritas nos últimos anos para a costa brasileira, *Dasyatis marianae* (Gomes *et al.* 2000), *D. hipostigma* (Santos *et al.* 2004) e *D. colarensis* (Santos *et al.* 2004)

A família *Dasyatidae* é constituída por raias marinhas, de águas doce ou salobra, que apresentam o comprimento do disco igual ou superior à largura do disco, e cauda maior do que a largura do disco. Raias dessa família são conhecidas como raias de esporão ou “sting rays”, por possuírem um ou dois esporões na parte anterior da cauda (BIGELOW & SCHROEDER, 1953), ocorrendo nos oceanos Atlântico, Índico e Pacífico (SEZAKI *et al.*, 1999).

Raias do gênero *Dasyatis* são comumente encontradas em fundos planos de baías, desembocaduras de rios e em pequenas áreas arenosas entre bancos de corais. Frequentemente as raias enterram-se parcialmente no fundo arenoso ou lamacento, deixando expostos apenas parte da cauda, olhos e espiráculos. Alimentam-se de invertebrados bentônicos, principalmente moluscos, anelídeos e crustáceos que encontram vasculhando o fundo com a boca e nadadeiras. Podem também capturar pequenos peixes (SPENDER, 2002). Por outro lado são presas de grandes tubarões. Realizam migrações para águas mais aquecidas e se locomovem rapidamente pela zona pelágica através de ondulações de suas nadadeiras peitorais (BIGELOW & SCHROEDER, 1953).

No Ceará, existem conflitos de identificação reportadas na literatura do gênero *Dasyatis*. Vaz (2005) e Vaz *et al.* (2006) identificaram um exemplar de raia desembarcado no porto do Mucuripe, Fortaleza, como *Dasyatis centroura*. No entanto, Jucá-Queiroz *et al.* (2008) afirmaram que este na verdade se refere a *Dasyatis americana* (Figura 1). Ainda, Charvet-Almeida *et al.* (2008) citam um possível erro de identificação de outros exemplares de *Dasyatis* desembarcados no mesmo porto. Desta

vez, exemplares de *D. colarensis* podem ter sido erroneamente identificados como *D. guttata* por Silva *et al.* (1998, 2001). Por fim, dois padrões de coloração de raias *D. americana* podem ser observados nos desembarques: verde escuro e amarelada, não se sabendo se estes padrões representam espécies diferentes.

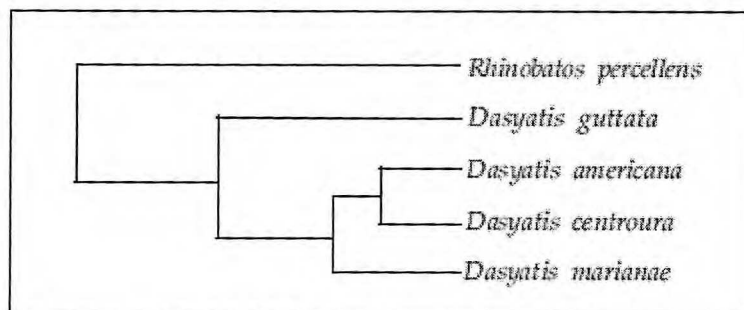


Figura 1 - Árvore filogenética de raias *Dasyatis* amostrada no Porto do Mucuripe, Fortaleza, CE.

Técnicas moleculares podem ser úteis para identificação de espécies de pescado (Carvalho & Pitcher, 1995; Kochzius, 2009). Nos estudos de Vaz (2005) e Vaz *et al.* (2006), a técnica de marcador molecular RANDOM AMPLIFIED POLYMORPHIC DNA (RAPD) foi utilizada para determinação de relações filogenéticas de raias *Dasyatis* do Ceará. Dessa forma, compreender e averiguar o conflito de identificação de espécie reportado por Juca-Queiroz *et al.* (2008) se faz relevante. Isto porque a técnica de RAPD pode ser considerada uma técnica rápida, fácil, de alto polimorfismo e de custo relativamente baixo (Grosberg *et al.* 1996). Estas características a colocam como potencialmente úteis para uso em uma escala mais ampla na região. No entanto, esta mesma técnica possui limitações quanto a reprodutibilidade de resultados, detecção de bandas em gel, dentre outros (Grosberg *et al.* 1996). Dessa forma, se comprovado, um erro de identificação associado a esta técnica, poderia lançar dúvida sobre este potencial.

A partir de uma re-análise de marcadores RAPD obtidos por Vaz (2005) e Vaz *et al.* (2006) o presente estudo teve como objetivo: (1) Investigar a identidade do exemplar de *Dasyatis* identificado como *D. centroura* por Vaz (2005) e Vaz *et al.* (2006); (2) Avaliar o potencial desses marcadores de RAPD para a identificação de raias do gênero *Dasyatis* de um modo geral.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Foram obtidas imagens de gel de reação de PCR (Polymerase Chain Reaction) de cinco dos seis *primers* de RAPD utilizados por Vaz (2005) e Vaz *et al.* (2006) (Apêndices A-E) (Tabela 1). Cada uma dessas reações utilizou DNA extraído de onze raias do gênero *Dasyatis* e uma *Rhinobatos* desembarcadas no Porto do Mucuri, Fortaleza, CE. Segundo identificação original, os exemplares foram os seguintes: *D. americana* (n= 4), *D. marianae* (n= 4), *D. guttata* (n= 2), *D. centroura* (n= 1) e *Rhinobatos percellens* (n= 1). No presente estudo o espécime identificado por Vaz (2005) e Vaz *et al.* (2006) como *Dasyatis centroura* será referido como *Dasyatis sp.*

Tabela 1 - Primers usados na amplificação de marcadores RAPD.

Primer	Sequência 5' - 3'
OPC 20	ACTTCGCCAC
OPE 01	CCCAAGGTCC
OPJ 08	GAACACTGGG
OPK 11	AATGCCCCAG
OPM 01	GTTGGTGGCT

A: adenina; C: citosina; T: timina; G: guanina (Fonte: Operon Technologies, Inc.)

Para cada gel (correspondente a reação de PCR de um *primer*) foi criada uma matriz de presença/ausência de marcadores (APÊNDICE F-J). Com o objetivo de se avaliar o potencial desses marcadores para identificação, foram realizadas análises de parcimônia máxima pelo software PAUP* (Swofford, 2000). Suporte para cada nodo das árvores consenso de cada *primer* foi investigado através de 100 e 10000 pseudoreplicações de bootstrap. Estas foram realizadas para cada *primer* individualmente e em conjunto.

Por último, com fins de se investigar o conflito de identificação na literatura [Vaz (2005) e Vaz *et al.* (2006): *D. centroura*; Jucá-Queiroz *et al.* (2008): *D. americana*], foi realizada uma revisão da foto do espécime em questão [Vaz (2005) pg 21] e das matrizes criadas por Vaz para cada um dos *primers* utilizados em Vaz (2005) e Vaz *et al.* (2006).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Identificação da raia

As análises filogenéticas utilizando a técnica de RAPD mostraram que, quatro dos cinco *primers*, tiveram resolução quanto as inter-relações entre *Dasyatis americana* e *Dasyatis* sp.. Em três *primers*, *D. americana* e *Dasyatis* sp. formaram um grupo monofilético. Na análise em que todos os cinco *primers* foram combinados, este padrão foi novamente obtido (Figura 2). Em apenas um *primer*, *Dasyatis* sp. foi basal em relação aos demais espécimes de *D. americana* (Tabela 2; APÊNDICE O-S).

As análises filogenéticas a partir das matrizes de Vaz (2005) e Vaz *et al.* (2006) dos *primers*, individuais e combinados, foram similares as do presente estudo. Quatro *primers* analisados e a combinação de todos mostraram a formação de um grupo monofilético entre a *D. americana* e *Dasyatis* sp. (Figura 3). E, assim como, neste estudo, apenas um *primer* o referido espécime ficou basal aos demais espécimes de *Dasyatis americana* (Tabela 2; APÊNDICE O-S).

Tabela 2 - Relação filogenética entre *Dasyatis americana* e *Dasyatis* sp. por *primer* e pela combinação dos mesmos para matrizes (1) geradas no presente estudo e (2) utilizadas por Vaz (2005) e Vaz *et al.* (2006).

Clados	Presente Estudo	Vaz (2005) e Vaz <i>et al.</i> (2006)
<i>Dasyatis</i> sp. e	OPC20; OPJ 08; OPE 01;	OPC20; OPJ 08; OPE 01;
<i>D. americana</i> monofilético	Todos <i>primers</i> combinados	OPK 11; Todos <i>primers</i> combinados
<i>Dasyatis</i> sp. basal a	OPM 01	OPM 01
<i>D. americana</i>		
Clado não formado	OPK 11	---

Bootstrap

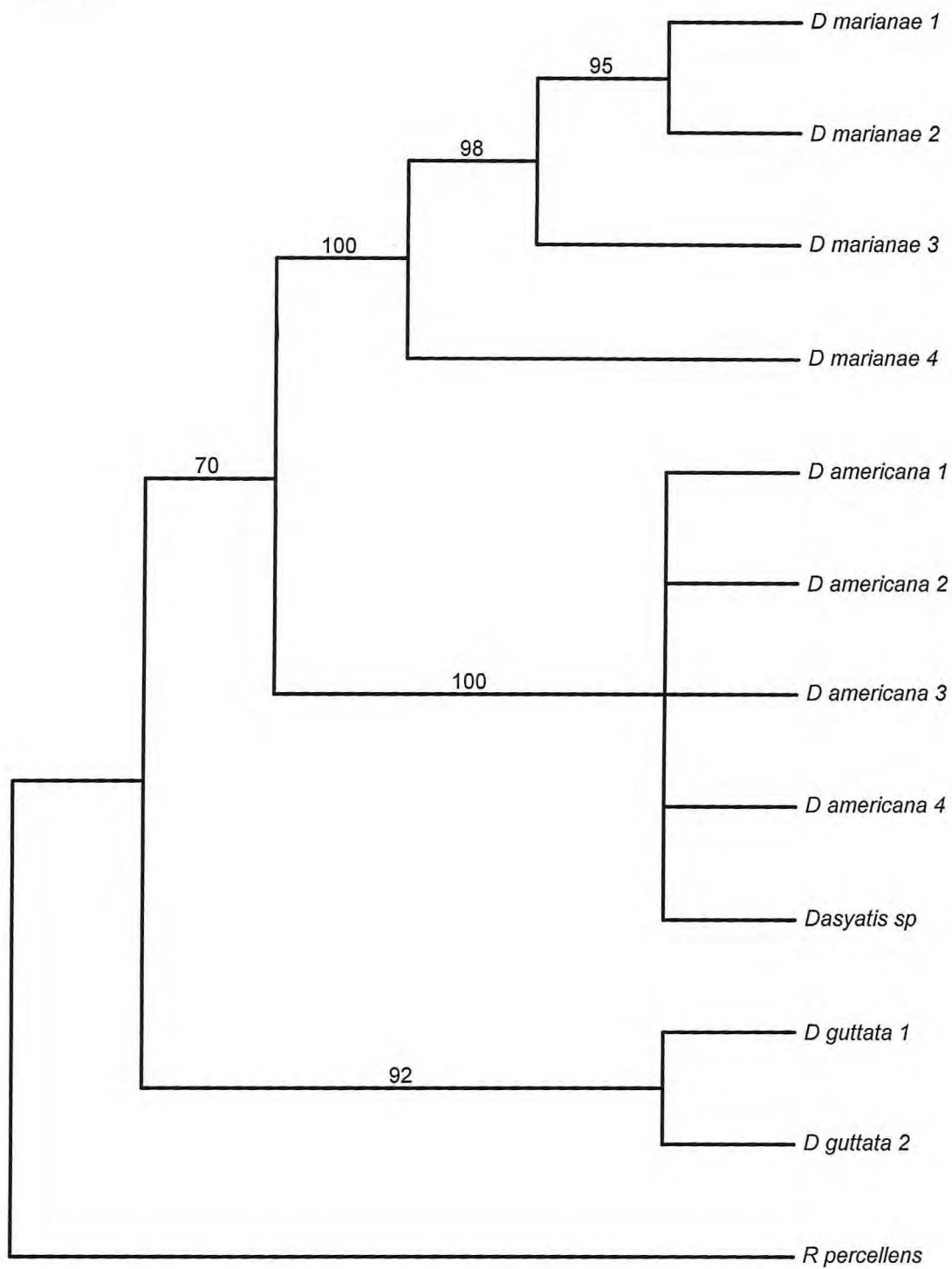


Figura 2 - Árvore consenso de 10000 pseudoreplicatas de bootstrap a partir de análises de parcimônia máxima para de todos *primers* combinados.

Bootstrap

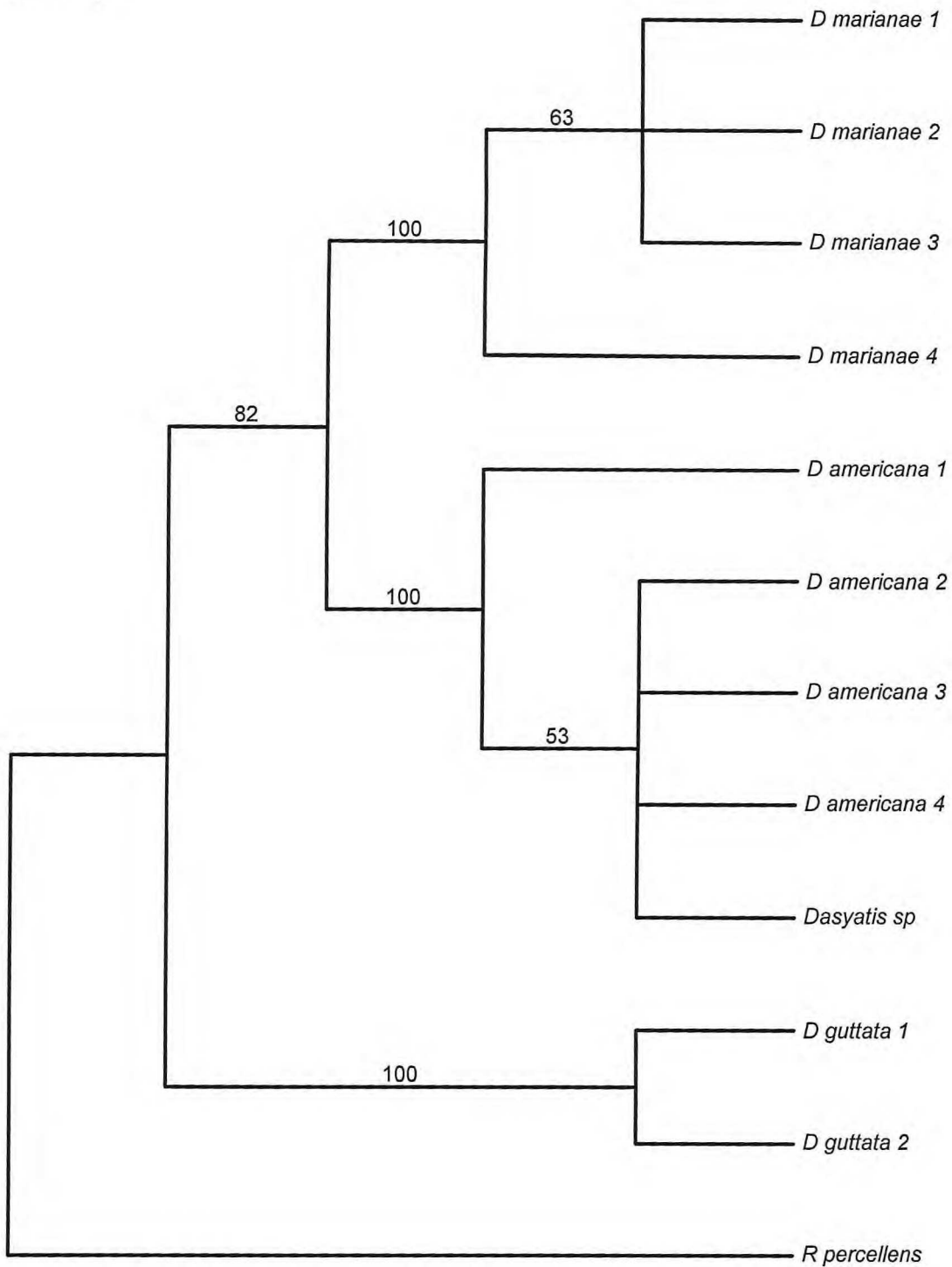


Figura 3 – Árvore consenso de 10000 pseudoreplicatas de bootstrap a partir de análises de parcimônia máxima para todos *primers* combinados.

Dois caracteres morfológicos identificam o espécime *Dasyatis* sp. como *Dasyatis americana* (Figura 4): (1) Possui pequenos espinhos no disco dorsal em cada lado da linha mediana dos tubérculos. (Em *D. centroura* os tubérculos estão espalhados por todo o dorso e de forma aleatória); (2) possui uma dobra cutânea abaixo na cauda. Esta dobra tem quase a mesma espessura da cauda. (Em *D. centroura* esta dobra cutânea possui uma espessura bem menor que a cauda) (Bigelow & Schroeder, 1953).

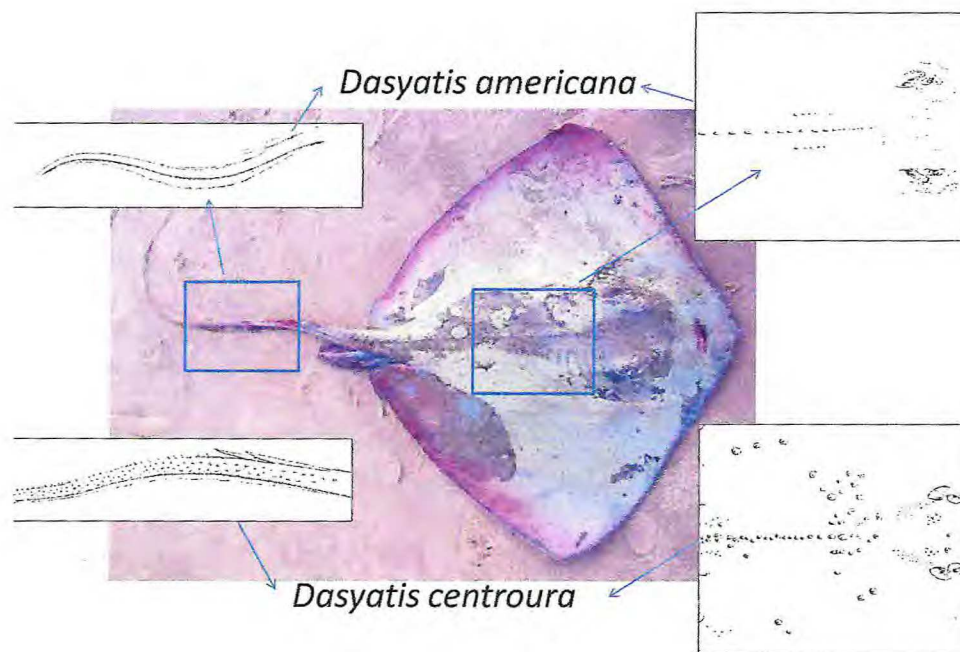


Figura 4 – Espécime identificado como *Dasyatis centroura* por Vaz (2005) e Vaz *et al.* (2006).

3.2 Avaliação da técnica do RAPD

Em três dos cinco *primers*, os grupos monofiléticos de cada espécie foram recuperados. Este padrão foi também predominante na análise incluindo todos os cinco *primers* combinados. Para todos os *primers*, o clado de *Dasyatis marianae* foi recuperado, serem estes úteis para identificação desta espécie (Tabela 2).

Em alguns casos, o julgamento de presença/ ausência de bandas é subjetivo, pois a intensidade de brilhos dos marcadores pode variar (Grosberg *et al.* 1996). Os resultados obtidos a partir de matrizes construídas no presente estudo e por Vaz (2005)

e Vaz *et al.* (2006) foram semelhantes. Dessa forma duas pessoas tiveram interpretações parecidas sobre presença/ ausência de bandas de forma independente. Isto reforça que, apesar de suas limitações, a técnica de RAPD tem potencial para ao menos a realização de trabalhos exploratórios.

Tabela 3 – Grupos monofiléticos formados por cada *primer* e pela combinação dos mesmos com bootstrap de 10000 pseudoreplicações..

Grupos monofiléticos	OPC 20		OPE 01		OPJ 08		OPK 11		OPM 01		TODOS	
	P. E	Vaz	P. E	Vaz	P. E	Vaz	P. E	Vaz	P. E	Vaz	P. E	Vaz
<i>D. marianae</i>	SIM	SIM	SIM	SIM	SIM	SIM	SIM	SIM	SIM	SIM	SIM	SIM
<i>D. americana</i>	SIM	SIM	SIM	SIM	SIM	SIM	NÃO	SIM	SIM	SIM	SIM	SIM
<i>D. guttata</i>	SIM	SIM	NÃO	SIM	SIM	SIM	NÃO	SIM	SIM	SIM	SIM	SIM

P.E: Análises realizadas a partir da matriz do presente estudo; Vaz: Análises realizadas a partir da matriz de Vaz (2005) e Vaz *et al.* (2006)

Os resultados após 10000 pseudoreplicações de bootstrap, tanto a partir das matrizes geradas no presente estudo, quanto das geradas por Vaz (2005) e Vaz *et al.* (2006), mostraram que o referido espécime *Dasyatis* sp. forma predominante um clado com outros indivíduos de *D. americana* de forma indistinta. Portanto, por que em Vaz (2005) e Vaz *et al.* (2006) o erro de identificação do espécime não foi identificado nas análises genéticas? Isto pode, pelo menos em parte, se dever as análises de dados realizados por Vaz (2005) e Vaz *et al.* (2006), que não incluíram testes estatísticos bootstrap de árvores filogenéticas obtidas.

No presente estudo, árvores não submetidas a bootstrap ou submetidas um número baixo de pseudoreplicações (100, ver APÊNDICES T- Z) também recuperaram uma topologia próxima a apresentada por Vaz (2005) e Vaz *et al.* (2006) (Figura 1). Dessa forma, os resultados do presente estudo demonstram que, qualquer polimorfismo que indique o indivíduo *Dasyatis* sp. como basal a outros *D. americana*, não se sustenta em análises de maior robustez.

Este trabalho atesta para a importância de análises detalhadas de dados moleculares e que os marcadores de RAPD utilizados foram capazes de satisfatoriamente identificar as diferentes espécies amostradas.

REFERÊNCIAS

- Bigelow, H.B. & Schroeder, W.C. Fishes of the western North Atlantic. Part Two: sawfishes, skates and rays. Mem. Sears Found. Mar. Res., v. 2, p.1–588, 1953.
- Carvalho, G. R. & Pitcher, T. J. (1995) Molecular Genetics in Fisheries. Chapman & Hall, 141p.
- Charvet-Almeida, P.; Lins, P. M. O. ; Almeida, M. P. Diet composition of the Whiptail Stingray *Dasyatis colarensis* Santos, Gomes & Charvet-Almeida, 2004 (Chondrichthyes: Dasyatidae) in the Colares Island Region, Pará, Brazil. Arquivos de Ciências do Mar, v. 41, p. 29 - 33, 2008.
- Furtado-Neto, M.A.A.; Barros-Junior, F.V.P. Análise da produção pesqueira de elasmobrânquios no Estado do Ceará, Brasil, de 1991 a 2003. Arquivos de Ciências do Mar, v. 39, p. 110 – 116, 2006.
- Gomes, U. L.; Rosa, R. S.; & Gadig, O. B. F. 2000. *Dasyatis marianae* sp. n.: A New Species of Stingray (Chondrichthyes: Dasyatidae) from the Southwestern Atlantic. *Copeia* (2), 510 – 515.
- Grosberg, R. K.; Levitan, D. R.; Cameron, B. B. Characterization of genetic structure and genealogies using RAPD-PCR markers: a random primer for the novice and nervous. In, Ferraris J. D.; Palumbi S. R.. MOLECULAR ZOOLOGY ADVANCES, STRATEGIES, AND PROTOCOLS. Wiley- Liss; p. 65 – 95, 1996.
- IBAMA. Boletim estatístico da pesca marítima e estuarina do nordeste do Brasil, 2004. Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis, 2005.
- Kochzius, M. (2009) Trends in fishery genetics. In Beamish, R. J. & Rothschild, B. J. (eds.) The Future of Fisheries Science in North America. Fish & Fisheries Series, Springer Science, p. 453-493.

Sezaky, K.; Begum, R. A.; Wongrat, P.; Srivastava, M. P.; Srikantha, S.; Kikuchi, K.; Ishihara, H.; Tanaka, S.; Taniuchi, T. & Watabe, S. 1999. Molecular Phylogeny of Asian Freshwater and Marine Stingrays Based on DNA Nucleotide and Deduced Amino Acid Sequences of the Cytochrome *b* Gene. *Fisheries Science* 65: (4), 563 – 570.

Silva, G. B.; Viana, M. S. R. & Furtado-Neto, M. A. A. Morfologia e alimentação da raia *Dasyatis guttata* (CHONDRICHTHYES: DASYATIDAE) na enseada do Mucuripe, Fortaleza, Ceará. *Arq. Ciên. Mar.*, Fortaleza, v. 34, p. 67 - 75, 2001.

Silva, G. B.; Alencar, C. A. G. & Fonteles, P. C. Análise do conteúdo estomacal da raia manteiga *Dasyatis guttata* (CHONDRICHTHYES: DASYATIDAE) acompanhante da pesca do camarão na enseada do Mucuripe, Fortaleza - CE, p. 246 - 247, *Resumos do XXII Congresso Brasileiro de Zoologia*, 1998

Spender, M. 2002. "Dasyatis americana" (On-line), Animal Diversity Web. Acesso em 17 de Agosto de 2005.

http://animaldiversity.ummz.umich.edu/site/accounts/information/Dasyatis_americana.html.

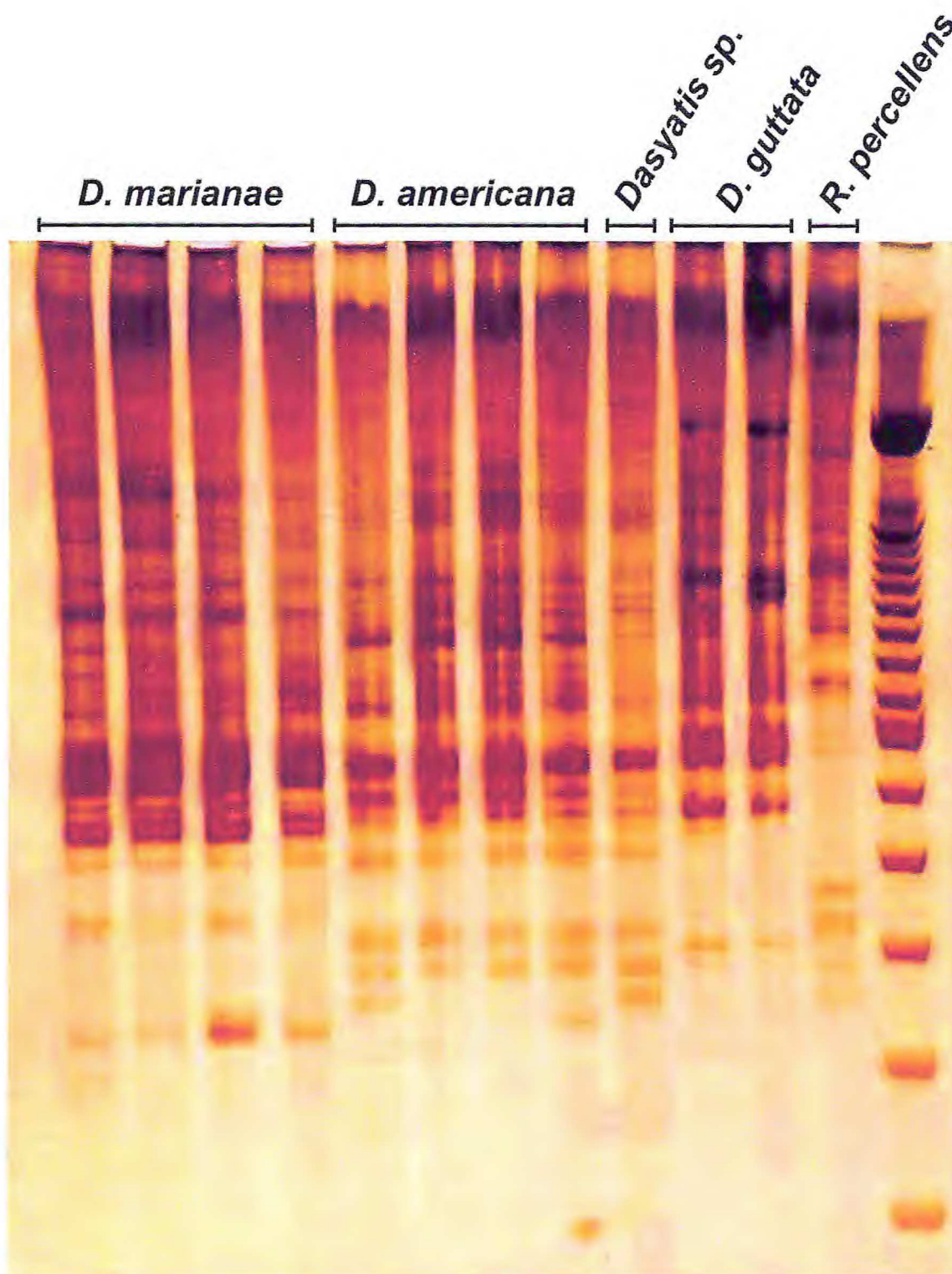
Swofford, D. L.; PAUP*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and Other methods). Version 4. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts. 2000.

Vaz, L. A. L.; Carreiro, C. R. P.; Goulart-Filho, L. R.; Furtado-Neto, M. A. A. Relações filogenéticas em raias (*Dasyatis*, Elasmobranchii) do Estado do Ceará, Brasil. *Arquivos de Ciências do Mar*, v. 39, p. 86 - 88, 2006.

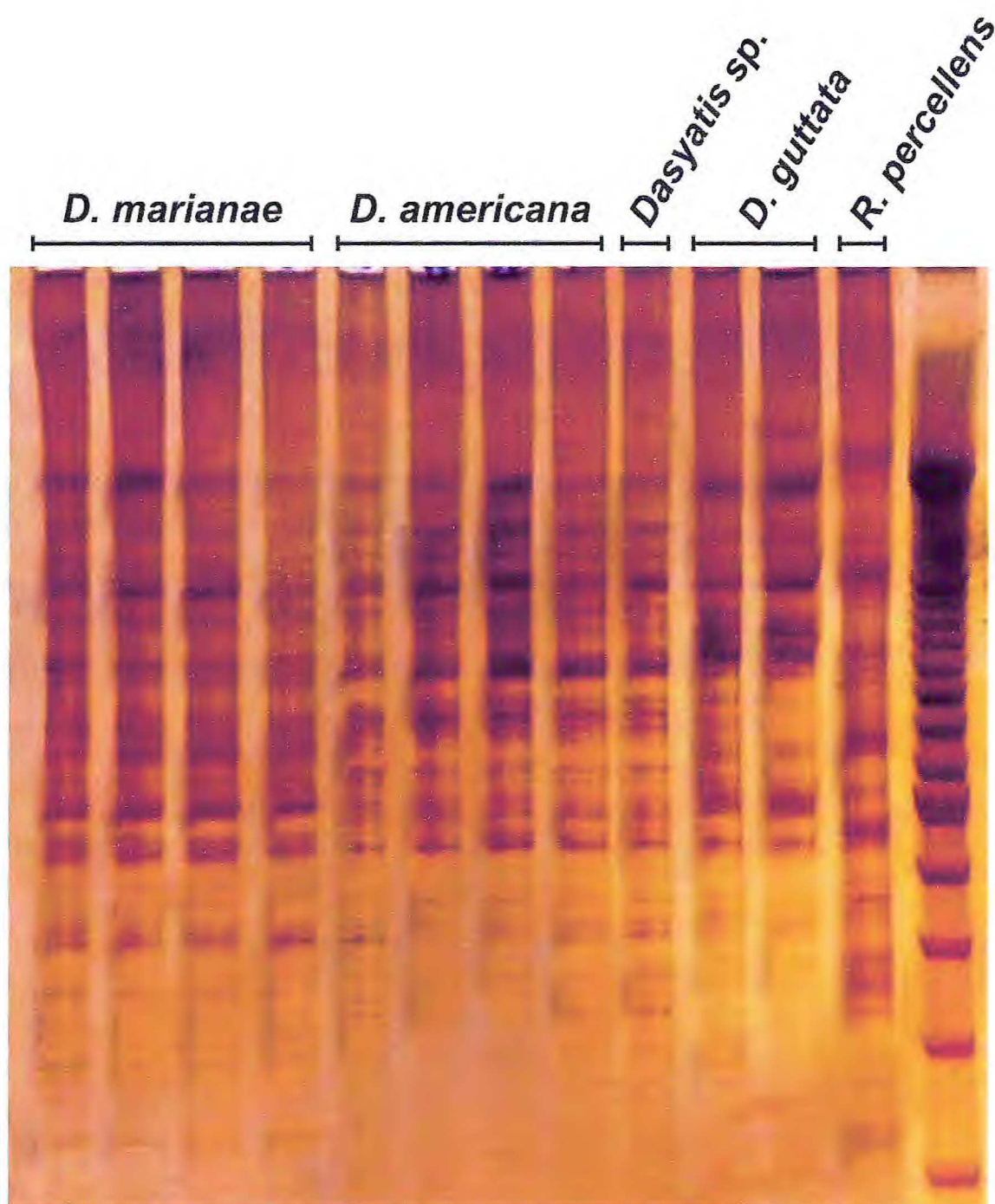
Vaz, L. A. L. Variabilidade genética em raias do gênero *Dasyatis* do Estado do Ceará. Dissertação de Mestrado em Engenharia de Pesca, Universidade Federal do Ceará, p. 51, 2005.

APÊNDICES

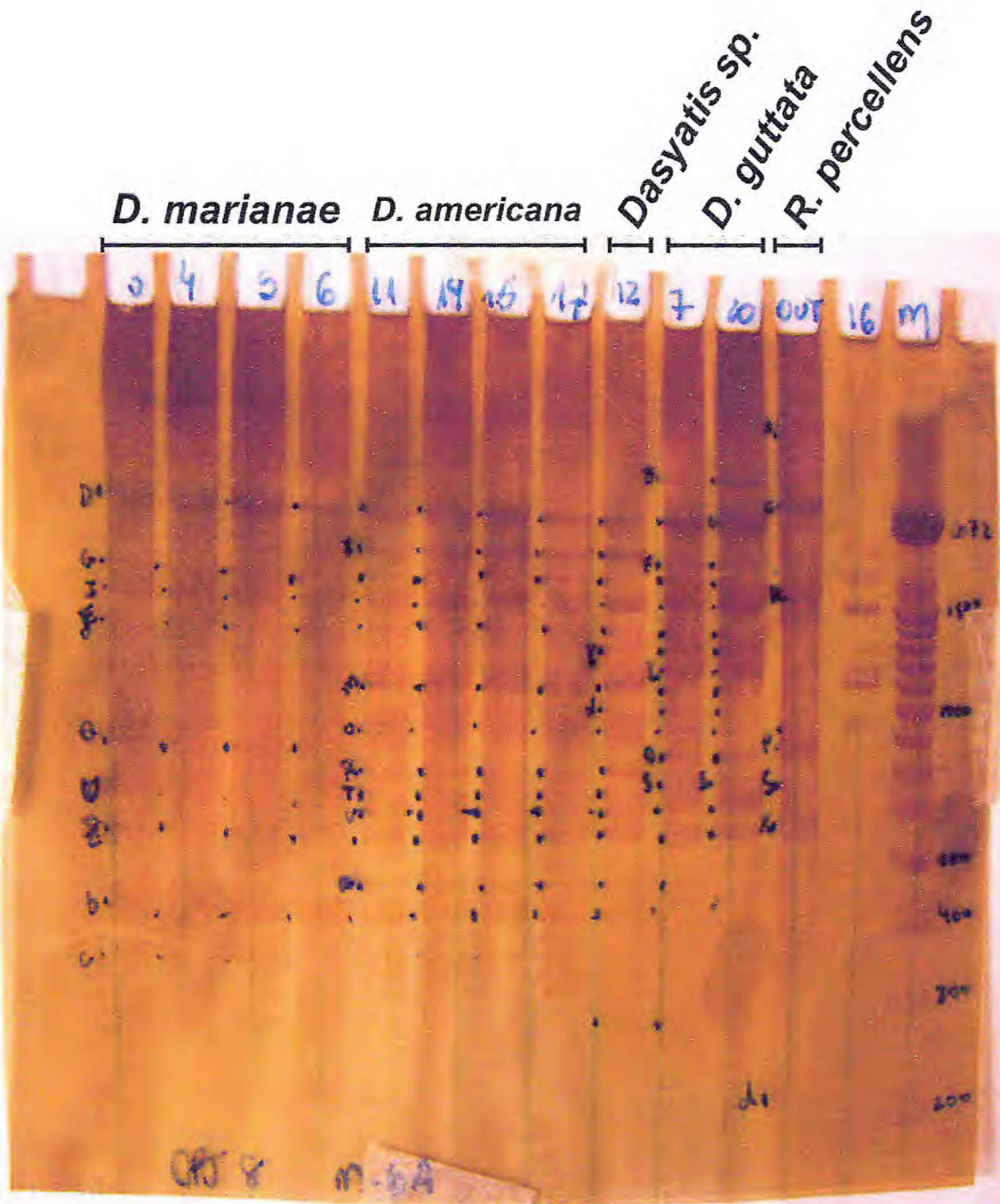
APÊNDICE A – Imagem de gel de reação de PCR-RAPD utilizando-se o *primer* OPC 20 (imagem cedida por Letícia Vaz).



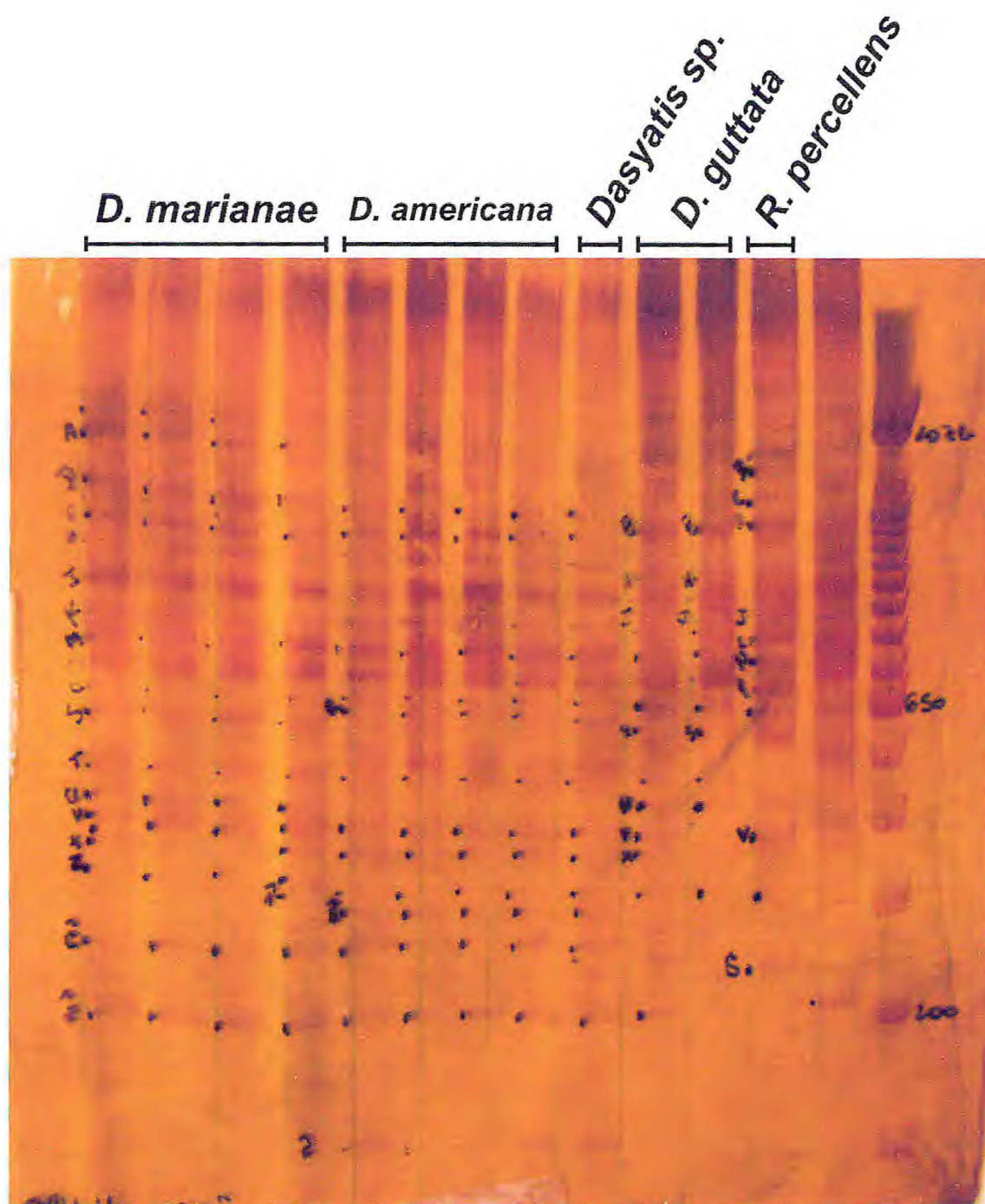
APÊNDICE B – Imagem de gel de reação de PCR-RAPD utilizando-se o *primer* OPE 01 (imagem cedida por Letícia Vaz).



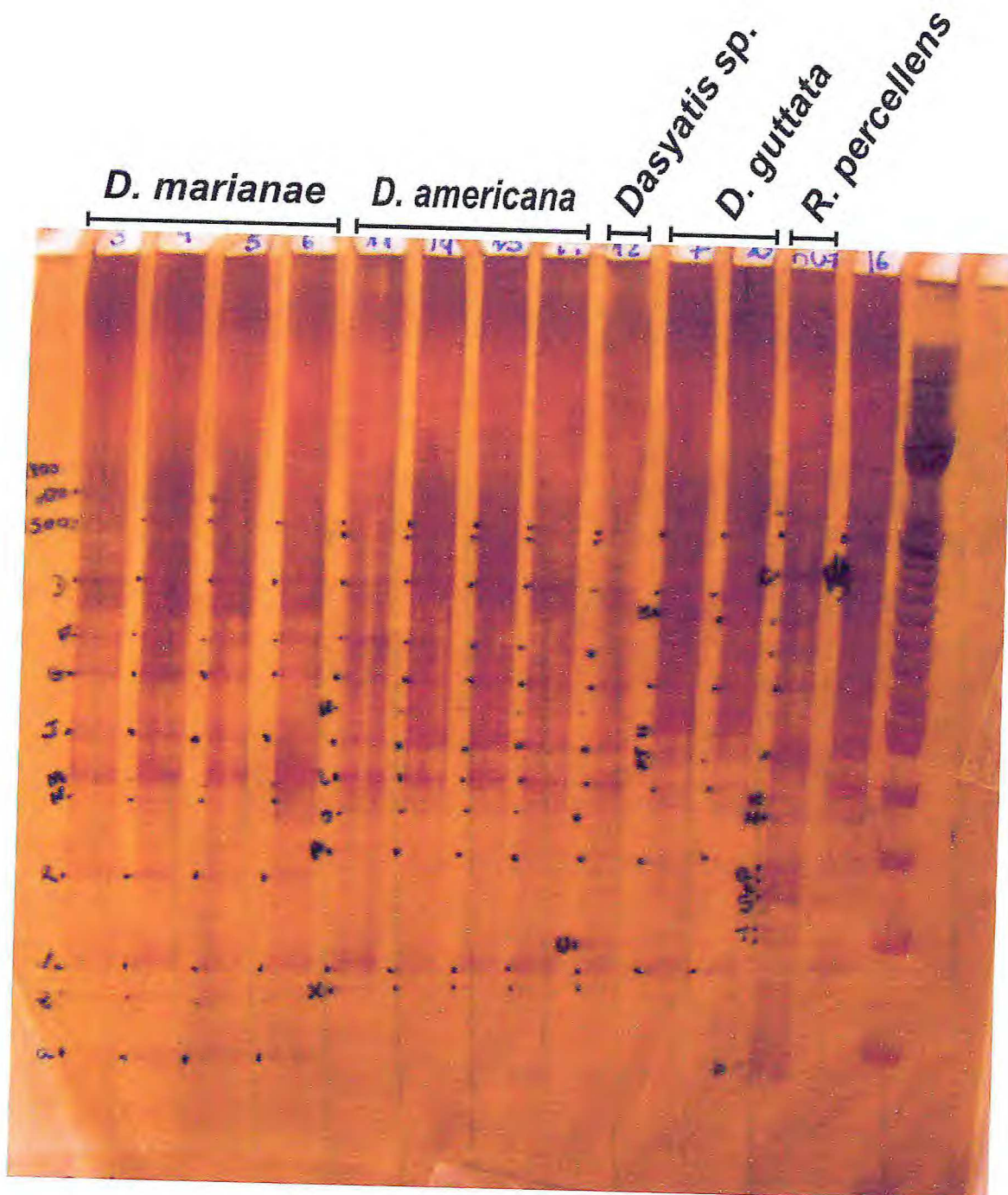
APÊNDICE C – Imagem de gel de reação de PCR-RAPD utilizando-se o *primer* OPJ 08 (imagem cedida por Letícia Vaz).



APÊNDICE D – Imagem de gel de reação de PCR-RAPD utilizando-se o *primer* OPK 11 (imagem cedida por Letícia Vaz).



APÊNDICE E – Imagem de gel de reação de PCR-RAPD utilizando-se o *primer* OPM 01 (imagem cedida por Leticia Vaz).



APÊNDICE F - Arquivo tipo Nexus contendo matriz construída no presente estudo utilizando-se imagem de gel de reação RAPD- PCR a partir do *primer* OPC 20.

```
#NEXUS

Begin DATA;
  Dimensions ntax=12 nchar=42;
  Format missing=N gap= - datatype= DNA symbols="10";

  Matrix

D_mariana_1      011001001100100100101001000110101010000001
D_mariana_2      01100100101010010010000100011010100000001
D_mariana_3      011001001011100100100001000110101010000010
D_mariana_4      011001000011100100000001010011001010000010
D_americana_1    000001001001110101000110000010001001111000
D_americana_2    000001101011110101010100000010010001111000
D_americana_3    000001100000110101010100000101011001101000
D_americana_4    000001011011110101010110001100011001110100
Dasytis_sp       100001001011110101000010001100010001001000
D_guttata_1      000100000000100101000000000001000000110000
D_guttata_2      0001000001001100001000000000000000000100000
R_percellens     000010000001101010000100100000000111010000

;
End;
```

APÊNDICE H- Arquivo tipo Nexus contendo matriz construída no presente estudo utilizando-se imagem de gel de reação RAPD- PCR a partir do *primer* OPJ 08.

```
#NEXUS

Begin DATA;
  Dimensions ntax=12 nchar=43;
  Format missing=N gap= - datatype= DNA symbols="10";

  Matrix

D_mariana_1 0011110011101010110000010100100101000011000
D_mariana_2 0011010011101010000000010100100101000011000
D_mariana_3 0011010011101010100000010100100101000011000
D_mariana_4 0011010011101010100000010100100101010010001
D_americana_1 0011010100110001000101101101011010010010000
D_americana_2 0011010100110101010101101101011010010010000
D_americana_3 0011010100110001010101101101011010010010010
D_americana_4 0011010100110101010101101001011010010110000
Dasyatis_sp 0010010100110101010101101101011010010110010
D_guttata_1 0010001000101111010010010101000010011010101
D_guttata_2 1010101000100111010000010101000010000110100
R_percellens 0110101001010011101000111010001000110000101

;
End;
```

APÊNDICE H- Arquivo tipo Nexus contendo matriz construída no presente estudo utilizando-se imagem de gel de reação RAPD- PCR a partir do *primer* OPK 11.

```
#NEXUS
Begin DATA;
  Dimensions ntax=12 nchar=26;
  Format missing=N gap= - datatype= DNA symbols="10";

  Matrix

D_mariana_1      00100001100000001000100101
D_mariana_2      00100001100000001000100101
D_mariana_3      00100001100000001000100101
D_mariana_4      00100001100000001000100101
D_americana_1    00110101100110100101010101
D_americana_2    00110101100110100101000111
D_americana_3    00110101100110100100000111
D_americana_4    00110101100110100100000111
Dasyatis_sp      00110101110111100101010111
D_guttata_1      10101101111111101001000100
D_guttata_2      10101101111111101001000100
R_percellens     01001010000000010010001100

;
End;
```

APÊNDICE I - Arquivo tipo Nexus contendo matriz construída no presente estudo utilizando-se imagem de gel de reação RAPD- PCR a partir do *primer* OPM 01.

```
#NEXUS

Begin DATA;
  Dimensions ntax=12 nchar=27;
  Format missing=N gap= - datatype= DNA symbols="10";

  Matrix

D_mariana_1      100010111101010000111100101
D_mariana_2      100010111101010000111100101
D_mariana_3      100010111101010000111100101
D_mariana_4      000010111101010100111110101
D_americana_1    000010111101010101000011101
D_americana_2    000011111101010101000011101
D_americana_3    000010111101010101010010101
D_americana_4    000010111101010101000000101
Dasyatis_sp      000000111001010101000001101
D_guttata_1      010001000000010010010000001
D_guttata_2      010001000000010010000000000
R_percellens     011101000010101010100100010

;
End;
```

APÊNDICE J - Arquivo tipo Nexus contendo matriz de Vaz (2005) e Vaz *et al.* (2006) utilizando-se imagem de gel de reação RAPD- PCR a partir do *primer* OPC 20.

```
#NEXUS

Begin DATA;
  Dimensions ntax=12 nchar=27;
  Format missing=N gap= - datatype= DNA symbols="10";

  Matrix

D_mariana_1  0000101101001101000100001011
D_mariana_2  0000101101001101000100001011
D_mariana_3  0000101101001001000100001011
D_mariana_4  0001101101001001000100001011
D_americana_1 0100100111001010100000001100
D_americana_2 0110100111101010100000001100
D_americana_3 0110110111101010100000001100
D_americana_4 00001101111010101000000011100
Dasyatis_sp  0000110001001010100000001000
D_guttata_1  0000000001111000000000001000
D_guttata_2  0000001101110001000000001000
R_percellens 1001001101001000011011100000

;
End;
```

APÊNDICE K - Arquivo tipo Nexus contendo matriz de Vaz (2005) e Vaz *et al.* (2006) utilizando-se imagem de gel de reação RAPD- PCR a partir do *primer* OPE 01.

```
#NEXUS

Begin DATA;
  Dimensions ntax=12 nchar=28;
  Format missing=N gap= - datatype= DNA symbols="10";

  Matrix

D_mariana_1      00110010101000011101110110000
D_mariana_2      00110010101000011101110110000
D_mariana_3      00110010101000011101110110000
D_mariana_4      00110010101000011101110110000
D_americana_1    00011000111011011011010001010
D_americana_2    00011000111011011011010001010
D_americana_3    00011000111011011011010001010
D_americana_4    00011000111011011011010001010
Dasyatis_sp      00011100111011011011010001011
D_guttata_1      01101010100010011001000000100
D_guttata_2      01101010100000011001000000100
R_percellens     11100001000100100000001011010

;
End;
```

APÊNDICE L - Arquivo tipo Nexus contendo matriz de Vaz (2005) e Vaz *et al.* (2006) utilizando-se imagem de gel de reação RAPD- PCR a partir do *primer* OPJ 08.

```
#NEXUS

Begin DATA;
  Dimensions ntax=12 nchar=36;
  Format missing=N gap= - datatype= DNA symbols="10";

  Matrix

D_mariana_1      000110001011010000000110010101011010
D_mariana_2      000110001011010000000110010101011010
D_mariana_3      000110001011010000000110010101011010
D_mariana_4      000110001011010000000110010101011010
D_americana_1    000111010011001001010010101101011000
D_americana_2    000111010011001011010010101101011000
D_americana_3    000111010011001011010010101101011000
D_americana_4    000111010011001011010010101101011000
Dasyatis_sp      000111010011001011010010101101011100
D_guttata_1      100100110010110010100000110101011000
D_guttata_2      100100110010110010100000110101001000
R_percellens     011100110100010100001101000010111001

;
End;
```

APÊNDICE M - Arquivo tipo Nexus contendo matriz de Vaz (2005) e Vaz *et al.* (2006) utilizando-se imagem de gel de reação RAPD- PCR a partir do *primer* OPK 11.

```
#NEXUS

Begin DATA;
  Dimensions ntax=12 nchar=27;
  Format missing=N gap= - datatype= DNA symbols="10";

  Matrix

D_mariana_1      000100101100000010001001011
D_mariana_2      000100101100000010001001011
D_mariana_3      000100101100000010001001011
D_mariana-4      000100101100000010001001011
D_americana_1    000110101100101001010101111
D_americana_2    000110101100101001010101111
D_americana_3    000110101100101001010101111
D_americana_4    000110101100101001010101111
Dasyatis_sp      000110101110111001010101111
D_guttata_1      0101011011111111010100101110
D_guttata_2      0101011011111111010100101010
R_percellens     101001010000001100100010000

;
End;
```

APÊNDICE N - Arquivo tipo Nexus contendo matriz de Vaz (2005) e Vaz *et al.* (2006) utilizando-se imagem de gel de reação RAPD- PCR a partir do *primer* OPM 01.

```
#NEXUS

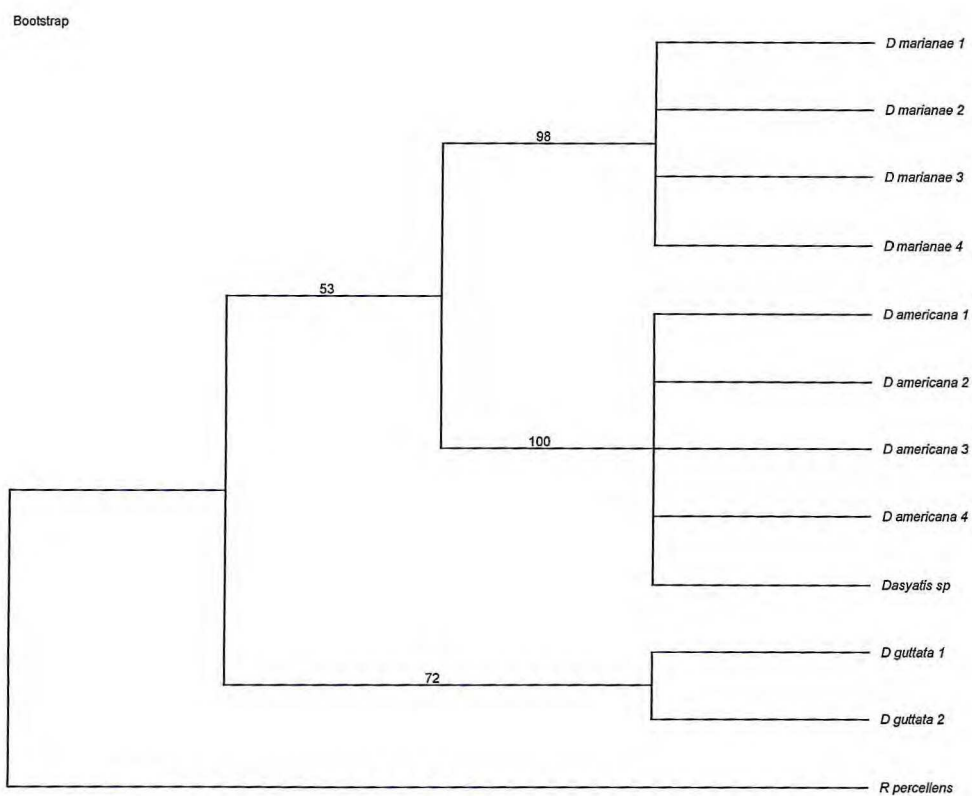
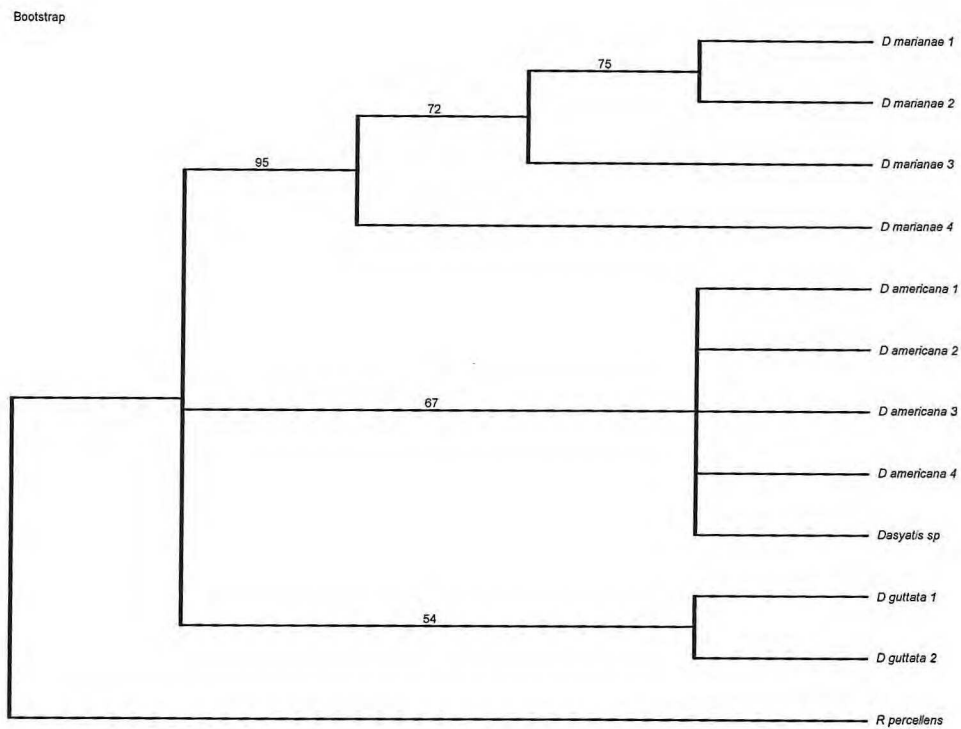
Begin DATA;
  Dimensions ntax=12 nchar=30;
  Format missing=N gap= - datatype= DNA symbols="10";

  Matrix

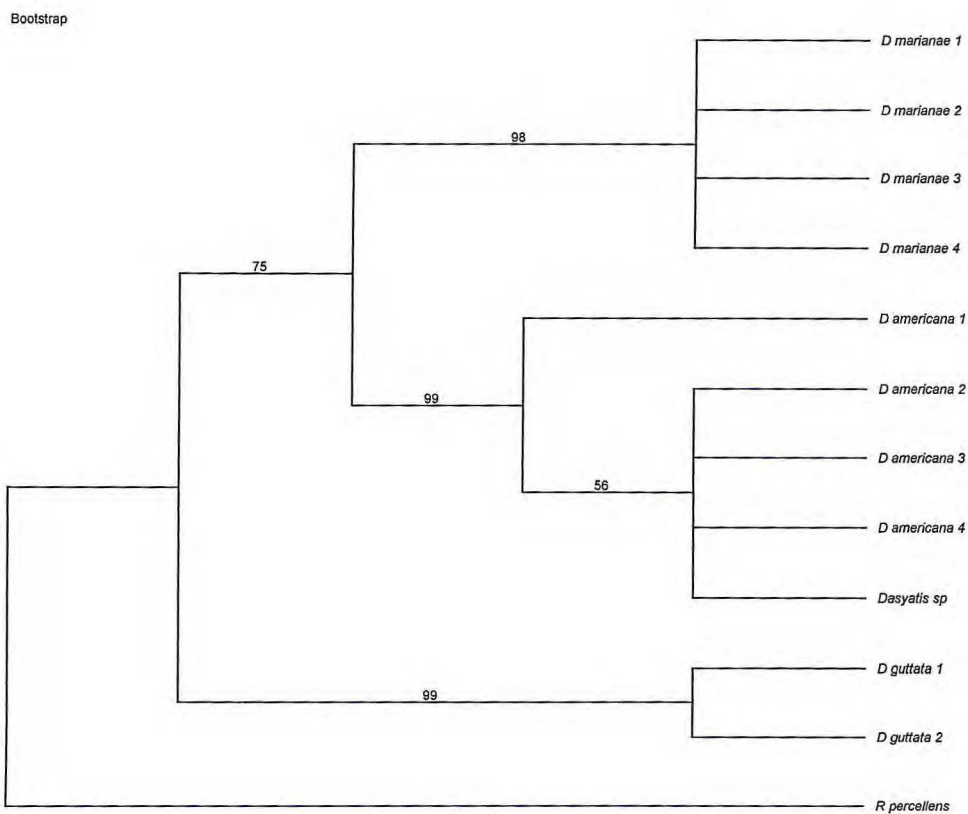
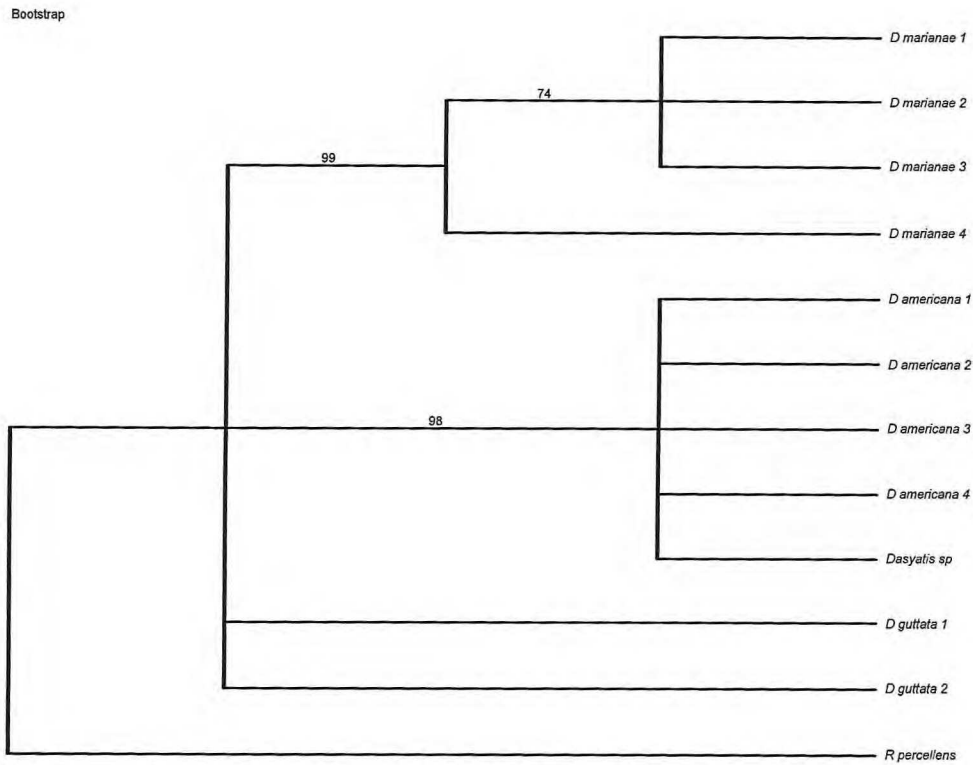
D_mariana_1      100101101010101010111111001010
D_mariana_2      100101101010101010111111001010
D_mariana_3      100101101010101010111111001010
D_mariana_4      100101101010101010111111101010
D_americana_1    00010110101010101011010110111011
D_americana-2    00010110101010101011010110111011
D_americana_3    00010110101010101011010110111011
D_americana-4    00010110101010101011010110111011
Dasyatis_sp      00010110101010101011010110111011
D_guttata_1      000010011110101010111110100010
D_guttata_2      000010011110101010111110100000
R_percellens     111101001101010110001100100100

;
End;
```

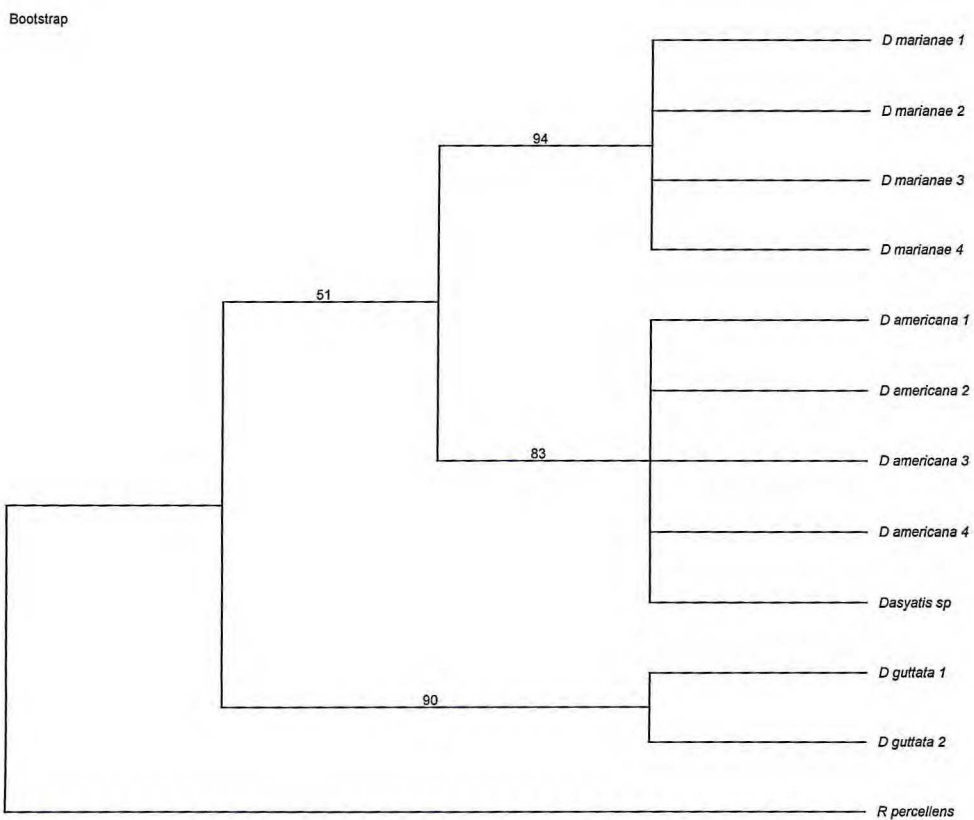
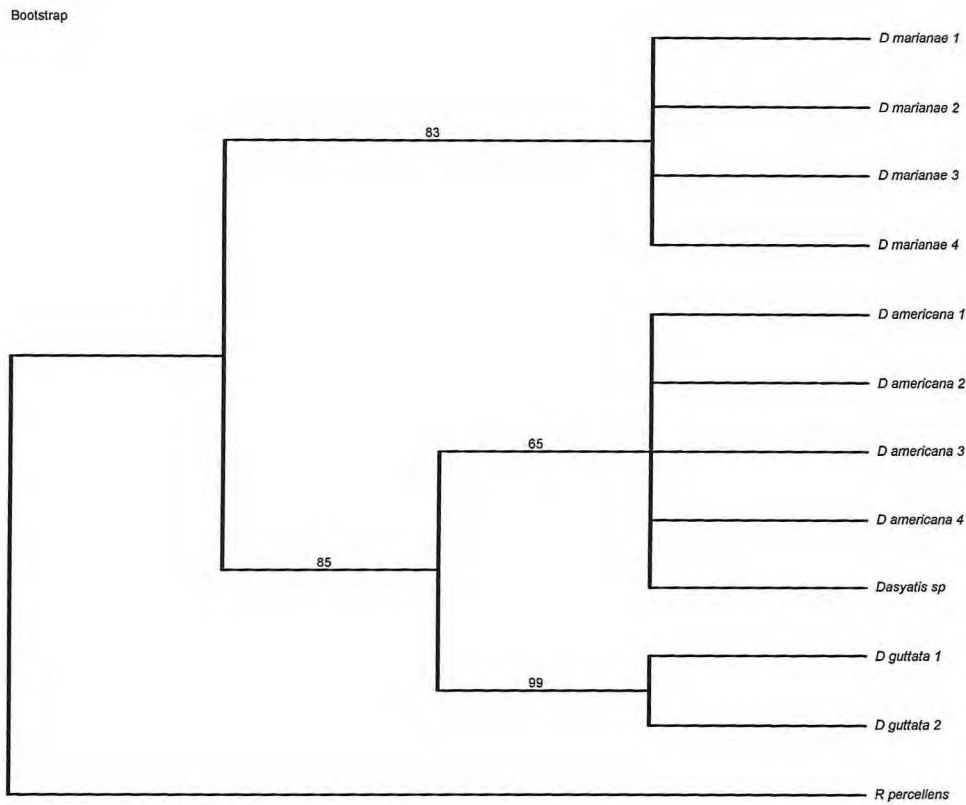
APÊNDICE O – Árvore consenso de 10000 pseudoreplicatas de bootstrap a partir de análises de parcimônia máxima para o *primer* OPC 20. Superior: Utilizando-se matriz gerada no presente estudo; Inferior: Utilizando-se matriz de Vaz (2005) e Vaz *et al.* (2006).



APÊNDICE P – Árvore consenso de 10000 pseudoreplicatas de bootstrap a partir de análises de parcimônia máxima para o *primer* OPE 01. Superior: Utilizando-se matriz gerada no presente estudo; Inferior: Utilizando-se matriz de Vaz (2005) e Vaz *et al.* (2006).

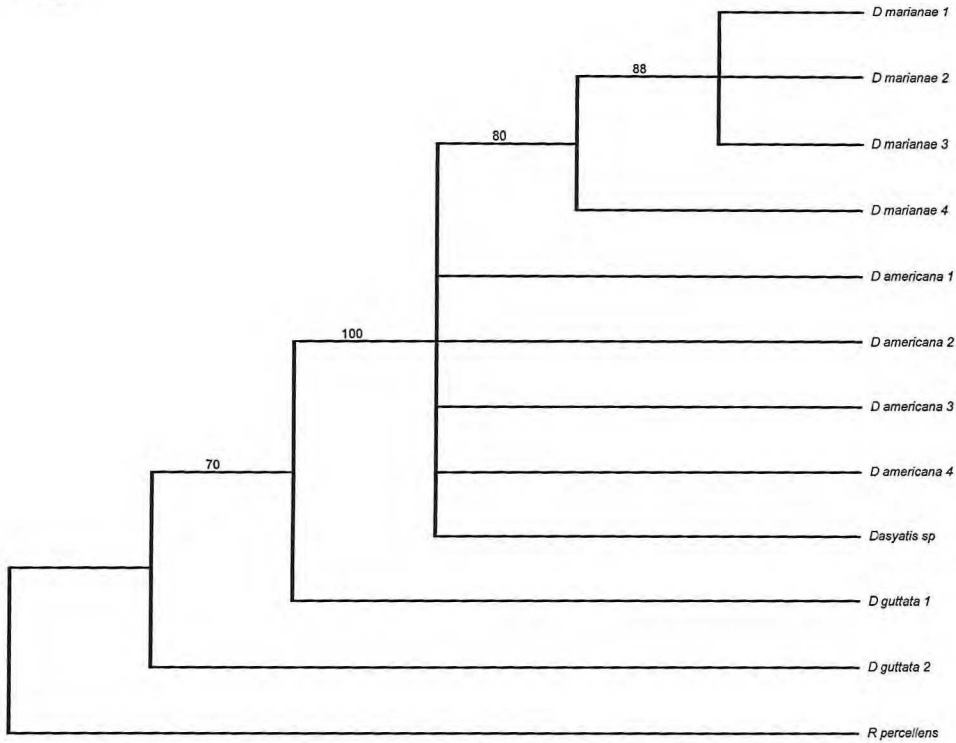


APÊNDICE Q – Árvore consenso de 10000 pseudoreplicatas de bootstrap a partir de análises de parcimônia máxima para o *primer* OPJ 08. Superior: Utilizando-se matriz gerada no presente estudo; Inferior: Utilizando-se matriz de Vaz (2005) e Vaz *et al.* (2006).

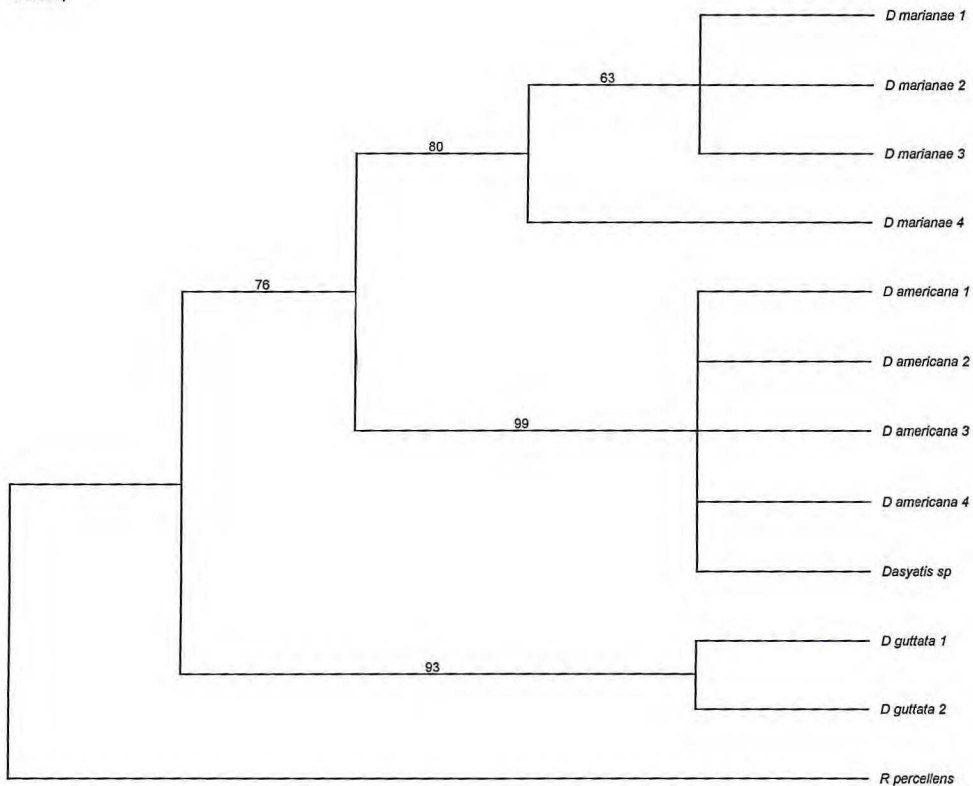


APÊNDICE R – Árvore consenso de 10000 pseudoreplicatas de bootstrap a partir de análises de parcimônia máxima para o *primer* OPK 11. Superior: Utilizando-se matriz gerada no presente estudo; Inferior: Utilizando-se matriz de Vaz (2005) e Vaz *et al.* (2006).

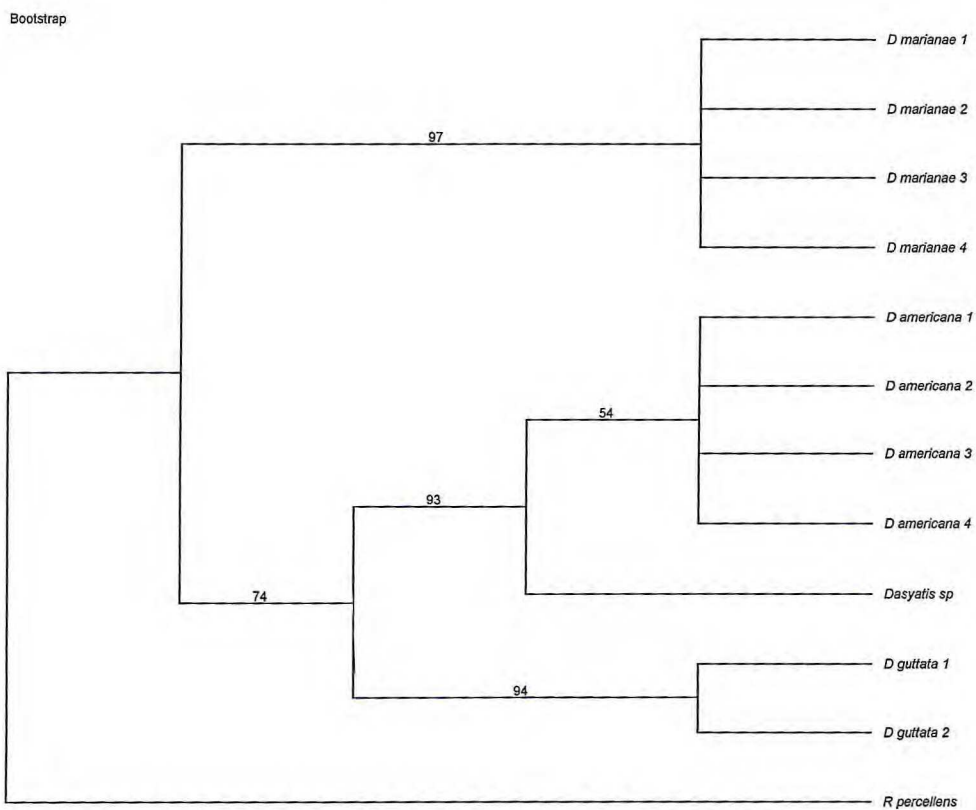
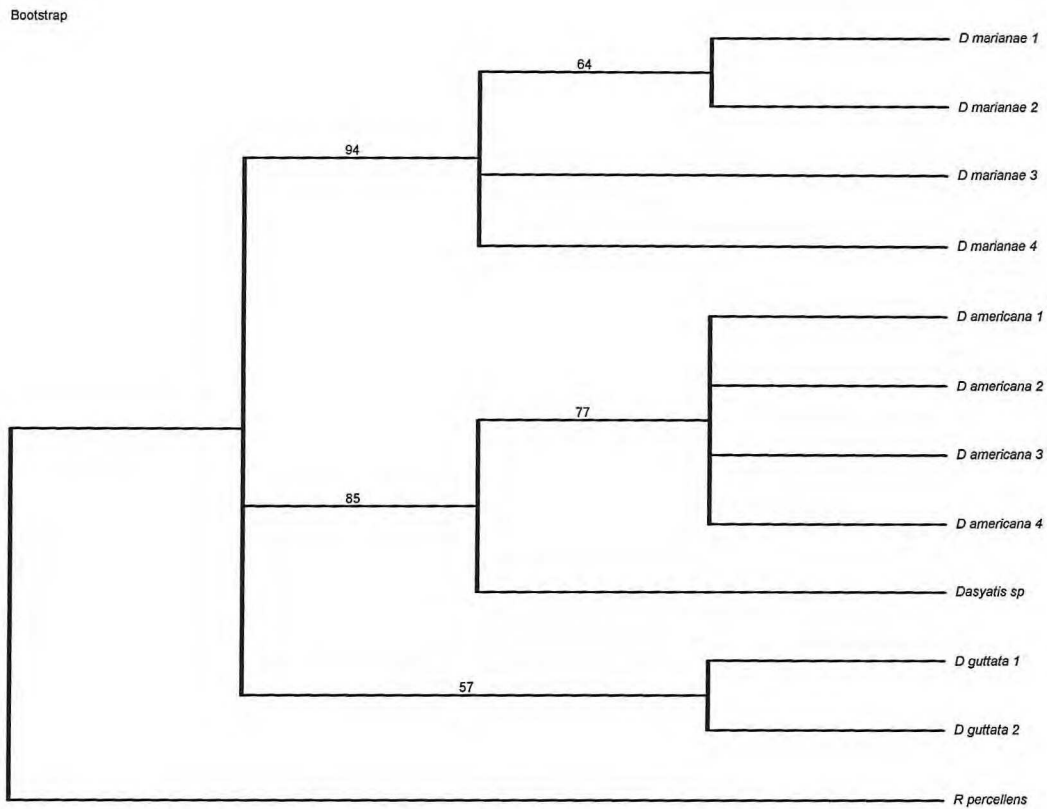
Bootstrap



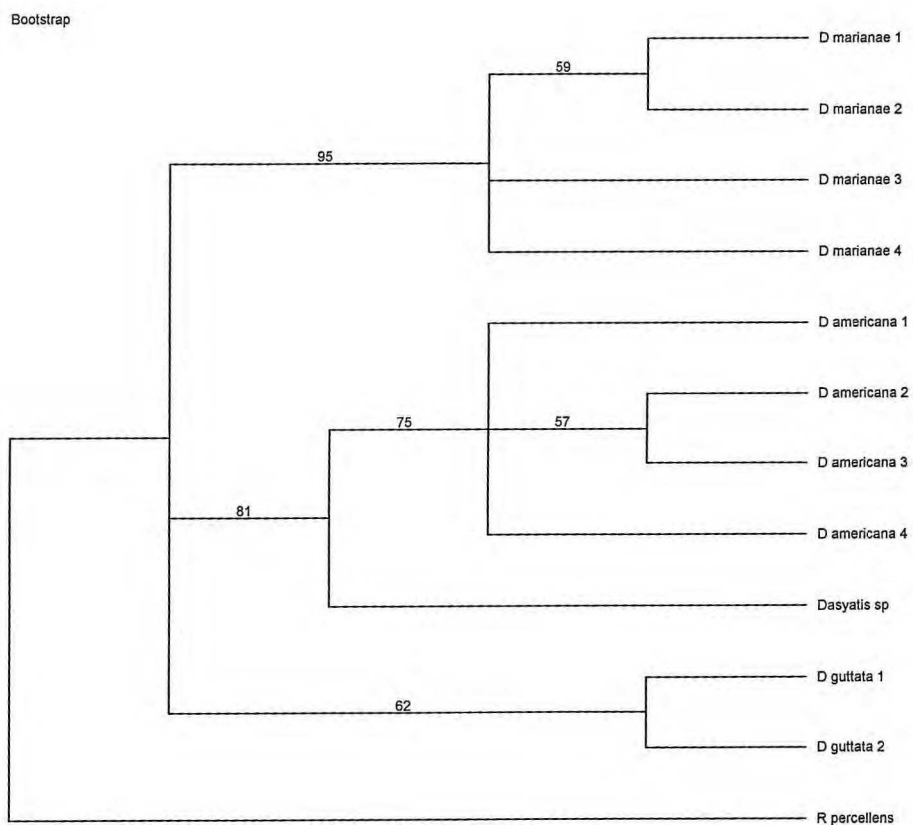
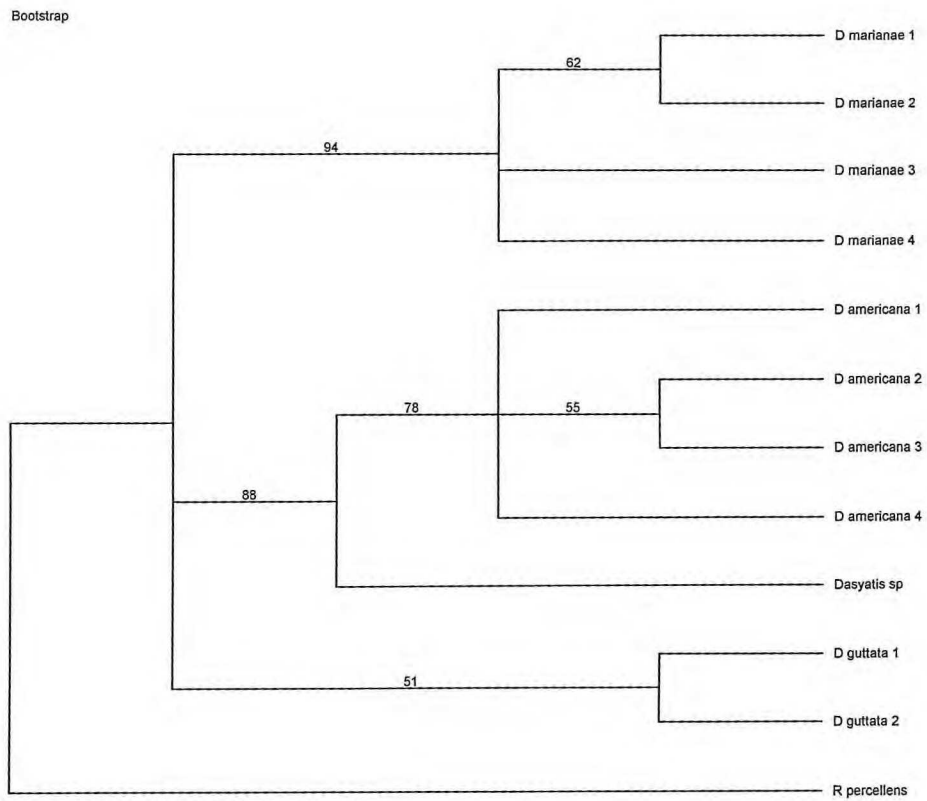
Bootstrap



APÊNDICE S – Árvore consenso de 10000 pseudoreplicatas de bootstrap a partir de análises de parcimônia máxima para o *primer* OPM 01. Superior: Utilizando-se matriz gerada no presente estudo; Inferior: Utilizando-se matriz de Vaz (2005) e Vaz *et al.* (2006).

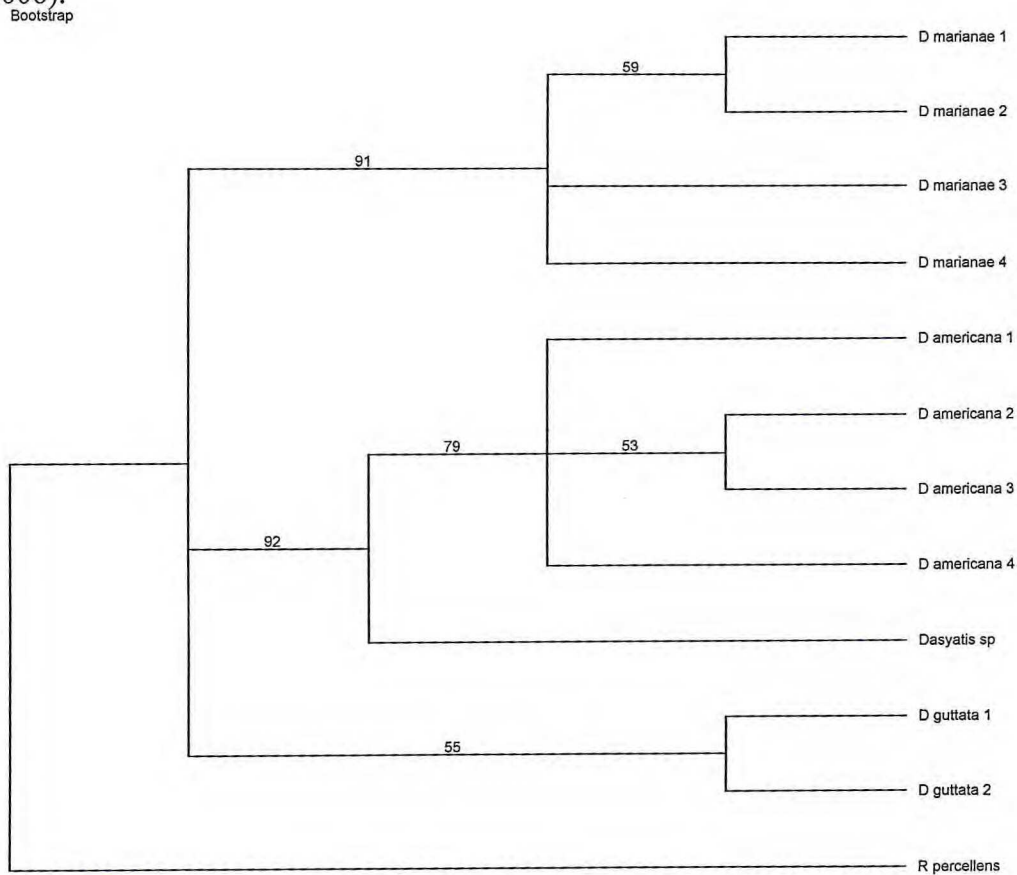


APÊNDICE T – Árvore consenso de 100 pseudoreplicatas de bootstrap a partir de análises de parcimônia máxima para o *primer* OPC 20. Superior: Utilizando-se matriz gerada no presente estudo; Inferior: Utilizando-se matriz de Vaz (2005) e Vaz *et al.* (2006).

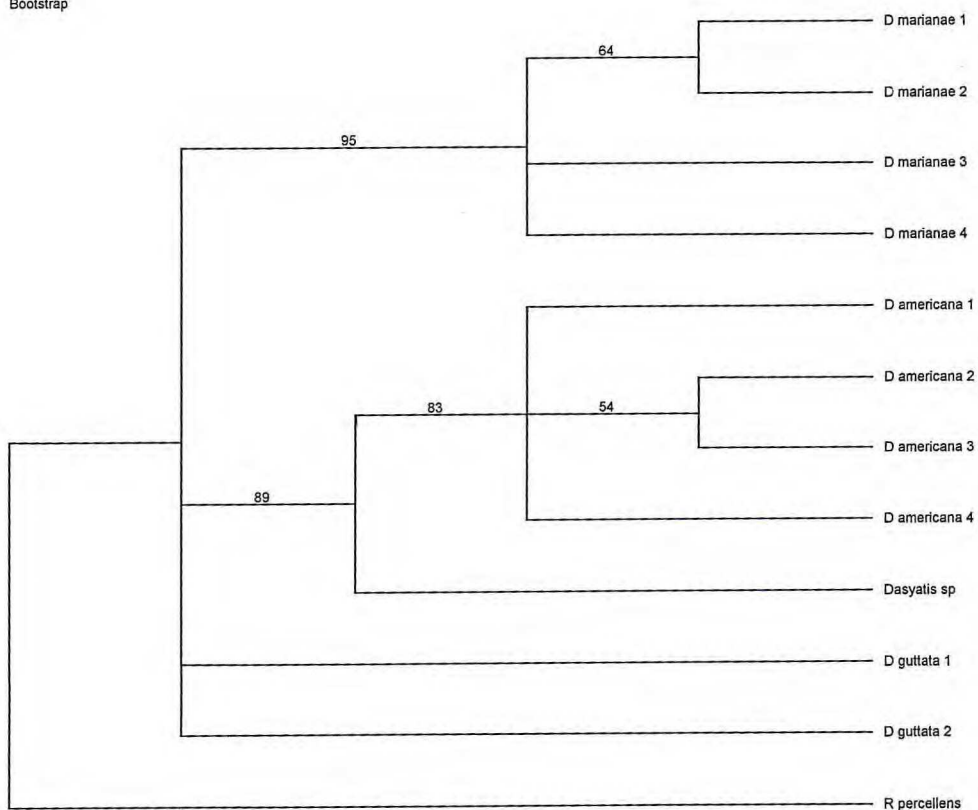


APÊNDICE U – Árvore consenso de 100 pseudoreplicatas de bootstrap a partir de análises de parcimônia máxima para o *primer* OPE 01. Superior: Utilizando-se matriz gerada no presente estudo; Inferior: Utilizando-se matriz de Vaz (2005) e Vaz *et al.*

(2006).

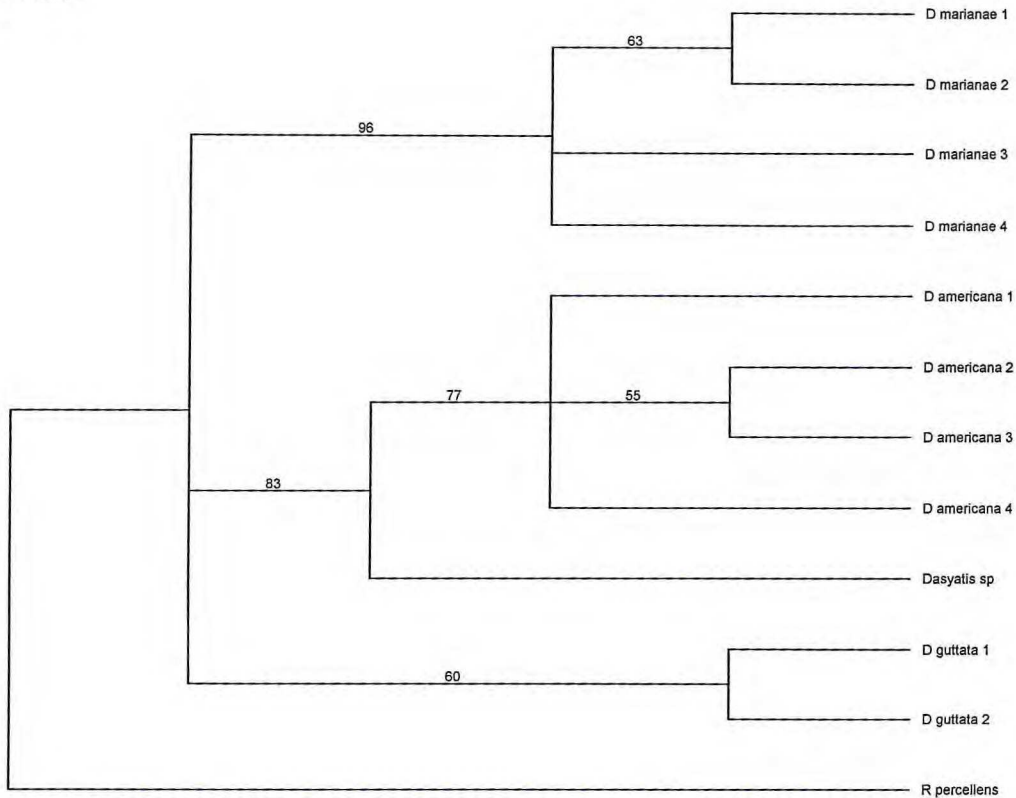


Bootstrap

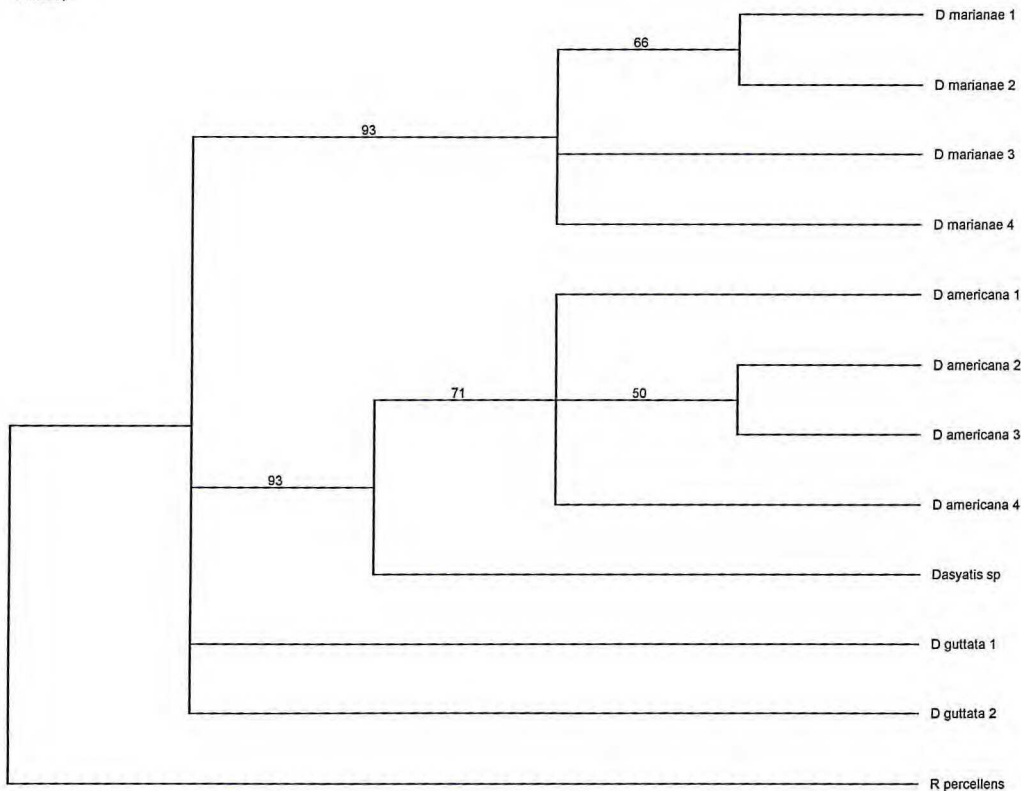


APÊNDICE V – Árvore consenso de 100 pseudoreplicatas de bootstrap a partir de análises de parcimônia máxima para o *primer* OPJ 08. Superior: Utilizando-se matriz gerada no presente estudo; Inferior: Utilizando-se matriz de Vaz (2005) e Vaz *et al.* (2006).

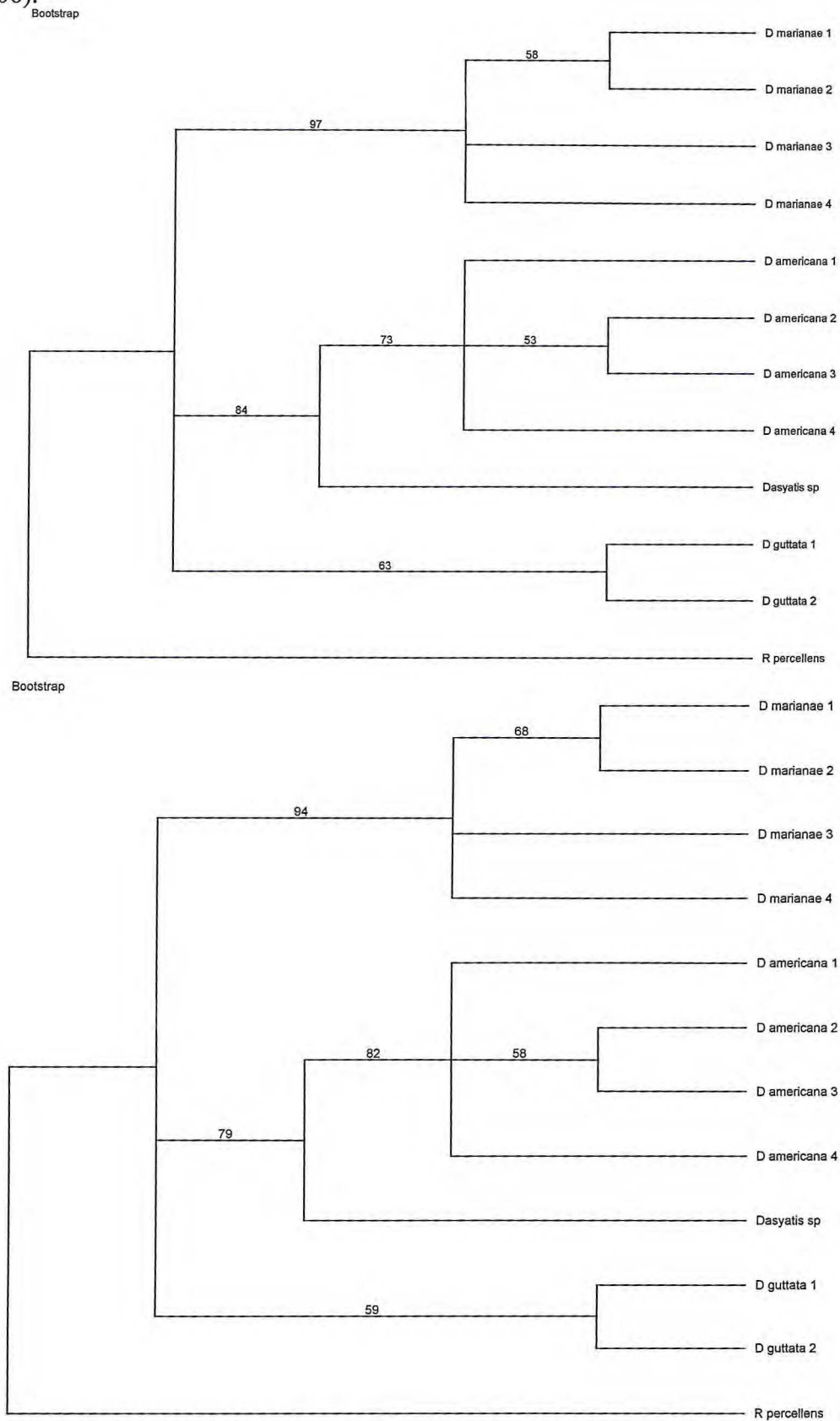
Bootstrap



Bootstrap



APÊNDICE X – Árvore consenso de 100 pseudoreplicatas de bootstrap a partir de análises de parcimônia máxima para o *primer* OPK 11. Superior: Utilizando-se matriz gerada no presente estudo; Inferior: Utilizando-se matriz de Vaz (2005) e Vaz *et al.* (2006).



APÊNDICE Z – Árvore consenso de 100 pseudoreplicatas de bootstrap a partir de análises de parcimônia máxima para o *primer* OPM 01. Superior: Utilizando-se matriz gerada no presente estudo; Inferior: Utilizando-se matriz de Vaz (2005) e Vaz *et al.* (2006).

