

INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA – INPA

Programas de Pós-graduação do INPA

Curso de Genética, Conservação e Biologia Evolutiva

**Análise das relações entre espécies do grupo *Quadrifidum*,
subgênero *Simulium* (*Psaroniocompsa*) (Diptera, Simuliidae)
utilizando o gene Citocromo Oxidase I**

ALESSANDRA CUNEGONDES DE MENDONÇA

Manaus, Amazonas

Janeiro de 2010

ALESSANDRA CUNEGONDES DE MENDONÇA

**Análise das relações entre espécies do grupo *Quadrifidum*,
subgênero *Simulium* (*Psaroniocompsa*) (Diptera, Simuliidae)
utilizando o gene Citocromo Oxidase I**

Orientadora: Neusa Hamada, Dra.

Co-Orientadora: Ana Claudia Kaminski, Dra.

Dissertação apresentada à
coordenação do Programa de Pós-
Graduação do INPA, como parte dos
requisitos para obtenção do título de
Mestre em Ciências Biológicas, área
de concentração em Genética

Manaus, Amazonas

Janeiro de 2010

Ficha catalográfica

C972 Cunegondes, Alessandra
Análise das relações entre espécies do grupo *Quadrifidum*, subgênero *Simulium* (*Psaroniocompsa*) (Diptera, Simuliidae) utilizando o gene Citocromo Oxidase I / Alessandra Cunegondes.--- Manaus : [s.n.], 2010.
59 f. : il. color.

Dissertação(mestrado)-- INPA/UFAM, Manaus, 2010
Orientador : Neusa Hamada
Co-orientador : Ana Claudia Kaminski
Área de concentração : Genética, Conservação e Biologia Evolutiva

1. Simuliidae neotropicais. 2. Gene mitocondrial. 3. Neighbour Joining.
4. Taxonomia. I. Título.

CDD 19. ed. 595.770415

Sinopse: As relações entre as espécies do grupo *Quadrifidum*, subgênero *Simulium* (*Psaroniocompsa*) foram avaliadas com base em análises genéticas das seqüências do gene mitocondrial subunidade I do citocromo oxidase - COI, obtidas.

Palavras chave: Simuliidae Neotropicais, insetos aquáticos, gene mitocondrial, *Neighbour-joining*, Taxonomia.

Dedicatória

Dedico este trabalho aos meus pais Antonio e Sandra, minhas irmãs Adriana e Aliziane, meu sobrinho Eduardo e ao meu grande amor Fernando.

AGRADECIMENTOS

A Dra. Neusa Hamada pela orientação, incentivo e ensinamentos.

A Dra. Ana Claudia Kaminski pela orientação e amizade durante esses anos de trabalhos.

A Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM) pelo apoio financeiro e pela bolsa de mestrado.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico (CNPq) pelo apoio financeiro através do projeto Sistemática de Simuliidae (Diptera: Nematocera) no Brasil, com ênfase na Amazônia.

Ao Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Renováveis (IBAMA/RAN) pela licença concedida (Nº 128530-1).

Ao Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Tropical e Recursos Naturais (PPGBTRN), aos professores do curso de Genética Conservação e Biologia Evolutiva (GCBEV) que contribuíram para a minha formação e amadurecimento profissional.

As secretárias da Genética, Alessandra e Hercília.

Aos queridos amigos da turma de Mestrado da Genética 2007/2 , Elizabeth, Suzana, Rodrigo, Leila, Fabíola e Arlison, como também da turma de 2008 com quem pudemos estar juntos durante algumas disciplinas e festas!!!!.

Ao Jeferson Oliveira da Silva pela ajuda em campo e pela realização de algumas coletas.

A Aline Matos que me ajudou a descascar os “abacaxis”.

A Fernanda Rodrigues Soares pela ajuda e agradável companhia no laboratório.

A minha grande amiga Gabriela Farias pelas dicas, momentos divertidos e cumplicidade.

As meninas do Laboratório Temático de Biologia Molecular (LTBM – INPA), Kiara, Jacqueline, Naiara, Giselle e Alexandra, pelo apoio e dicas fundamentais para a realização deste trabalho.

A Dra. Izeni Pires Farias que gentilmente cedeu o equipamento para que as amostras de DNA pudessem ser seqüenciadas

A Dina e ao Jonson do laboratório de DNA da UFAM pela ajuda com o seqüenciamento das amostras.

A amiga de longa data Inês Cristina que está presente em minha vida desde a graduação.

Ao Dr. Jansen Zuanon pelas dicas e conselhos.

Em especial a minha família, meus avôs, tios e primos que são o meu alicerce e sempre torceram para que eu pudesse realizar meus sonhos e ideais.

Aos meus pais que sempre investiram em meus ideais e apoiaram minhas escolhas.

As minhas irmãs Adriana Cunegondes Isacksson e Aliziane Cunegondes de Assis pela amizade, compreensão e cumplicidade.

Ao meu lindo sobrinho Eduardo Cunegondes Isacksson que acalmava meu coração e me ajudava a esquecer os problemas. Titia te ama muito!

As minhas sogras (mães) Enet e Edna e ao meu sogro John que me acolheram como filha e como tal torcem pelo meu sucesso.

Ao meu grande amor Fernando Mendonça pelo apoio incondicional, pelos ensinamentos, carinho, serenidade, por agüentar meus *stress* e principalmente por fazer minha vida mais feliz!

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho, muito obrigada!

E por fim a Deus por guiar meus passos e por mais está oportunidade...

“...Não importa a dificuldade, não importa o local ou a quem afete, você não tem outro instrumento para agir no mundo senão você mesmo; não tem nada a fazer senão se convencer da verdade que quer ver manifestada.”

Charles Haanel

RESUMO

Os conhecimentos taxonômicos sobre Simuliidae (Diptera) na região Neotropical têm avançado significativamente nos últimos anos. No Brasil, onde três gêneros foram registrados, a maioria das espécies se encontra no gênero *Simulium*, distribuídas em oito subgêneros. Apesar do avanço taxonômico, ferramentas moleculares ainda são pouco utilizadas em estudos sobre esses organismos. O seqüenciamento de fragmentos de genes permite a avaliação direta de polimorfismos de DNA, fornecendo dados para realizar inferências sobre as relações entre espécies. O método de “DNA barcoding”, sistema de identificação baseado na diversidade de uma parte da seqüência da subunidade I citocromo oxidase (COI), representa um método promissor para o diagnóstico da diversidade biológica facilitando a delimitação de espécies crípticas. Dessa forma, o objetivo do presente estudo foi caracterizar geneticamente o grupo de espécies *Quadrifidum*, do subgênero *S. (Psaroniocompsa)* utilizando um fragmento do gene COI e também, verificar se esse gene é útil para identificar espécies pertencentes ao subgênero *S. (Psaroniocompsa)*, incluídas no presente estudo. Os espécimes foram coletados no campo, preservados em álcool 100% e mantidos refrigerados até a análise molecular. O DNA total foi isolado, as seqüências do gene COI foram amplificadas por “Polymerase Chain Reaction” (PCR) e posteriormente purificadas; o seqüenciamento foi feito em seqüenciador MegaBace 1000. As seqüências obtidas foram comparadas quanto à distância entre espécies com o modelo Kimura-2-Parâmetros (K2P). A partir destas distâncias foi gerada uma árvore filogenética. Os resultados do presente estudo não corroboram a monofilia do grupo *Quadrifidum*, uma vez que algumas de suas espécies foram agrupadas a espécies pertencentes a outros grupos de espécies do subgênero *S. (Psaroniocompsa)*. No geral, as espécies analisadas foram posicionadas num mesmo grupo, indicando que essa técnica é útil para identificar espécies desse subgênero.

ABSTRACT

Taxonomic knowledge of Simuliidae (Diptera) in the Neotropical region has advanced. In Brazil, where three genera have been recorded, most of the species are in the genus *Simulium* and are distributed among eight subgenera. In spite of the above-mentioned taxonomic advance, molecular tools have rarely been used in studying these organisms. The sequencing of gene fragments permits direct evaluation of DNA polymorphisms, providing information needed to make relationship inferences among species. The “DNA barcoding” method is a species-identification method based on the diversity of a portion of the sequence of the Cytochrome oxidase I (COI) gene subunit. Sequencing this mitochondrial gene represents a promising method for diagnostic studies of biological diversity, helping to delimit cryptic species. The objective of this study is to characterize genetically the *Quadrifidum* species group, in the *S. (Psaroniocompsa)* subgenus, using “barcoding” of a fragment of the COI gene and also, to verify the utility of this gene for identifying species in this species group and other related species in the same subgenus. The analyzed specimens were collected in the field, preserved in 100% ethanol and maintained refrigerated until the molecular analysis. Total DNA was isolated, the COI gene sequences were amplified by the Polymerase Chain Reaction (PCR) and later purified; the sequencing was done using a MegaBace 1000. The sequences obtained were compared based on the species distance computed using the Kimura-2-Parameters model (K2P), and the phylogenetic tree was created based on these distances. The result of this analysis does not corroborate the monophyly of the *Quadrifidum* species group; species allocated in this group were positioned in other groups in the subgenus *S. (Psaroniocompsa)*. In general, the analyzed specimens were grouped together, indicating the utility of this technique for identifying species in the subgenus *S. (Psaroniocompsa)*.

SUMÁRIO

1. Introdução	01
1.1. A família Simuliidae	01
1.2. O subgênero <i>Simulium</i> (<i>Psaroniocompsa</i>)	03
1.3. O grupo Quadrifidum do subgênero <i>Simulium</i> (<i>Psaroniocompsa</i>)	05
1.4. DNA <i>barcoding</i>	06
2. Objetivos	09
2.1 Geral	09
2.2 Específicos	09
3. Material e métodos	10
3.1 Coleta	10
3.2 Análises Moleculares	13
3.2.1 Extração de DNA	13
3.2.2 Amplificação e Purificação dos fragmentos	13
3.2.3 Seqüenciamento	14
3.3 Análise das seqüências nucleotídicas	15
3.3.1 Edição e alinhamento das seqüências	15
3.3.2 Análises	15
4. Resultados	17
5. Discussão	22
6. Considerações finais	27
7. Referências bibliográficas	29
8. Anexos	39

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Grupos de espécies pertencentes ao subgênero <i>S.</i> (<i>Psaroniocompsa</i>), segundo Adler e Crosskey, 2009	04
Tabela 2: Locais de coleta dos espécimes de Simuliidae (Diptera) analisadas neste estudo.....	12
Tabela 3: <i>Primers</i> considerados padrão para o DNA <i>barcoding</i> de acordo com Hebert <i>et al.</i> , 2003a	14
Tabela 4: Média do percentual de divergência genética (d%) intra-específica calculada pela distância média (modelo Kimura-2-parâmetros) com seus respectivos Desvios-Padrão (D.P.).....	18
Tabela 5: Média percentual da divergência genética (d) interespecífica calculada pela distância média (modelo Kimura-2-parâmetros) com seus respectivos Desvios-Padrão expressos entre colchetes. Em negrito os maiores e menores valores de divergência	20

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estágios de vida de *Simulium daltanhani* Hamada e Adler (Diptera: Simuliidae), indicando o ambiente (aquático ou terrestre) no qual se desenvolvem.....02

Figura 2: Número de transições (Ts) e transversões (Tv) para o gene COI entre indivíduos da mesma espécie, em relação à divergência intra-específica. As linhas contínuas demonstram as tendências dos dados17

Figura 3: Árvore de *neighbour-joining* (modelo Kimura-2-parâmetros), COI, para 15 espécies de *Simulium*, com os respectivos valores de *Bootstrap*. Em vermelho, espécies do grupo *Quadrifidum*.....21

1. INTRODUÇÃO

1.1. A família Simuliidae

No Brasil, os simulídeos (Diptera: Simuliidae) são conhecidos como “borrachudos” ou “piuns”; são de tamanho pequeno, geralmente de coloração escura, com asas largas e com poucas nervuras e aspecto corcunda. Essa família tem importância médica e econômica pelo fato de diversas espécies serem hematófagas, podendo veicular, desta forma, diferentes organismos patogênicos ao ser humano e outros animais (Service, 1997; Crosskey, 1993). Na Amazônia, algumas espécies de simulídeos estão associadas à transmissão de duas filárias: *Onchocerca volvulus* (Leuckart, 1893) e *Mansonella ozzardi* (Manson, 1897), que causam a oncocercose e mansonelose, respectivamente (e.g. Cerqueira, 1959; Crosskey, 1990; Andreazze e Py-Daniel, 1999).

A oncocercose ocorre na África Tropical, ao sul do Saara e no Continente Americano, principalmente em países localizados entre as linhas do Equador e Trópico de Câncer. No Brasil, sua ocorrência foi registrada na Amazônia, em focos isolados e no norte de Goiás. A oncocercose constitui um sério problema de saúde pública por causar cegueira irreversível (Ferreira e Rocha, 1991). Por sua vez, pessoas infectadas por *M. ozzardi* apresentam febre moderada, dores articulares, adenite e dor de cabeça, no entanto, recentemente, tem sido atribuído a esta filária a ocorrência de lesão visual que por sua vez pode acarretar a cegueira (Branco *et al.*, 1998; Garrido e Campos, 2000).

Os insetos pertencentes a essa família são holometábolos, ou seja, possuem desenvolvimento completo, cujo ciclo de vida compreende quatro estágios de desenvolvimento: ovo, larva, pupa e adulto (Coscarón, 1981) (Figura 1). Os adultos podem viver na natureza de três a quatro semanas. As fêmeas ovipositam sobre pedras, galhos e folhas, encontrados em cachoeiras, rios ou córregos. Desta forma, os estágios imaturos estão limitados às águas correntes e se prendem ao substrato por meio de um anel com ganchos, situado na extremidade posterior do abdome (Crosskey, 1990). As larvas são predominantemente filtradoras, alimentando-se de plâncton, perifíton ou pequenos invertebrados (Alencar *et al.*,

2001). Os imaturos fazem parte da dieta de predadores, tais como, peixes, aves e outros insetos (Coscarón, 1991).

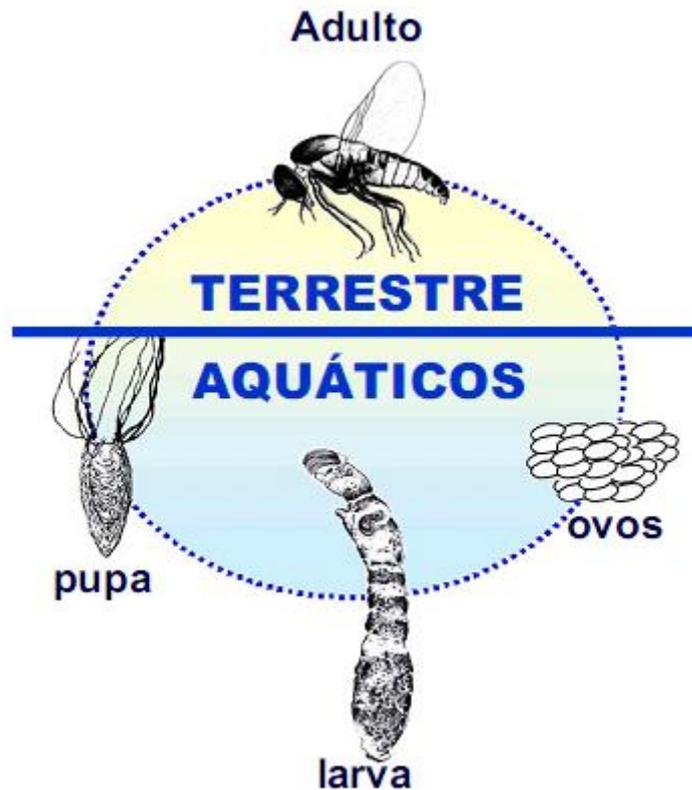


Figura 1: Estágios de vida de *Simulium daltanhani* Hamada e Adler (Diptera: Simuliidae), indicando o ambiente (aquático ou terrestre) no qual se desenvolvem.

A família tem ampla distribuição, estando ausente apenas na Antártica e alguns desertos e ilhas onde não há água corrente (Crosskey, 1990). Compreende atualmente 26 gêneros válidos distribuídos nas subfamílias Parasimuliinae e Simuliinae, e é constituída atualmente por 2.072 espécies, incluindo 12 espécies fósseis (Adler e Crosskey, 2009). No Brasil, foram registrados três gêneros: *Araucnephia* Wygodzinsky e Coscarón (com uma espécie), *Lutzsimulium* d'Andretta e d'Andretta (com quatro espécies) e *Simulium* Latreille (com 86 espécies). Dessas, quarenta e seis espécies foram registradas na Amazônia (Adler e Crosskey, 2009).

De acordo com Adler e Crosskey (2009), os subgêneros de *Simulium* registrados no Brasil são: *Aspathia* (Enderlein, 1935), *Chirostilbia* (Enderlein, 1921), *Hemicnetha* (Enderlein, 1934), *Inaequalium* (Coscarón e Wygodzinsky, 1984), *Notolepria* (Enderlein, 1930), *Psaroniocompsa* (Enderlein, 1934), *Psilopelmia*

(Enderlein, 1934) e *Trichodagmia* (Enderlein, 1934). Entretanto, a classificação dos simulídeos na região Neotropical é controversa, sendo o número de gêneros e subgêneros válidos debatidos (e.g. Py-Daniel e Moreira Sampaio 1995; Py-Daniel e Pessoa, 2005; Shelley *et al.*, 2006; Coscarón e Coscarón Arias, 2007; Adler e Crosskey 2009).

1.2. O subgênero *Simulium* (*Psaroniocompsa*)

Espécies alocadas no subgênero *S.* (*Psaroniocompsa*) têm como característica coloração escura, com tórax bordado lateral e posteriormente de cinza (Coscarón e Wygodzinsky, 1984). Espécies desse subgênero são encontradas na América do Sul e Central, chegando até o México (Adler e Crosskey, 2009).

Coscarón e Wygodzinsky (1984) estudando o subgênero *S.* (*Psaroniocompsa*) dividiu suas espécies em dois grupos: Jujuyense e Auristriatum. Atualmente, de acordo com a lista de espécies de Adler e Crosskey (2009), o subgênero *S.* (*Psaroniocompsa*) está dividido em cinco grupos de espécies (Amazonicum, Auristriatum, Incrustatum, Quadrifidum e Siolii). Esses autores, não posicionam cinco espécies desse subgênero em nenhum desses grupos (Tabela 1).

Coscarón e Wygodzinsky (1984) consideraram que o subgênero mais próximo de *S.* (*Psaroniocompsa*) é o *Simulium* (*Inaequalium*), com quem compartilha diversas semelhanças morfológicas. Crosskey (1988) sugere, inclusive, que o subgênero *S.* (*Inaequalium*), deveria ser sinonimizado com *S.* (*Psaroniocompsa*) devido às semelhanças compartilhadas.

Tabela 1: Grupos de espécies pertencentes ao subgênero *Simulium* (*Psaroniocompsa*), segundo Adler e Crosskey (2009).

Grupo Amazonicum	Grupo Auristriatum	Grupo Incrustatum	Grupo Quadrifidum	Grupo Siolii	Sem grupo definido
<i>S. amazonicum</i>	<i>S. anamariae</i>	<i>S. angrense</i>	<i>S. cauchense</i>	<i>S. damascenoi</i>	<i>S. catarinense</i>
<i>S. argentiscutum</i>	<i>S. auristriatum</i>	<i>S. fuliginis</i>	<i>S. cerradense</i>	<i>S. guaporense</i>	<i>S. delponteianum</i>
<i>S. chaquense</i>	<i>S. brevifurcatum</i>	<i>S. incrustatum</i>	<i>S. daltanhani</i>	<i>S. siolii</i>	<i>S. lutzi</i>
<i>S. cuneatum</i>	<i>S. schmidtummi</i>	<i>S. jujuyense</i>	<i>S. goeldii</i>	<i>S. tergospinosum</i>	<i>S. minusculum</i>
<i>S. ganalesense</i>	<i>S. stellatum</i>	<i>S. limbatum</i>	<i>S. quadrifidum</i>		<i>S. varians</i>
<i>S. oyapockense</i>			<i>S. rassii</i>		
<i>S. pydanieli</i>			<i>S. ulyssesi</i>		
<i>S. quadristrigatum</i>					
<i>S. roraimense</i>					
<i>S. sanguineum</i>					
<i>S. venezuelense</i>					

1.3. O grupo *Quadrifidum* do subgênero *Simulium* (*Psaroniocompsa*)

Py-Daniel (1983) removeu algumas espécies do subgênero *S.* (*Psaroniocompsa*) e criou dois subgêneros, *S.* (*Cerqueirellum*) e *S.* (*Coscaroniellum*). Crosskey e Howard (2004) não reconhecem essas alterações e listam as espécies dos subgêneros *S.* (*Cerqueirellum*) e *S.* (*Coscaroniellum*) nos grupos *Amazonicum* e *Quadrifidum*, respectivamente, do subgênero *S.* (*Psaroniocompsa*), classificação mantida em Adler e Crosskey (2009). Coscarón e Coscarón-Arias (2007), reconhecem os dois subgêneros criados por Py-Daniel (1983) e dividem as espécies do subgênero *S.* (*Coscaroniellum*) em dois grupos: *Quadrifidum* e *Quadrivittatum* este último incluindo apenas as espécies *S. quadrivittatum* Loew. Adler e Crosskey (2009) consideram que *S. quadrivittatum* deve ser incluída no subgênero *S.* (*Psilopelmia*).

Neste trabalho a definição de grupos de espécies pertencentes ao subgênero *S.* (*Psaroniocompsa*) segue Adler e Crosskey (2009), como apresentado na Tabela 1.

O subgênero *S.* (*Coscaroniellum*) e, portanto as espécies do grupo *Quadrifidum* foram caracterizadas por Py-Daniel (1983) com base em três espécies: *S. cauchense* Floch e Abonnenc, *S. quadrifidum* Lutz e *S. rassii* Ramírez-Pérez. Os principais caracteres utilizados por esse autor são listados a seguir: fêmeas com sutura fronto-ocular bem desenvolvida, antenas mais longas do que dos machos, cibário com dentes arredondados na depressão central e ao longo dos braços laterais, garras tarsais com dente sub-basal e lobo anal curto, mais ou menos arredondado; machos com gonóstilo em forma de pé, alongado, com uma espínula larga e achatada e, abdome com pruinose azul-esverdeada nos tergitos II, V-VII e IX; pupas com tricomas frontais alongados, bifurcados, tricomas dorsais bífidos ou trifidos e região torácica e cefálica com tubérculos pontiagudos; larvas com tubérculos ventrais bem desenvolvidos e artículos medianos das antenas mais curtos do que os distais e proximais. As outras espécies incluídas, posteriormente, nesse grupo de espécie – *S. cerradense* Coscarón, Cerqueira, Schumaker e La Salvia, *S. daltanhani*, *S. ulyssesi* (Py-Daniel e Coscarón) e *S. goeldii* Cerqueira e Nunes de Mello – não apresentam todas as características listadas acima.

Cinco espécies das sete incluídas no grupo *Quadrifidum* foram examinadas citotaxonomicamente (Rios-Velásquez *et al.*, 2002; Alvan-Aguilar *et al.*, 2005; Hamada *et al.*, 2008). *Simulium goeldii* e *S. ulyssesi* são cromossomicamente muito similares (Rios-Velásquez *et al.*, 2002) assim como *S. quadrifidum* e *S. cauchense* (Alvan-Aguilar *et al.*, 2005), entretanto a comparação cromossômica entre elas é dificultada pelo grande número de rearranjos e pela dificuldade na leitura dos cromossomos dessas espécies. E, embora os cromossomos de *S. daltanhani* apresentem similaridade com as outras quatro citadas acima (Hamada *et al.*, 2008), também não são facilmente visualizadas as homologias entre elas, como observado em outros grupos de espécies de Simuliidae analisados citologicamente no Brasil (e.g. Hamada e Adler, 1999).

Hamada e Adler (2001) incluíram na chave de identificação de espécies de Simuliidae da Amazônia Central, uma espécie não descrita formalmente, denominada *Simulium* "A". Os adultos e a larva desse morfótipo são similares aos de *S. goeldii* e *S. ulyssesi*, diferenciando-se dessas no estágio de pupa, pelo número de filamentos branquiais ou por diferenças no arranjo da ramificação desses filamentos. Larvas de último estágio de *Simulium* "A" também podem ser identificadas pelos caracteres das brânquias, após a dissecação do histoblasto branquial.

1.4. DNA barcoding

O DNA mitocondrial tem sido amplamente utilizado na sistemática molecular, e o seu uso em estudos filogenéticos de grupos recentes se deve ao fato de seu DNA não possuir mecanismos de reparo de mutações como ocorre no DNA nuclear e de possuir elevada quantidade de réplicas gênicas (Avisé, 1994; Saccone *et al.*, 1999). Adicionalmente, este marcador tem sido particularmente útil na determinação de variabilidade no nível intra-específico.

Hebert *et al.* (2003a, b) indicam que a análise de regiões curtas e padronizadas de um gene ("DNA barcoding") pode distinguir espécies caracterizadas morfologicamente. Em particular, eles sugerem a utilização de um simples fragmento de mtDNA na extremidade 5' do gene Citocromo Oxidase – subunidade I como um código de barras para identificar e delimitar espécies. Escolhendo um fragmento padrão de DNA, os esforços de múltiplos grupos de pesquisa podem ser coordenados, resultando na construção de uma biblioteca de seqüências de DNA

mais abrangente e, que seria possível ser trabalhado independentemente (Caterino *et al.*, 2000).

O gene COI é facilmente amplificado de diferentes estágios da vida com os *primers* padrões do barcoding (Ekrem *et al.*, 2007). Este fragmento está sendo utilizado inclusive para determinar variações entre espécies próximas ou até mesmo crípticas (Hebert *et al.*, 2004a). Em vários grupos o sucesso em identificação de espécies excede 95% e os poucos casos de resolução comprometida envolvem a habilidade de distinguir um pequeno grupo de espécies estreitamente relacionadas (Hebert *et al.* 2004a, b), chegando a 100% em algumas ordens de insetos estudadas (Hebert *et al.* 2003a).

Apesar de alguns críticos indicarem que o método de “DNA barcoding” é fundamentalmente imperfeito, diversos estudos têm indicado a efetividade do “DNA barcoding” em grupos de espécies de ambientes geográficos variados, e de numerosos grupos taxonômicos com diferentes histórias de vida e atributos evolucionários (Hebert e Gregory, 2005).

Os benefícios científicos do “DNA barcoding” incluem: (1) Identificação de espécies, em qualquer estágio de vida ou fragmento (Savolainen *et al.*, 2005), possibilitando a associação de diferentes estágios de vida das mesmas espécies (Olson, 1991; Bartlett e Davidson 1992; Sperling *et al.*, 1994; Hebert *et al.*, 2003a,b; Blaxter 2004; Stoeckle 2003), uma vez que o conhecimento completo dos estágios da vida de um organismo é essencial para um bom entendimento de sua ecologia, taxonomia, filogenia e evolução (Blaxter, 2004; Stoeckle, 2003); (2) Facilitar a descoberta e delimitação de espécies crípticas baseado em análises de seqüências de genes em grupo (Sperling e Hickey, 1994; Goetze, 2003; Hebert *et al.*, 2003a,b; Scheffer *et al.*, 2004; Blair *et al.*, 2005; Hendrixson e Bond, 2005; Savolainen *et al.*, 2005; Roe e Sperling, 2007); (3) Disponibilizar ferramentas de identificação taxonômica padronizadas para a maioria da comunidade, auxiliando em diversas áreas, e.g. biomedicina (parasitas e vetores), agricultura (pestes), arquivo do inventário da biodiversidade (Savolainen *et al.*, 2005).

Devido aos resultados obtidos com “DNA barcoding”, um consórcio internacional entre museus de história natural, herbários e outros centros de pesquisa está sendo promovido com o ambicioso projeto de desenvolver um rápido e barato processo de identificação de todas as espécies da Terra, denominado ‘Barcode of Life Initiative’ (Savolainen *et al.*, 2005). Como consequência desses

trabalhos, registros do barcoding estão disponíveis para mais de 13000 espécies de animais (Barcode of Life Data Systems, 2009).

Entretanto, a implantação de um sistema de identificação baseado no DNA requer três condições: (a) é necessário que seja possível recuperar a mesma região do DNA de todas as espécies; (b) a informação da seqüência deverá ser facilmente analisada, e (c) o conteúdo da informação da seqüência alvo deve ser suficiente para identificar até o nível de espécie (Cywinska *et al.*, 2006).

Metodologias como a taxonomia com DNA (Tautz *et al.*, 2003; Monaghan *et al.*, 2006) e “DNA barcoding” (Hebert *et al.*, 2003a, b) têm como critério primário para delimitação e detecção de espécies a divergência de nucleotídeos. Quando a divergência molecular para delimitar espécies é utilizada, é importante que a diversidade de nucleotídeos intra-específica não seja maior que a divergência interespecífica (Meyer e Paulay, 2005). Para o cálculo da divergência de nucleotídeos é usualmente utilizado o modelo Kimura 2 Parâmetros (K2P) e subseqüentemente análise de *neighbour-joining* para analisar as relações entre taxa, devido à robustez de tais análises (*e.g.* Nei e Kumar, 2000; Hebert *et al.*, 2004a; Cywinska *et al.*, 2006; Whitworth *et al.*, 2007).

Mesmo que o uso de caracteres moleculares para acelerar a identificação de espécies desconhecidas tenha se provado útil e efetivo (Sperling e Hickey, 1994; Wells *et al.*, 2001; Hebert *et al.*, 2003a,b), a delimitação de espécies idealmente requer dados de várias fontes diferentes, como morfologia, comportamento, e múltiplos marcadores moleculares (Funk e Omland, 2003; Dayrat, 2005; Roe e Sperling, 2007).

A partir da década passada, dados moleculares de seqüências, em conjunto com caracteres morfológicos e ecológicos, tornaram-se componentes integrais da “caixa de ferramentas” da taxonomia e sistemática (Armstrong e Ball, 2005; Roe e Sperling, 2007). Com o crescimento de estudos dessa natureza, particularmente com o número crescente de projetos de “DNA barcoding”, poderá ocorrer um impacto significativo na sistemática, taxonomia, conservação e identificação de espécies (Dayrat, 2005).

Os simulídeos possuem uma taxonomia difícil e uma correta identificação requer análises de uma larga série de larvas, pupas e adultos, incluindo microdissecação da genitália e, algumas vezes, a análise do cromossomo politênico. Este, por sua vez, tem desempenhado papel importante na taxonomia e sistemática de Simuliidae, onde rearranjos cromossômicos, cromossomos sexuais e polimorfismos autossômicos são utilizados para o diagnóstico de espécies crípticas (Adler *et al.*, 2004).

Os conhecimentos taxonômicos sobre simulídeos da região Neotropical têm avançado significativamente nos últimos anos, com o resultado da descoberta de focos da oncocercose na América do Sul (Brasil, Colômbia, Equador e Venezuela) (Shelley, 1988). Apesar disso, estudos moleculares envolvendo filogenia de Simuliidae, especialmente no Brasil, são inexistentes. Xiong e Koche (1991) foram os primeiros a estudar as seqüências de DNA mitocondrial em Simuliidae.

Contrastando com o grande número de estudos morfológicos (*e.g.* Coscarón, 1981; Coscarón e Wygodzinsky, 1984; Hamada e Adler, 1998; Hamada, 2000; Py-Daniel e Pessoa, 2005; Pessoa *et al.*, 2008) e citotaxonômicos (*e.g.* Hamada e Adler, 1999; Kuvangkadilok *et al.*, 2003; Krueger *et al.*, 2000; Mustapha *et al.*, 2004; Spironello e Hunter, 2005) os estudos moleculares sobre as relações de Simuliidae ainda são escassos (*e.g.* Moulton, 2000; Pruess *et al.*, 2000; Adler *et al.*, 2000; Krueger *et al.*, 2000; Joy e Conn, 2001; Post *et al.*, 2003; Mank *et al.*, 2004; Duncan *et al.*, 2004; Pramual *et al.*, 2005; Krueger e Hennings, 2006).

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

Avaliar as relações entre as espécies do grupo *Quadrifidum*, do subgênero *Simulium* (*Psaroniocompsa*) pelo método de “DNA barcoding”.

2.2. Especificos

2.2.1. Caracterizar o grupo *Quadrifidum*, *Simulium* (*Psaroniocompsa*) pelo método de DNA *barcoding*.

2.2.2. Verificar se esse gene é útil para identificar espécies pertencentes ao subgênero *S.* (*Psaronicomopsa*) incluídas nesse estudo.

2.2.3. Testar se os espécimes previamente identificados como *Simulium* "A" (Hamada e Adler, 2001) correspondem a uma espécie distinta de *S. ulyssesi* e *S. goeldii*, além de verificar se estão inseridos no grupo *Quadrifidum* do subgênero *S.* (*Psaroniocompsa*).

3. MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi realizado com seis espécies que compõem o grupo *Quadrifidum*, do subgênero *S.* (*Psaroniocompsa*), *sensu* Adler e Crosskey (2009): *Simulium quadrifidum*, *S. cauchense*, *S. goeldii*, *S. ulyssesi*, *S. cerradense* e *S. daltanhani*. Um morfótipo (*Simulium* “A”), com características morfológicas similares às espécies *S. goeldii* e *S. ulyssesi* (Hamada e Adler, 2001), foi incluído na análise. A espécie *Simulium rassi* Ramírez-Pérez, também pertencente a esse grupo de espécie (Adler e Crosskey, 2009) não foi incluída na análise por falta de material, uma vez que ocorre apenas na Venezuela.

Como grupo externo, foi utilizado a espécie *Simulium (Inaequalium) inaequale* (Paterson e Shannon, 1927). Espécies pertencentes a outros grupos do subgênero *S. (Psaroniocompsa)* foram incluídas na análise, com o intuito de avaliar suas relações com o grupo *Quadrifidum*: *S. oyapockense* Floch e Abonnenc, 1946 (grupo *Amazonicum*), *S. minusculum* Lutz, 1910 (sem grupo definido); *S. auristriatum* Lutz, 1910 (grupo *Auristriatum*); *S. brevifurcatum* Lutz, 1910 (grupo *Auristriatum*); *S. tergospinosum* Hamada, 2000 (grupo *Siolii*) e *S. guaporense* Py-Daniel, 1989 (grupo *Siolii*). Adicionalmente, foi incluída uma população de *S. oyapockense*, aqui denominada de *S. oyapockense* "S.G.", coletada no município de São Gabriel, no Estado do Amazonas, que apresenta características morfológicas (forma do casulo e espessura dos filamentos branquiais) diferente de *S. oyapockense sensu stricto*.

3.1 Coleta:

Larvas e/ou pupas analisadas nesse trabalho foram coletadas nos riachos (Tabela 2), diretamente do substrato (folhas decíduas, raízes, pedras e vegetação aquática), com auxílio de pinças, conservadas em álcool 100% e mantidas em caixas térmicas com gelo. No laboratório de Citotaxonomia e Insetos Aquáticos, na Coordenação de Pesquisas em Entomologia, do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA) os exemplares coletados foram armazenados a 4°C. Os espécimes foram identificados usando a chave de identificação de Hamada e Adler (2001), além de outros trabalhos taxonômicos (e.g. Hamada *et al.*, 2006; Hamada, 2000; Coscarón e Wygodzinsky, 1984).

Material testemunho do trabalho, cápsula cefálica e histoblasto branquial de larvas e casulo e filamentos branquiais de pupas, foram preservados em álcool 80% e depositados na Coleção de Invertebrados do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA).

Tabela 2: Locais de coleta das espécies de Simuliidae (Diptera) analisadas neste estudo.

Espécie	Coordenadas Geográficas	Localidade
<i>S. cerradense</i> 1, 2, 3, 4, 5	12°29'S, 45°53"W	Bahia, Luís Eduardo Magalhães, estrada para Roda Velha
<i>S. cauchense</i> 1, 2	02°03'S, 60°06"W	Amazonas, Presidente Figueiredo, Hotel Marupiara, rio Urubu
<i>S. quadrifidum</i> 1, 2, 3	07°02'S, 60°03"W	Amazonas, Apuí, Cachoeira Paredão, rio Juma
<i>S. quadrifidum</i> 4, 5	00°05'S, 67°07"W	Amazonas, São Gabriel da Cachoeira, Comunidade São Sebastião, igarapé Acalunum,.
<i>S. goeldii</i> 1, 2, 3	02°45'S, 59°51"W	Amazonas, CIGS-BIS2, AM 010, Km 51, tributário do igarapé Candiru
<i>S. ulyssesi</i> 1, 2	02°01'S, 59°49"W	Amazonas, Presidente Figueiredo, Estrada para Balbina, Km 24, igarapé do sr. José
<i>S. ulyssesi</i> 3, 4	02°45'S, 59°51"W	Amazonas, CIGS-BIS2, AM 010, Km 51, tributário do igarapé Candiru
<i>S. daltanhani</i> 1, 2, 3, 4, 5	02°45'S, 59°51"W	Amazonas, CIGS-BIS2, AM 010, Km 51, igarapé do Km 8
<i>Simulium</i> A 1, 2, 3, 4, 5	-	Amazonas, Maués, tributário do rio Abacaxis
<i>S. oyapockense</i> 1, 2, 3, 4, 5	01°55'N, 61°00"W	Roraima, Caracará, cachoeira Bem Querer, rio Branco
<i>S. oyapockense</i> 'SG' 1, 2, 3, 4	00°10'S, 66°52"W	Amazonas, São Gabriel da Cachoeira, rio Negro
<i>S. auristriatum</i> 1, 2, 3, 4	20°06'S, 43°28"W	Minas Gerais, Catas Altas, Parque Natural do Caraça
<i>S. brevifurcatum</i> 1, 2, 3, 4	27°33'S, 52°32"W	Rio Grande do Sul, São Valentim
<i>S. guaporense</i> 1, 2, 3, 4	12°53'S, 60°11"W	Rondônia, Vilhena, igarapé na estrada para Usina do rio Vermelho
<i>S. minusculum</i> 1, 2, 3, 4, 5	06°51'S, 47°28"W	Maranhão, Carolina-Estreito, BR 010, rio Farinha
<i>S. tergo-spinosum</i> 1, 2, 3, 4	07°12'S, 59°55"W	Amazonas, Apuí, Rodovia Transamazônica, rio Juma
<i>S. inaequale</i> 1	07°52'S, 38°07"W	Pernambuco, Triunfo, sítio Brejinho da Barragem, Cachoeira dos Pingas,

Nota: Números após o nome da espécie identificam a quantidade de espécimes analisados.

3.2 Análises Moleculares

3.2.1 Extração de DNA

Para as extrações de DNA foram utilizadas larvas e pupas; as larvas selecionadas para as análises moleculares tiveram o trato digestivo removido para reduzir a probabilidade de contaminação.

Os instrumentos utilizados para a dissecação foram esterilizados (flambados) após a remoção do material a ser utilizado na extração de DNA para cada espécime, para prevenir a transferência de DNA para outra amostra.

Para o isolamento do DNA total foi utilizado o kit DNeasy Blood & Tissue (Qiagen), sendo que o método consiste em incubar em banho-maria a 56°C uma mistura de tampão, proteinase K e tecido da espécie de estudo por aproximadamente 1h30min ou até a completa lise das células. Após a incubação, foi adicionado 200 µL de solução tampão, seguido da adição de etanol (96-100%). A mistura foi transferida para uma coluna DNeasy Mini spin colocada em um tubo coletor de 2 mL para a separação do DNA; à coluna, foi acrescentado tampão AW1 e tampão AW2 para lavagem final. Todos os passos foram seguidos de centrifugação. Para eluição do DNA, foi acrescentado 200 µl de tampão AE diretamente sobre a membrana. O DNA isolado foi estocado em freezer -20°C.

3.2.2 Amplificação e Purificação dos fragmentos:

As seqüências do gene COI *barcoding* das espécies estudadas foram amplificadas por “*Polymerase Chain Reaction*” (PCR). As amplificações foram feitas em um volume total de 25 µL (~100ng de DNA genômico), contendo tampão de reação 2X PreMix (concentração final de 10mM Tris-HCl; 1,5mM MgCl₂; 50mM KCl; pH 8,3); 0,5 unidades de *Taq DNA polimerase*; 0,2 mM de cada dNTP – dATP, dCTP, dTTP e dGTP; 0,2 µM de cada oligonucleotídeo iniciador – *primer* (Tabela 3); 2,0 mM de Cloreto de Magnésio (MgCl₂) e água mili-Q para completar o volume. As reações foram processadas em termociclador (Ependorff – Mastercycler Gradient), nas seguintes condições:

- I. Desnaturação a 94° C durante 1 minuto;
- II. Anelamento a 45° C durante 1 minuto e 30 segundos;
- III. Extensão a 72° C durante 1 minuto e 30 segundos;

No final de 36 ciclos, ocorreu uma extensão final a 72° C durante 5 minutos.

Após a amplificação, os produtos de PCR foram verificados através de eletroforese em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídio (0,5 µg/mL). Em seguida, as bandas de DNA foram visualizadas e fotografadas em um transiluminador de luz ultravioleta (UV) (BioDoc it Imaging System da UVP).

A purificação dos fragmentos resultantes da amplificação foi realizada utilizando kit “Wizard SV Gel and PCR Clean-up System” (Promega), seguindo as recomendações do fabricante e estocado em freezer -20° C. Os produtos purificados foram quantificados por comparação com o marcador *Low Mass DNA Ladder* (Invitrogen) através de eletroforese em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídio e visualizado e fotografado em um transiluminador de luz ultravioleta (UV) (BioDoc it Imaging System da UVP).

Tabela 3: *Primers* considerados padrão para o DNA *barcoding* de acordo com Hebert *et al.* (2003a).

Código	Primers
LCO 1490	5' GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG 3'
HCO 2198	5' TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA 3'

3.2.3 Seqüenciamento

As amostras purificadas foram submetidas à reação de seqüenciamento, que foi conduzida de acordo com o método de Sanger (Sanger *et al.*, 1977), utilizando-se o kit de seqüenciamento *DYEnamic ET Terminator Cycle Sequencing* (GE HealthCare). As reações de seqüenciamento foram feitas em placas de 96 poços,

utilizando 100ng do produto de PCR purificado; 5pmol de *primer*, 2µL de premix (kit) e água mili-Q para completar o volume de 10µL. Essas reações foram processadas em 30 ciclos, sendo: desnaturação inicial a 95° C por 25 segundos, desnaturação 95° C por 15 segundos; anelamento a 50° C por 20 segundos e extensão a 60° C por 1 minuto e 20 segundos. Os *primers* utilizados no seqüenciamento foram os mesmos utilizados para o PCR. Depois de seqüenciados, os fragmentos foram submetidos a um tratamento de precipitação para a eliminação do produto não incorporado durante a reação de seqüenciamento. Em seguida, foi realizada a leitura automática do fragmento no seqüenciador automático de DNA MegaBACE 1000 (GE HealthCare) da Universidade Federal do Amazonas (UFAM), nas condições de injeção e corrida recomendadas pelo fabricante.

As seqüências foram geradas na forma de cromatograma, por um computador conectado ao aparelho seqüenciador. Estes cromatogramas foram interpretados pelo software Sequencing Analysis 3.4.1 e convertido em seqüências de DNA.

3.3 Análise das seqüências nucleotídicas

3.3.1 Edição e alinhamento das seqüências

Os dados resultantes do seqüenciamento foram salvos na extensão *abd*. As seqüências foram editadas uma a uma com auxílio do programa Chromas Pro 134, sendo adicionados “N” nos sítios com ambigüidades e “-“ nos sítios com inserções/deleções (*indel*). As seqüências depois de editadas foram alinhadas utilizando o programa de alinhamento múltiplo *Clustal W* (Thompson *et al.*, 1994), incluído no software *BioEdit* v. 5.0.6 (Hall, 1999), onde foi selecionada a região a ser utilizada nas análises. As seqüências editadas e alinhadas apresentaram tamanho final de 540 pb e 187 sítios polimórficos.

Todas as seqüências obtidas foram comparadas com as seqüências depositadas no GenBank. Dessa maneira, foi possível confirmar que as seqüências pertencem ao organismo estudado e também que a região amplificada do genoma é a que está sob estudo (NCBI, 2009).

3.3.2 Análises

A partir das seqüências, foi calculada a divergência de nucleotídeos interespecífica e intra-específicas usando o modelo de Kimura-2-Parâmetros (K2P) (Kimura, 1980). O modelo de Kimura-2-Parâmetros (K2P) considera a diferença relativa entre as seqüências comparadas par a par, levando em consideração que as taxas de transição e transversão são diferentes, mas assumem freqüências de bases iguais (Schneider, 2007).

A divergência intra-específica ou interespecífica é calculada de acordo com o número de transições e transversões e quanto maior o número de substituições, maior será a divergência. De acordo com Li (1997) o número de transições tende a ser maior que o número de transversões, uma vez que é mais fácil haver a troca de uma purina por outra purina ou de uma pirimidina por outra pirimidina do que a troca de uma purina por uma pirimida ou vice-versa.

A representação da distância genética entre as espécies foi representada por análise de *neighbour-joining* (Saitou e Nei, 1987). O método de *neighbour-joining* é uma versão simplificada do método da evolução mínima, onde a construção da árvore começa em forma de estrela e posteriormente os táxons mais estreitamente relacionados, ou seja, vizinhos, passam a ser considerados como um único táxon (Nei e Kumar, 2000). Tal método de análise tem sido eficiente para estudos das relações entre espécies utilizando o gene COI “barcoding” (e.g. Nei e Kumar, 2000; Barrett e Hebert, 2005; Rivera e Currie, 2009).

Para a medida de suporte estatístico foi utilizado o *bootstrap*, que calcula o grau de confiabilidade dos ramos do cladograma (Felsenstein, 1985). Esse teste é iniciado com uma matriz de dados, onde sítios são escolhidos e substituídos ao acaso, originando pseudo-réplicas do banco de dados com o mesmo número de sítios, mas com algumas variações em seus dados (Schneider, 2007). Para os testes de *bootstrap* foram analisadas 1000 matrizes com pseudo-réplicas dos sítios com reposição, resultando em uma árvore de consenso do resultado de todas as análises. Valores percentuais para cada nó interno representa o número de vezes que o clado foi recuperado nas 1000 análises.

Para se determinar o limiar de significância para os cladogramas obtidos a partir do teste de *bootstrap* foram considerados valores acima de 95% como significativos, valores entre 70-94% como moderados e valores entre 51-69% como fracos (e.g. Hillis e Bull, 1993; Li, 1997; Schneider, 2007).

O enraizamento foi feito pelo método de comparação com grupos externos de Nixon e Carpenter (1993).

As análises de evolução molecular foram realizadas no programa MEGA, versão 4.1.

4. RESULTADOS

As seqüências de Citocromo Oxidase I (COI) para as espécies amostradas demonstraram uma maior freqüência de nucleotídeos A+T (média = 67,48%, DP = 1,2%) em relação à freqüência de C+G (média = 32,54%, DP = 1,2%). Crease (1999) demonstra que tal proporção é típica do genoma mitocondrial de artrópodes.

A média individual de nucleotídeos foi de A = 28,06% (DP = 1,5%), T = 39,42% (DP = 1,1%), C = 17,23% (DP = 0,9%) e G = 15,30% (DP = 0,6%). Relacionando o número total de transições e transversões em nível co-específico com a divergência intra-específica das seqüências de COI (Figura 2), pode-se evidenciar que ocorre um acréscimo da divergência conforme se eleva o número de transversões e transições. Destaca-se que, para as espécies estudadas, a ocorrência de transições é freqüentemente maior do que as de transversões (ver Anexo 1).

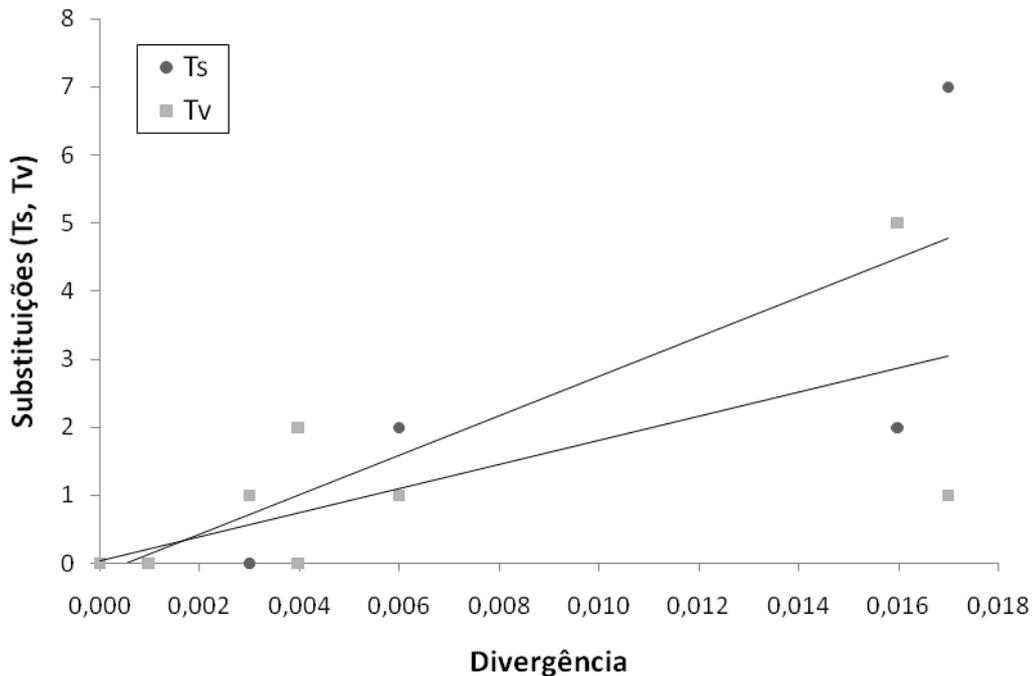


Figura 2: Número de transições (Ts) e transversões (Tv) para o gene COI entre indivíduos da mesma espécie, em relação à divergência intra-específica. As linhas contínuas demonstram as tendências dos dados.

Considerando as substituições de nucleotídeos tanto entre indivíduos da mesma espécie quanto entre indivíduos de espécies diferentes, obtêm-se o número total de 25 transversões e de 28 transições (Anexo 1).

A média percentual de divergência das seqüências de nucleotídeos entre as espécies estudadas foi de 13,87% (DP = 2,5%), enquanto a média percentual de divergência entre indivíduos da mesma espécie foi de 0,42% (DP = 0,55%). As divergências intra e interespecíficas estão demonstradas respectivamente nas Tabelas 4 e 5.

Tabela 4: Média do percentual de divergência genética (d%) intra-específica calculada pela distância média (modelo Kimura-2-parâmetros) com seus respectivos Desvios-Padrão (D.P.). N/c = divergência não calculada por se tratar somente de um indivíduo.

Espécie	d%	D.P.
<i>S. cerradense</i>	0,000	0,000
<i>S. cauchense</i>	0,016	0,006
<i>S. quadrifidum</i>	0,017	0,005
<i>S. goeldii</i>	0,000	0,000
<i>S. ulyssesi</i>	0,006	0,003
<i>S. daltanhani</i>	0,003	0,001
<i>Simulium A</i>	0,004	0,002
<i>S. oyapockense</i>	0,004	0,002
<i>S. oyapockense S.G.</i>	0,001	0,001
<i>S. minusculum</i>	0,000	0,000
<i>S. auristriatum</i>	0,000	0,000
<i>S. tergospinosum</i>	0,003	0,002
<i>S. guaporense</i>	0,004	0,002
<i>S. brevifurcatum</i>	0,001	0,001
<i>S. inaequale</i>	n/c	n/c

Simulium quadrifidum destaca-se como a espécie de maior divergência intra-específica entre as espécies estudadas, enquanto que *S. cerradense*, *S. goeldii*, *S. minusculum* e *S. auristriatum* não apresentaram diferenças entre as seqüências dos indivíduos analisados.

As espécies que apresentaram maior divergência entre si foram *S. guaporense* versus *S. inaequale* (18,40%, DP = 2,00%). *S. guaporense* também apresentou alta divergência com *S. auristriatum* (18,30%, DP = 2,00%). *Simulium ulyssesi* e *S. goeldii* destacaram-se por estarem estreitamente relacionadas (2,00%, DP = 0,60%), bem como os morfótipos *S. oyapockense* e *S. oyapockense* “S.G.” (3,20%, DP = 0,80%).

A partir das divergências das seqüências de nucleotídeos de COI foi gerada uma árvore de *neighbour-joining* que expressa as relações entre as espécies estudadas (Figura 3). A árvore foi enraizada utilizando *S. (Inaequalium) inaequale* uma vez que tal espécie é considerada a mais distante em relação às demais

espécies do subgênero *S.* (*Psaroniocompsa*) analisadas (Adler e Crosskey, 2009). Foi considerado também para o enraizamento o fato de *S. inaequale* apresentar altos valores de divergência com todas as espécies (Tabela 5).

Na análise de *neighbour-joining*, indivíduos da mesma espécie agruparam-se quando as amostras foram obtidas em áreas biogeograficamente distintas, formando dois grupos.

Os grupos de espécies *Auristriatum* (*S. auristriatum* e *S. brevifrucatum*) e *Amazonicum* (*S. oyapockense* e *S. oyapockense* 'S.G') apresentaram-se bem definidos (Bootstrap de ambos = 100), enquanto que os grupos *Siolii* e *Quadrifidum* não tiveram a mesma tendência.

As espécies analisadas do grupo *Siolii* foram distribuídas em ramos distintos na árvore. *Simulium guaporense* ficou agrupada com *S. cauchense*, enquanto que *S. tergospinosum* foi posicionada mais próxima das espécies do grupo *Amazonicum*.

O clado formado por *S. ulyssesi* e *S. goeldii* mostra-se fortemente apoiado (Bootstrap = 100), e como grupo-irmão de *Simulium* "A" (Bootstrap = 46). Esse resultado é evidenciado pela divergência entre *Simulium* "A" e *S. goeldii* (10,70%, DP = 1,60%), e *Simulium* "A" e *S. ulyssesi* (9,70%, DP = 1,50%).

Simulium minusculum (sem grupo de espécies definido), mostrou-se relacionado a *S. cerradense* (11,30%, DP = 1,70%), porém o valor de bootstrap (57) do agrupamento foi baixo.

Os espécimes de *S. quadrifidum* formaram um clado bem definido (Bootstrap = 100), porém fracamente relacionado com os demais clados da árvore (Bootstrap = 25). O mesmo fato ocorreu com *S. daltanhani* (Bootstrap entre indivíduos de *S. daltanhani* = 100; Bootstrap entre a espécie e as demais relacionadas = 22).

Tabela 5: Média percentual da divergência genética (d) interespecífica calculada pela distância média (modelo Kimura-2-parâmetros) com seus respectivos desvios-padrão expressos entre colchetes. Em negrito os maiores e menores valores de divergência.

	S. cerradense	S. cauchense	S. quadrifidum	S. goeldii	S. ulyssesi	S. daltanhani	Simulium sp. A	S. oyapockense	S. oyapockense S.G.	S. minusculum	S. auristriatum	S. tergospinosum	S. guaporense	S. brevifurcatum	S. inaequale
S. cerradense	-	[0,021]	[0,021]	[0,019]	[0,018]	[0,020]	[0,018]	[0,019]	[0,019]	[0,017]	[0,020]	[0,019]	[0,022]	[0,018]	[0,020]
S. cauchense	0,156	-	[0,017]	[0,018]	[0,019]	[0,019]	[0,018]	[0,017]	[0,017]	[0,019]	[0,019]	[0,019]	[0,018]	[0,017]	[0,021]
S. quadrifidum	0,162	0,123	-	[0,020]	[0,021]	[0,021]	[0,019]	[0,019]	[0,020]	[0,019]	[0,021]	[0,019]	[0,020]	[0,019]	[0,022]
S. goeldii	0,136	0,139	0,147	-	[0,006]	[0,018]	[0,016]	[0,020]	[0,020]	[0,019]	[0,019]	[0,020]	[0,021]	[0,019]	[0,021]
S. ulyssesi	0,128	0,137	0,152	0,02	-	[0,018]	[0,015]	[0,020]	[0,019]	[0,018]	[0,018]	[0,020]	[0,021]	[0,018]	[0,021]
S. daltanhani	0,149	0,136	0,166	0,131	0,124	-	[0,020]	[0,018]	[0,019]	[0,021]	[0,021]	[0,020]	[0,021]	[0,019]	[0,021]
Simulium A	0,123	0,129	0,14	0,107	0,097	0,137	-	[0,018]	[0,018]	[0,018]	[0,017]	[0,019]	[0,020]	[0,017]	[0,021]
S. oyapockense	0,134	0,117	0,133	0,15	0,142	0,124	0,113	-	[0,008]	[0,018]	[0,019]	[0,015]	[0,018]	[0,017]	[0,022]
S. oyapockense S.G.	0,138	0,126	0,146	0,146	0,138	0,128	0,123	0,032	-	[0,019]	[0,019]	[0,016]	[0,018]	[0,018]	[0,022]
S. minusculum	0,113	0,136	0,135	0,126	0,118	0,16	0,132	0,13	0,144	-	[0,020]	[0,019]	[0,021]	[0,018]	[0,022]
S. auristriatum	0,140	0,143	0,155	0,137	0,131	0,159	0,123	0,137	0,138	0,147	-	[0,021]	[0,022]	[0,011]	[0,021]
S. tergospinosum	0,141	0,138	0,14	0,152	0,156	0,145	0,135	0,099	0,105	0,139	0,158	-	[0,020]	[0,019]	[0,021]
S. guaporense	0,183	0,131	0,171	0,171	0,169	0,168	0,155	0,122	0,125	0,166	0,183	0,152	-	[0,019]	[0,024]
S. brevifurcatum	0,124	0,126	0,15	0,135	0,129	0,142	0,104	0,115	0,127	0,132	0,055	0,142	0,157	-	[0,021]
S. inaequale	0,152	0,163	0,174	0,161	0,164	0,165	0,159	0,164	0,167	0,169	0,161	0,154	0,184	0,152	-

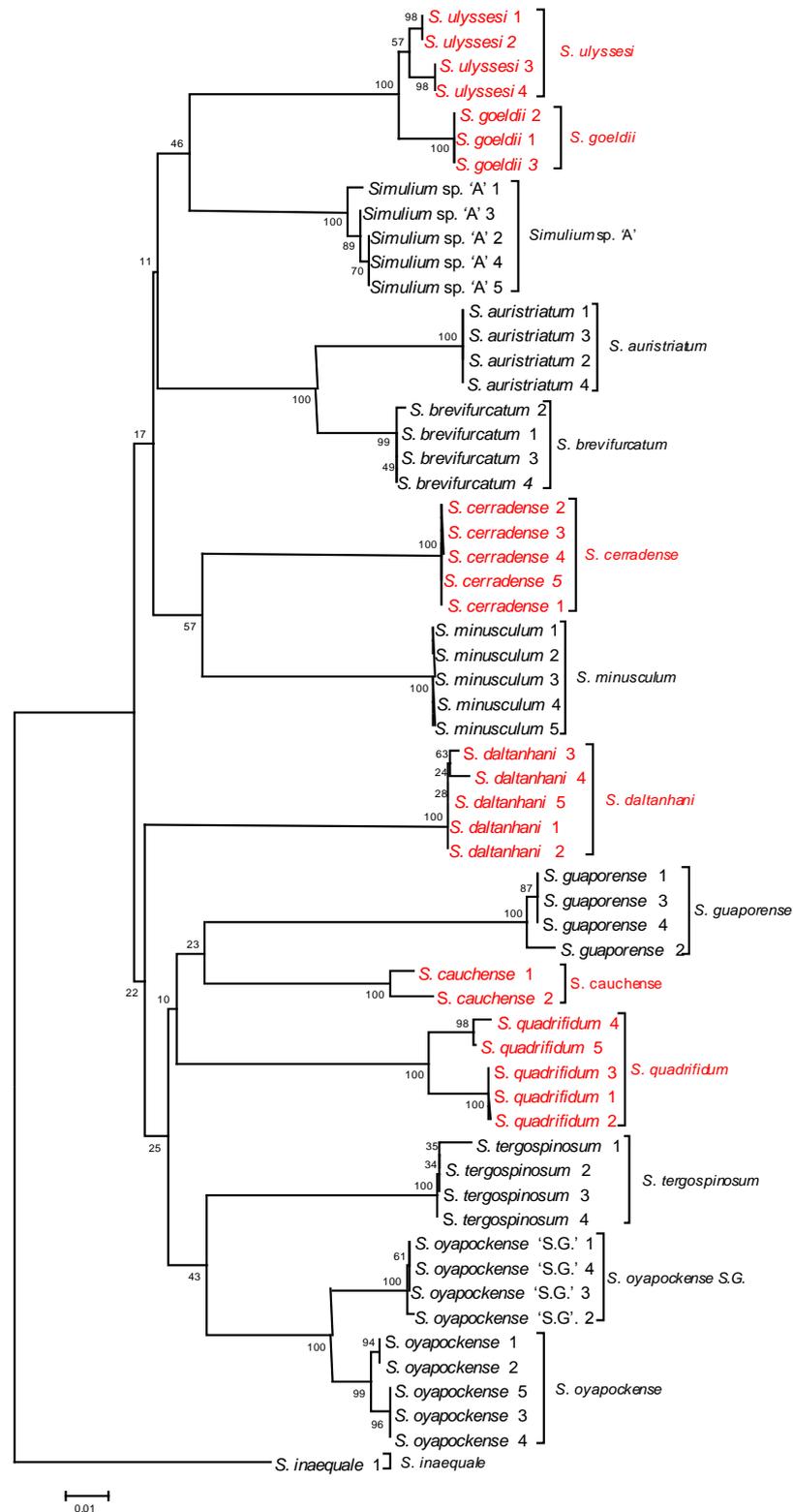


Figura 3: Árvore de *neighbour-joining* (modelo Kimura-2-parâmetros), COI, para 15 espécies de *Simulium*, com os respectivos valores de *Bootstrap*. Em vermelho, espécies pertencentes ao grupo Quadrifidum, de acordo com Adler & Crosskey (2009).

5. DISCUSSÃO

A resolução na identificação taxonômica é um aspecto chave na pesquisa biológica, uma vez que permite a compreensão da diversidade da vida, seja por meio de inventários de biodiversidade, seja pela descoberta de novas espécies. Recentemente, tem se integrado morfologia com o estudo de seqüências de DNA com o objetivo de auxiliar a compreensão das relações entre táxons relacionados. O fragmento do gene COI *barcoding* tem sido utilizado em estudos de caracterização e identificação de espécies, bem como para tentar promover uma melhor compreensão das relações entre espécies próximas.

No presente estudo, o fragmento do gene COI *barcoding* foi utilizado para testar a monofilia do grupo Quadrifidum, assim como para testar sua utilidade na identificação das espécies de *S. (Psaroniocompsa)* analisadas.

Após a análise das espécies incluídas nesse estudo observou-se altas taxas de nucleotídeos AT, para todas as espécies. Essas altas taxas parecem ser comuns em regiões do genoma mitocondrial de Diptera, incluindo Simuliidae (Xiong e Kocher, 1991; Pruess *et al.*, 2000; Mattos, 2007). Crease (1999) indica que tal proporção é típica do genoma mitocondrial de artrópodes. A divergência intra-específica ou interespecífica é calculada de acordo com o número de transições e transversões e quanto maior o número de substituições, maior será a divergência. De acordo com Li (1997) o número de transições tende a ser maior que o número de transversões, uma vez que é mais fácil haver a troca de uma purina por outra purina ou de uma pirimidina por outra pirimidina do que a troca de uma purina por uma pirimida ou vice-versa. De forma geral, as divergências apresentadas pelas espécies analisadas tenderam a obedecer este padrão.

A análise da seqüência do gene Citocromo Oxidase I (COI) *barcoding* mostrou, no geral, ser uma ferramenta apropriada para realizar inferências sobre as relações intra e interespecífica das espécies de *Simulium (Psaroniocompsa)* analisadas. Genes mitocondriais, como é o caso do COI *barcoding*, são amplamente utilizados em estudos de genética populacional e filogenia, em virtude da variabilidade presente e por serem de rápida evolução. Desta forma, eles são úteis na investigação de táxons que divergiram em tempos geológicos mais recentes (Avice, 1994; Simon *et al.*, 1994).

Na análise com o gene COI *barcoding*, o grupo formado por *Simulium goeldii* e *S. ulyssesi* foi apoiado pelo significativo valor de *bootstrap* (100). *Simulium goeldii* e *S. ulyssesi* são morfologicamente similares, diferindo no número de filamentos branquiais presente nas pupas (8 e 6 filamentos branquiais, respectivamente – Hamada e Adler, 2001; Py-Daniel e Coscarón, 2001). Se compararmos a divergência interespecífica entre *S. ulyssesi* e *S. goeldii* (2,00%, DP = 0,60%) com a divergência intra-específica destas espécies (0,006 e 0,00, respectivamente), há diferença significativa da variabilidade genética interespecífica para corroborar a hipótese que essas duas espécies sejam distintas, considerando o gene COI *barcoding*. Estas espécies são simpátricas e análises cromossômicas de populações da Amazônia Central por Ríos-Velásquez *et al.*, (2002), demonstraram que elas se diferenciam pela presença de quatro inversões fixas em seus cromossomos, confirmando o status específico desses dois taxons.

Adultos de *S. goeldii*, *S. ulyssesi* e *Simulium* “A” analisados por Hamada e Adler (2001) são similares; esses taxons se diferenciam morfologicamente apenas pelo número e disposição dos filamentos branquiais, no estágio de pupa. Foi demonstrado que *S. goeldii* e *S. ulyssesi* são espécies distintas, por meio da análise de seus cromossomos politênicos (Ríos-Velásquez *et al.*, 2002). Entretanto, os cromossomos politênicos de *Simulium* “A” não puderam ser analisados porque as larvas foram coletadas em baixa densidade e os cromossomos apresentaram-se de baixa qualidade (N. Hamada, comunicação pessoal). Os altos valores de divergência interespecífica entre as seqüências de nucleotídeos dos três táxons citados acima e, baixo valor de divergência intra-específica (0,40) de *Simulium* “A” sugere que ela representa uma espécie distinta de *S. ulyssesi* e *S. goeldii*. A análise de *neighbour-joining* corrobora com tal resultado, apesar de apoiado fracamente pelo valor de *bootstrap*. Análises com outros genes podem promover uma melhor compreensão e, possivelmente, comprovar a validade da espécie. O grupo contendo as espécies acima mencionadas se posicionou em clado distinto do que inclui *S. quadrifidum*, indicando que elas não pertencem ao grupo *Quadrifidum*.

O valor de divergência entre os morfótipos *S. oyapockense* e *S. oyapockense* “S.G.” (3,20%, DP = 0,80%) não se apresentou muito elevado, entretanto, comparado aos valores de divergência “intra-específica” (0,40%, DP = 0,20% e 0,10%, DP = 0,10%, respectivamente) e o valor de *bootstrap* (100) alto para cada clado, salientamos a hipótese de que estes táxons representam espécies crípticas.

Essas duas populações apresentam diferenças morfológicas, especialmente no estágio de pupa, quanto ao formato do casulo e espessura das brânquias e, os resultados moleculares vêm corroborar a hipótese que essas diferenças são válidas para distinguir uma espécie da outra. Rivera e Currie (2009) constataram uma divergência genética intra-específica média em torno de 0,76%, entre 58 espécies de Simuliidae que apresentaram morfologia bem distinta, valor este maior do que o encontrado para ambos os táxons acima citados.

As espécies *S. auristriatum* e *S. brevifurcatum* se mostraram bem definidas e diretamente relacionadas (5,50%, DP = 1,10%, *bootstrap* = 100), reforçando a hipótese de que estão inseridos no mesmo grupo de espécies (Coscarón e Coscarón Arias, 1997; Adler e Crosskey, 2009).

Pessoa *et al.* (2008) sugerem que não há evidências morfológicas para incluir *S. minusculum* no grupo Amazonicum, como preconizado por Shelley *et al.* (1982) ou no subgênero *S.* (*Cerqueirellum*), conforme Coscarón (1987). Adler e Crosskey (2009) também mantêm *S. minusculum* sem grupo definido. Os resultados da análise realizada sugerem fracamente (*bootstrap* = 57) que *S. minusculum* é relacionada à *S. cerradense* (grupo *Quadrifidum sensu* Adler e Crosskey, 2009), portanto, não há evidências que suporte a monofilia desses grupos e, não podemos confirmar que essas duas espécies pertençam a um “grupo de espécies” definido.

Estudos anteriores demonstram uma estreita relação morfológica entre *S. quadrifidum* e *S. cauchense*. Morfologicamente apresentam-se como grupos irmãos (*bootstrap* = 85), divergindo, no estágio larval, apenas no raio primário do leque cefálico (Pessoa *et al.*, 2008). Entretanto essa proximidade não é confirmada pelos dados moleculares, uma vez que a relação de *S. quadrifidum* com o clado que inclui *S. cauchense* é fraca. Cromossomicamente, essas espécies se distinguem pela localização da região organizadora do nucléolo, que em *S. cauchense* está posicionado no braço curto do cromossomo I e, em *S. quadrifidum* no braço longo do cromossomo III, e pela presença de três inversões fixas (Alvan-Aguilar *et al.*, 2005). Tais características cromossômicas divergentes podem indicar um distanciamento uma vez que, geralmente, espécies estreitamente relacionadas tendem a apresentar a posição da região organizadora de nucléolo conservada (Rothfels, 1988; Hamada e Adler, 1999).

Uma das espécies mais controversas incluída no grupo *Quadrifidum* é *Simulium daltanhani*. Em sua descrição, Hamada e Adler (1998), não incluem tal

espécie em um grupo de espécies definido, uma vez que suas características morfológicas diagnósticas são relacionadas com *S. quadrifidum* (grupo Quadrifidum), *S. siolii* (grupo Siolii) e *S. brevifurcatum* (grupo Auristriatum). Py-Daniel e Coscarón (2001) incluíram essa espécie no gênero *Coscaroniellum*, e Crosskey e Howard (2004), seguindo esses últimos autores, a incluíram no grupo Quadrifidum de *S. (Psaroniocompsa)*. Análise cromossômica dessa espécie, indica que a região organizadora do nucléolo está localizada no cromossomo I, curto, em posição similar à da região organizadora do nucléolo de *S. cauchense*, *S. goeldii* e *S. ulyssesi* (Ríos-Velásquez *et al.*, 2002; Alvan-Aguilar *et al.*, 2005), divergindo de *S. quadrifidum*. Dentre estas espécies, *S. daltanhani* possui grande similaridade cromossômica com *S. ulyssesi*, chegando a 67% das sequências. Entretanto, todos os braços cromossômicos de *S. daltanhani*, exceto o IIS, possuem múltiplos rearranjos, relativos às sequências de *S. ulyssesi*. A partir de tais resultados, Hamada *et al.* (2008) salientam que não há indícios que *S. daltanhani*, pertença ao grupo Quadrifidum. A análise molecular, não indica nenhuma relação significativa entre *S. daltanhani* e as demais espécies do grupo interno analisadas, apesar de estar incluída em um clado que contém espécies dos grupos Siolii, Amazonicum e Quadrifidum. A partir dos resultados obtidos não há suporte para manter *S. daltanhani* no grupo Quadrifidum, nem que Quadrifidum seja um grupo monofilético.

Py-Daniel e Pessoa (2005) elevaram o grupo Siolii do subgênero *S. (Psaroniocompsa)* para a categoria genérica, criando o gênero *Shelleyellum* (incluindo todas as espécies anteriormente consideradas deste grupo), entretanto, Shelley *et al.* (2006) sinonimizaram esse gênero com o subgênero *S. (Psaroniocompsa)*, grupo Siolii. Esses últimos autores afirmam que os caracteres de adultos e de larvas, utilizados para a criação desse gênero não teriam peso suficiente para corroborar a criação de um novo gênero. Hamada *et al.* (2006) ao descreverem os adultos de *S. guaporense* sugerem que essa espécie não deveria ser incluída no grupo Siolii, uma vez que os seus adultos não apresentam algumas características que definem esse grupo de espécies. Considerando que as espécies *S. guaporense* e *S. tergospinosum*, na presente análise molecular, foram alocadas em clados distintos na árvore, associadas a espécies de outros “grupos de espécies”, não corroboramos a hipótese que o grupo Siolii seja monofilético. Também corroboramos a hipótese de Shelley *et al.* (2006) que o gênero *Shelleyellum* não é válido.

Cerqueirellum e *Coscaroniellum* são descritos como subgêneros de acordo com Py-Daniel (1983) e posteriormente elevados a gênero (Py-Daniel e Moreira-Sampaio, 1995). Crosskey e Howard, 2004 e Adler e Crosskey (2009) incluem *Cerqueirellum* e *Coscaroniellum* como sinônimos de *S.* (*Psaroniocompsa*), e denomina o grupo que inclui as espécies desses gêneros, no grupo Amazonicum e grupo Quadrifidum, respectivamente. Pessoa *et al.* (2008), baseados em análise de parcimônia utilizando caracteres morfológicos, afirmam que os gênero *Cerqueirellum*, *Coscaroniellum* e *Shelleyellum* são gêneros válidos e monofiléticos, apesar dos valores de *bootstraps* que distinguem tais espécies serem iguais a 95, 67 e 61, respectivamente.

As informações fornecidas pelo marcador molecular mitocondrial utilizado neste trabalho não permitem corroborar a hipótese que o grupo de espécies Quadrifidum seja monofilético. Hamada *et al.* (2008), comparando informações cromossômicas de *S. daltanhani*, *S. goeldii*, *S. ulyssesi*, *S. cerradense* e *S. cauchense*, membros do grupo Quadrifidum, também sugerem que essas espécies apresentam um distanciamento significativo.

Quando considerado o refinamento necessário para se estabelecer as relações filogenéticas entre as 15 espécies de *Simulium* (*Psaroniocompsa*) estudadas, o uso do fragmento de COI *barcoding* mostrou-se eficiente para demonstrar as afinidades entre indivíduos da mesma espécie e entre grupos-irmãos, inclusive separando possíveis espécies novas e/ou crípticas (*e.g.* *Simulium* "A" e *S. oyapockense* "SG"). Tais resultados corroboram com trabalhos já existentes. Hebert *et al.* (2004b) obtiveram sucesso na distinção de 260 espécies de aves norte-americanas, constatando uma divergência interespecífica dezoito vezes maior que a divergência entre indivíduos da mesma espécie. Em Culicidae, o gene COI, foi eficaz para definir e relacionar 37 espécies, a divergência média entre espécies congênicas foi de 10,4% e entre indivíduos co-específicos de 0,5% (Cywinska *et al.*, 2006). Ekrem *et al.* (2007) reportam igual sucesso para 97 espécies de Chironomidae (média de variação intra e interespecífica de 0,87% e 14,7%, respectivamente). Na América do Norte, Rivera e Currie (2009), diferenciaram com êxito, 57 espécies de Simuliidae morfológicamente distintas (com divergências médias intra e interespecífica de 0,72% e 14,93%, respectivamente) e demonstraram a presença de espécies crípticas em oito reconhecidos complexos de espécies. Análises preliminares sobre DNA *barcoding* de 76 espécies de Simuliidae

Neotropicais resultaram em média intra e interespecíficas nos valores de 1,01% e 15,1%, respectivamente (Pepinelli, com. pess.)

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A família Simuliidae representa um exemplo claro em que a identificação em nível de espécie pode ser incrementada pela utilização de técnicas de identificação baseadas em DNA. A inerente dificuldade da identificação tanto morfológica quanto cromossômica, bem como o número reduzido de citogeneticistas e taxonomistas qualificados para a identificação deste grupo gera a necessidade do desenvolvimento de métodos alternativos.

A informação contida no fragmento de COI *barcoding* foi eficiente para a identificação de *Simulium (Psaroniocompsa)* em nível de espécie em 100% dos casos, uma vez que todos os indivíduos da mesma espécie formaram grupos definidos.

O “DNA barcoding” é um método eficiente para a identificação de espécies distintas e para promover hipóteses taxonômicas entre espécies próximas que provavelmente estão divergindo recentemente.

As fracas relações demonstradas entre as espécies do considerado grupo *Quadrifidum* é uma indicação que o mesmo seja polifilético. Com exceção de *S. ulyssesi* e *S. goeldii*, nenhuma espécie do grupo foi recuperada como grupo-irmão de outra.

É evidente que para a resolução das relações filogenéticas entre espécies crípticas, ou em grupos com baixa resolução, um único método não é suficiente. A utilização de metodologias clássicas tais como morfologia, citologia, comportamento e história natural, associados de forma criteriosa a técnicas moleculares, incluindo genes nucleares e mitocondriais, pode auxiliar na resolução dessas relações.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adler, P. H.; Becnel, J. J.; Moser, B. 2000. Molecular characterization and taxonomy of a new species of *Caudosporidae* (*Microsporidia*) from black flies (Diptera: Simuliidae) with host-derived relationships of the North American caudosporids. *J Invertebr Pathol.* 75(2): 133-143.
- Adler, P. H.; Crosskey, R. W. 2009. World Blackflies (Diptera:Simuliidae): A Comprehensive Revision of the Taxonomic and Geographical Inventory. <http://entweb.clemson.edu/biomia/pdfs/blackflyinventory.pdf>. Acesso: 30/06/2009.
- Adler, P. H.; Currie, C. D.; Wood, D. M. 2004. *The Black Flies (Simuliidae) of North America*. Cornell University Press, Ithaca, New York, USA. 980 pp.
- Alencar, Y. B.; Ludwig, T. A. V.; Soares, C. C.; Hamada, N. 2001. Stomach content analyses of *Simulium perflavum* Roubaud 1906 (Diptera: Simuliidae) larvae from streams in Central Amazonia, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz.* 96 (4): 561-576.
- Alvan-Aguilar, M. A.; Hamada, N.; Adler, P. H.; Luz, S. B. 2005. Cytotaxonomy of *Simulium cauchense* Floch e Abonnenc and *Simulium quadrifidum* (Diptera: Simuliidae) in Brazilian Amazônia. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz.* 100(3): 249-257.
- Andreazze, R.; Py-Daniel, V. 1999. Atividade hematófaga mensal e infecção natural de *Psaroniocompsa incrustata* (Lutz, 1910) (Diptera, Culicomorpha, Simuliidae) vetor de *Onchocerca volvulus* (Leuckart, 1893) em Xitei/Xidea, área indígena Yanomami, Roraima, Brasil. *Entomol. Vec.* 6 (4): 415-440.
- Armstrong, K. F.; Ball, S. L. 2005. DNA barcodes for biosecurity: invasive species identification. *Philosophical Transactions of the Royal Society B.* 360: 1813–1823. (doi: 10.1098/rstb.2005.1713.)
- Avise, J. C. 1994. *Molecular Markers, Natural History and Evolution*, Chapman and Hall, New York, NY, USA. 511pp.
- Barcode of Life Data Systems, 2009. (www.barcodinglife.org). Acesso: 20/07/2009.
- Barret, R. D. H.; Hebert, P. D. N. 2005. Identifying spiders through DNA barcodes. *Canadian Journal of Zoology.* 83: 481-491.

- Bartlett, S. E.; Davidson, W. S. 1992. FINS (Forensically Informative Nucleotide Sequencing): a procedure for identifying animal origin of biological specimens. *Biotechniques*. 12: 408–411.
- Blair, C. P.; Abrahamson, W. G.; Jackman, J. A.; Tyrrell, I. 2005. Cryptic speciation and host-race formation in a purportedly generalist tumbling flower beetle. *Evolution* 59: 304–316.
- Blaxter, M. L. 2004. The promise of a DNA taxonomy. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*. 359: 669–679.
- Branco, B. C.; Chamon, W.; Belfort, R. N.; Belfort, J. R.; Costa, A. J. A. 1998. Achados oculares entre habitantes do município de Pauini e possível associação entre lesões corneanas e mansonelose na Amazônia. *Arquivo Brasileiro de Oftalmologia*. 61(6): 675-681.
- Caterino, M. S.; Cho, S.; Sperling, F. A. H. 2000. The current state of insect molecular systematics: a thriving Tower of Babel. *Annual Review of Entomology* 45, 1-54.
- Cerqueira, N. L. 1959. Sobre a transmissão de *Mansonella ozzardi* da 1ª e 2ª notas. *Jornal Brasileiro de Medicina*. 1 (7): 885-914.
- Coscarón, S. 1981. Notas sobre simulidos Neotropicales. Sobre el subgenero *Simulium* (*Chirostilbia*). Enderlein, com la descripción de dos especies nuevas del S. E. del Brasil (Diptera: Insecta). *Revista de la Sociedad Argentina* 40: 157-164.
- Coscarón, S. 1987. *El género Simulium Latreille en la Región Neotropical: Análisis de los Grupos Supraspecíficos, Especies que los Integran y Distribución Geográfica (Simuliidae, Diptera)*. Museu Paraense Emílio Goeldi, 112 pp.
- Coscarón, S. 1991. *Fauna de água dulce de la Republica Argentina: Insecta, Diptera, Simuliidae*. Fundación para la Educación, la Ciencia y la Cultura, Buenos Aires, Argentina. 304 pp.
- Coscarón, S.; Coscarón Arias, C. L. 1997. Cladistic analysis of the subgenera *Inaequalium*, *Psaroniocompsa*, and *Chirostilbia* of the genus *Simulium*, with comments on their distribution (Diptera: Simuliidae). *Revista de La Sociedade Entomologica Argentina*. 56(1-4): 109-121.
- Coscarón, S.; Coscarón Arias, C. L. 2007. *Neotropical Simuliidae (Diptera: Insecta), Aquatic Biodiversity of Latin America*. ABLA series, volume 3.

- Coscarón, S.; Wygodzinsky, P. 1984. Notas sobre Simúlidos Neotropicales VII Sobre los subgêneros *Psaroniocompsa* Enderlein y *Inaequalium*, subgen. nov. *Arquivos de Zoologia*. 31 (2): 37-103.
- Crease, T. J. 1999. The complete sequence for the mitochondrial genome of *Daphnia pulex* (Cladocera: Crustacea). *Gene*. 233: 89-99.
- Crosskey, R.W. 1988. An annotated checklist of the world blackflies (Diptera: Simuliidae). pp. 425-520. *In Blackflies: ecology population management, and annotated world list*. Kim, K.C.; Merritt, R.W. (Eds.). The Pennsylvania State University, University Park, USA. 528p.
- Crosskey, R. W. 1990. Life in the water. *In: Wiley, J. Sons (Eds). The natural history of blackflies*. The Museum of Natural History Press, London. 89-293pp.
- Crosskey, R. W. 1993. Blackflies (Simuliidae). *In: Lane, R. P.; Crosskey, R. W. (Eds). Medical Insects and Arachnids*. Chapman & Hill, London, UK. 240-287pp.
- Crosskey, R. W.; Howard, T. M. 2004. *A new taxonomic and geographical inventory of world blackflies (Diptera: Simuliidae)*. The Natural History Museum, London. 144pp.
- Cywinska, A.; Hunter, F. F.; Hebert, P. D. N. 2006. Identifying Canadian mosquito species through DNA barcodes. *Medical and Veterinary Entomology*, 20: 413-424.
- Dayrat, B. 2005. Towards integrative taxonomy. *Biological Journal of the Linnean Society*. 85; 407–415.
- Duncan, G. A.; Adler, P. H.; Pruess, K. P.; Powers, T. O. 2004. Molecular differentiation of two sibling species of the black fly *Simulium vittatum* (Diptera: Simuliidae) based on random amplified polymorphic DNA. *Genome*. 47 (2): 373-379.
- Ekrem, T.; Willassen, E.; Stur, E. 2007. A comprehensive DNA sequence library is essential for identification with DNA barcodes. *Molecular Phylogenetic Evolution* doi:10.1016/j.ympev.2006.11.021.
- Felsenstein, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: Na approach using the bootstrap. *Evolution*. 39.
- Ferreira, F. S. C.; Rocha, L. A. C. 1991. Filaríases. *In: R. Veronesi (Ed.). Doenças Infeciosas e Parasitárias*. 8 ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, RJ. p. 869-886.

- Funk, D. J.; Omland, K. E. 2003. Species-level paraphyly and polyphyly: frequency, causes, and consequences, with insights from animal mitochondrial DNA. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics*. 34: 397–423.
- Garrido, C.; Campos, M. 2000. First of presumed parasitic keratitis in indians from the Brazilian Amazon. *Cornea*. 19(6): 817-819.
- Goetze, E. 2003. Cryptic speciation on the high seas; global phylogenetics of the copepod family Eucalanidae. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*. 270: 2321–2331.
- Hall, T. A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, 41: 95–98.
- Hamada, N. 2000. *Simulium (Psaroniocompsa) tergo-spinosum* New Species (Diptera: Simuliidae) in *siolii* Group from the Southern Part of the State of Amazonas, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 95 (6): 819 – 828.
- Hamada, N.; Adler, P. H. 1998. A new specie of *Simulium* (Diptera: Simuliidae) from open areas in Central Amazonia, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 93 (3): 317-325.
- Hamada, N.; Adler, P. H. 1999. Cytotaxonomy of four species in the *Simulium perflavum* species group (Diptera: Simuliidae) from Brazilian Amazonia. *Systematic Entomology*. 24: 273-288.
- Hamada, N.; Adler, P. H. 2001. Bionomia e chave para imaturos de *Simulium* (Diptera: Simuliidae) na Amazônia Central, Brasil. *Acta Amazonica*. 31(1): 109-132.
- Hamada, N., Hernandez, L.; Luz, S. L. B. 2006. Taxonomy of *Simulium guaporense* Py-Daniel (Diptera: Simuliidae) from Brazil, with the first description of males and females. *Zootaxa 1104*: 23-34.
- Hamada, N.; Pereira, E. S.; Adler, P. H. 2008. Polytene Chromosomes of *Simulium (Psaroniocompsa) daltanhani* (Diptera: Simuliidae) from Central Amazonia, Brazil. *Zootaxa*. 1676: 57-62.
- Hebert, P. D. N., Cywinska, A.; Ball, S. L.; de Waard, J.R. 2003a. Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*. 270, 313–321.
- Hebert, P. D. N.; Gregory, T. R. 2005. The Promise of DNA Barcoding for Taxonomy. *Systematic Biology*. 54(5):852–859.

- Hebert, P. D. N.; Penton, E. H.; Burns, J. M.; Janzen, D. H.; Hallwachs, W. 2004a. Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astrapes fulgerator*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 101: 14812–14817.
- Hebert, P. D. N.; Ratnasingham S.; de Waard, J. R. 2003b. Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences.* 270, S96–S99.
- Hebert, P. D. N.; Stoeckle, M. Y.; Zemplak, T. S.; Francis, C. M. 2004b. Identification of birds through DNA barcodes. *PLoS Biology.* 2: 1657–1663.
- Hendrixson, B. E.; Bond, J. E. 2005. Testing species boundaries in the *Anthrodiaetus unicolor* complex (Araneae: Mygalomorphae: Antrodiaetidae): “Paraphyly” and cryptic diversity. *Molecular Phylogenetic Evolution* 36: 405–416.
- Hills, D. M.; Bull, J. J. 1993. An empirical test of bootstrapping as a method for assessing confidence in phylogenetic analysis. *Systematic Biology.* 42: 182-192.
- Joy, D. A.; Conn, J. E. 2001. Molecular and morphological phylogenetic analysis of an insular radiation in Pacific black flies (*Simulium*). *Systematic Biology.* 50 (1): 18-38.
- Kimura, M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution.* 16: 111-120.
- Krueger, A.; Gelhaus, A.; Garms, R. 2000. Molecular identification and phylogeny of East African *Simulium damnosum* s.l. and their relationship with west african species of the complex (Diptera: Simuliidae). *Insect Molecular Biology.* 9 (1): 101-108.
- Krueger, A.; Hennings, I. C. 2006. Molecular phylogenetics of blackflies of the *Simulium damnosum* complex and cytophylogenetic implications. *Molecular Phylogenetic Evolution.* 39: 83-90.
- Kuvangkadilok, C.; Boonkemtong, C.; Phayahasena, S.; Baimai, V. 2003. Larval polytene chromosomes of black flies (*Simulium*) from Thailand. I. Comparison among five species in the subgenus *Gomphostilbia* Enderlein. *Genetica.* 118 (1): 69-81.
- Li, Wen-Hsiung, 1997. *Molecular Evolution.* Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts, USA. 487pp.

- Mank, R.; Wilson, M. D.; Rubio, J. M.; Post, R. J. 2004. A molecular marker for the identification of *Simulium squamosum* (Diptera: Simuliidae). *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*. 98 (2): 197-208.
- Mattos, A. A. 2007. Caracterização molecular e citológica de diferentes populações geográficas de *Simulium guianense*. Dissertação de Mestrado, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazonia/Universidade Federal do Amazonas, Manaus, Amazonas. 109pp.
- Meyer, C. P.; Paulay, G. 2005. DNA barcoding: error rates based on comprehensive sampling. *PLoS Biology*. 3: 422.
- Monaghan, M. T.; Balke, M.; Pons, J.; Vogler, A. P. 2006. Beyond barcodes: complex DNA taxonomy of a South Pacific island radiation. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*. 273: 887–893.
- Moulton, J. K. 2000. Molecular sequence data resolves basal divergences within Simuliidae (Diptera). *Systematic Entomology*. 25: 95-113.
- Mustapha, M.; Post, R. J.; Kruger, A. 2004. The cytotaxonomy and morphotaxonomy of *Simulium mengense* (Diptera: Simuliidae). *Annual of Tropical Medicine and Parasitology*. 98 (5): 509-523.
- NCBI, 2009. BLAST, 2009. (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Acesso: 01/07/2009.
- Nei, M.; Kumar, S. 2000. *Molecular evolution and phylogenetics*. Oxford University Press, New York, NY. 333pp.
- Nixon, C. K.; Carpenter, J. M. 1993. On outgroups. *Cladistics* 9: 413-426.
- Olson, R. R. 1991. Whose larvae? *Nature*. 351: 352–353.
- Pessoa, F. A. C.; Py-Daniel, V.; Ríos-Velásquez, C. M. 2008. Cladistic analysis of the Neotropical genera *Cerqueirellum* Py-Daniel, 1983, *Coscaroniellum* Py-Daniel, 1983 and *Shelleyellum* Py-Daniel e Pessoa, 2005 (Diptera: Simuliidae). *Acta Amazônica*. 38(3): 551-568.
- Post, R. J.; Flook, P. K.; Millest, A. L.; Cheke, R. A.; McCall, P. J.; Wilson, M. D.; Mustapha, M.; Somiari, S.; Davies, J. B.; Mank, R. A.; Geenen, P.; Enyong, P.; Pramual, P.; Kuvangkadilok, C.; Baimai, V.; Walton, C. 2003. Phylogeography of the black fly *Simulium tani* (Diptera: Simuliidae) from Thailand as inferred from mtDNA sequences. *Molecular Ecology*. 14: 3989-4001.

- Pramual, P.; Kuvangkadilok, C.; Baimai, V.; Walton, C. 2005. Phylogeography of the black fly *Simulium tani* (Diptera: Simuliidae) from Thailand as inferred from mtDNA sequences. *Molecular Ecology*. 14: 3989-4001.
- Pruess, K. P.; Adams, B. J.; Parsons, T. J.; Zhu, X.; Powers, T. O. 2000. Utility of the mitochondrial cytochrome oxidase II gene for resolving relationships among black flies (Diptera: Simuliidae). *Molecular Phylogenetic Evolution*. 16 (2): 286-95.
- Py-Daniel, V. 1983. Caracterização de dois novos subgêneros em Simuliidae (Diptera: Culicomorpha) Neotropical. *Amazoniana*. 2: 159-223.
- Py-Daniel, V.; Coscarón, S. 2001. Simuliidae (Diptera: Culicomorpha) no Brasil III. Sobre o *Coscaroniellum ulysseesi* sp.n. *Entomologia y Vectores*. 8: 51-64.
- Py-Daniel, V.; Moreira Sampaio, R.T. 1995. Gêneros e espécies de Simuliidae (Diptera: Culicomorpha) assinalados para o Brasil até 1995. *Entomologia y Vectores*. 2: 117-121.
- Py-Daniel, V.; Pessoa, F. A. C. 2005. Simuliidae (Diptera: Culicomorpha) no Brasil. XI. *Shelleyellum* gênero novo. *Acta Amazonica*. 35: 473-486.
- Ríos-Velásquez, C. M; Hamada, N.; Adler, P. H. 2002. Cytotaxonomy of *Simulium goeldii* Cerqueira & Nunes de Mello and *Simulium ulysseesi* (Py-Daniel & Coscarón) (Diptera: Simuliidae) in Central Amazonia, Brazil. *Insect Systematics and Evolution*. 33: 113-120.
- Rivera, J.; Currie, D. C. 2009. Identification of Nearctic Black flies using DNA barcodes (Diptera: Simuliidae). *Molecular Ecology*. 9 (Suppl. 1), 224-236.
- Roe, A. D.; Sperling, F. A. H. 2007. Patterns of evolution of mitochondrial cytochrome c oxidase I and II DNA and implications for DNA barcoding. *Molecular Phylogenetic Evolution*. doi:10.1016/j.ympev,2006.12.005
- Rothfels, K. H. 1988. Cytological approaches to black fly taxonomy. In Kim, K. C.; Merritt, R. W. (Eds), *Black Flies: Ecology, Population Management, and Annotated World List*. Pennsylvania State University Park, PA. p. 39-52.
- Saccone, C.; DeCarla, G.; Gissi, C.; Pesole, G.; Reyes, A. 1999. Evolutionary genomics in the Metazoa: the mitochondrial DNA as a model system. *Gene*. 238: 195–210.
- Saitou, N.; Nei, M. 1987. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetics trees. *Molecular Biology and Evolution*. 4: 406-425.
- Sanger, F.; Nicklen, S.; Coulson, A. R. 1977. DNA sequencing with chain terminator inhibitor. *Proceedings of the National Academy of Science of USA*, 74: 5463-5467.

- Savolainen, V.; Cowan, R. S.; Vogler, A. P.; Roderick, G. K.; Lane, R. 2005. Towards writing the encyclopaedia of life: an introduction to DNA barcoding. *Philosophical Transactions of the Royal Society Biological Sciences*. 360: 1805-1811.
- Scheffer, S. J.; Giblin-Davis, R. M.; Taylor, G. S.; Davies, K. A.; Purcell, M.; Lewis, M. I.; Goolsby, J.; Center, T. D. 2004. Phylogenetic relationships, species limits, and host specificity of gall-forming Fergusonina flies (Diptera: Fergusoninidae) feeding on *Melaleuca* (Myrtaceae). *Annals of the Entomological Society of America*. 97: 1216–1221.
- Schneider, H. 2007. *Métodos de análise filogenética: um guia prático*. Sociedade Brasileira de Genética, Ribeirão Preto, SP. 200pp.
- Service, M. W. 1997. *Medical entomology*. Chapman & Hill, London, UK. 267 pp.
- Shelley, A.J., Pinger, R.R. & Moraes, M.A.P. 1982. The taxonomy, biology and medical importance of *Simulium amazonicum* Goeldi (Diptera: Simuliidae), with a review of related species. *Bulletin of the British Museum (Natural History) Entomology series*, 44, 1–29.
- Shelley, A. J. 1988 Vector aspects of the epidemiology of onchocerciasis in Latin America. *Annual Review of Entomology*. 3: 337–366.
- Shelley, A.J.; Hernández, L.M.; Maia-Herzog, M.A.; Luna Dias, A.P.A.; Luz, S.B. 2006. An interpretation of the morphological variation in the *Simulium amazonicum* species group (Diptera: Simuliidae) of Latin America. *Zootaxa* 1274: 1–68
- Simon, C.; Frati, F.; Beckenbach, A.; Crespi, B.; Liu, H.; Flook, P. 1994. Evolution, weighting and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reactions primers. *Annals of the Entomological of America*. 87(6): 651-701.
- Sperling, F. A. H.; Anderson, G. S.; Hickey, D. A. 1994. A DNA-based approach to the identification of insect species used for postmortem interval estimation. *Journal of Forensic Science*. 39: 418–427.
- Sperling, F. A. H.; Hickey, D. A. 1994. Mitochondrial DNA sequence variation in the Spruce budworm species complex (*Choristoneura*: Lepidoptera). *Molecular Biology and Evolution*. 11: 656–665.
- Spironello, M.; Hunter, F. F. 2005. Polytene chromosomes of an archipelagic subgenus, *Inseliellum* (Diptera: Simuliidae). *Genetica*. 123 (3): 217-26.
- Stoeckle, M. 2003. Taxonomy, DNA, and the bar code of life. *Biosciences*. 53: 796–797.

- Tautz, D.; Arctander, P.; Minelli, A.; Thomas, R. H.; Vogler, A. P. 2003. A plea for DNA taxonomy. *Trends in Ecology and Evolution*. 18: 70-74 .
- Thompson, J. D.; Higging, D. G.; Gibson, T. J. 1994. ClustalW : Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and matrix choice. *Nucleic Acids Research*, (22): 4673-4680.
- Wells, J. D.; Paper, T.; Sperling, F. A. H. 2001. DNA-based identification and molecular systematics of forensically important Sarcophagidae (Diptera). *Journal of Forensic Science*. 46: 1098–1102.
- Whitworth, T. L.; Dawson, R. D.; Magalon, H.; Baudry, E. 2007. DNA barcoding cannot reliably identify species of the blowfly genus *Protocalliphora* (Diptera: Calliphoridae). *Proceedings of the Royal Society Biological Sciences*. 274: 1731-1739.
- Xiong, B.; Kocher, T. D. 1991. Comparison of mitochondrial DNA sequences of seven morphospecies of black flies (Diptera: Simuliidae). *Genome*. 34: 306–311.

ANEXOS

Anexo 1: Número de transições (Ts) e transversões (Tv) para o gene COI *barcoding* entre indivíduos da mesma espécie. Pares idênticos (ii) indicam locais onde não ocorreram substituições. As demais colunas indicam a substituição de um nucleotídeo por outro – por exemplo, “TC” indica a troca de uma **T**imina por uma **C**itosina, “AG” indica a troca de uma **A**denina por uma **G**uanina, e assim sucessivamente.

Domínio	ii	Ts	Tv	TT	TC	TA	TG	CT	CC	CA	CG	AT	AC	AA	AG	GT	GC	GA	GG
Todos os taxa	405	28	25	160	10	9	1	11	66	2	0	10	2	113	3	1	0	3	66
<i>S. cerradense</i>	459	0	0	186	0	0	0	0	80	0	0	0	0	123	0	0	0	0	70
<i>S. cauchense</i>	453	2	5	176	0	0	0	1	78	4	0	0	1	131	1	0	0	0	68
<i>S. quadrifidum</i>	452	7	1	175	2	0	0	2	79	0	0	1	0	128	2	0	0	0	70
<i>S. goeldii</i>	458	0	0	188	0	0	0	0	77	0	0	0	0	122	0	0	0	0	71
<i>S. ulyssesi</i>	455	2	1	188	1	0	1	1	73	0	0	0	0	122	0	0	0	1	71
<i>S. daltanhani</i>	459	0	1	176	0	0	0	0	83	0	0	0	0	131	0	0	0	0	69
<i>Simulium</i> sp. 'A'	457	2	0	182	0	0	0	0	79	0	0	0	0	126	1	0	0	0	70
<i>S. oyapockense</i>	457	2	0	181	0	0	0	2	70	0	0	0	0	140	0	0	0	0	66
<i>S. oyapockense</i> 'S.G.'	458	0	0	182	0	0	0	0	72	0	0	0	0	134	0	0	0	0	70
<i>S. minusculum</i>	459	0	0	184	0	0	0	0	79	0	0	0	0	125	0	0	0	0	71
<i>S. auristriatum</i>	460	0	0	184	0	0	0	0	83	0	0	0	0	118	0	0	0	0	75
<i>S. tergospinosum</i>	456	0	1	178	0	0	0	0	79	0	0	0	0	126	0	0	0	0	74
<i>S. guaporense</i>	457	0	2	169	0	0	0	0	81	0	0	0	1	143	0	0	0	0	64
<i>S. brevifurcatum</i>	457	0	0	178	0	0	0	0	86	0	0	0	0	126	0	0	0	0	68

Anexo 2: Divergência genética entre os 60 indivíduos de *Simulium* analisados, calculada pela distância média, modelo Kimura-2-parâmetros.

	<i>S. cerradense</i> 1	<i>S. cerradense</i> 2	<i>S. cerradense</i> 3	<i>S. cerradense</i> 4	<i>S. cerradense</i> 5	<i>S. cauchense</i> 1
<i>S. cerradense</i> 1	-					
<i>S. cerradense</i> 2	0,00188	-				
<i>S. cerradense</i> 3	0,00188	0,00000	-			
<i>S. cerradense</i> 4	0,00000	0,00188	0,00188	-		
<i>S. cerradense</i> 5	0,00000	0,00188	0,00188	0,00000	-	
<i>S. cauchense</i> 1	0,14996	0,14994	0,14994	0,14996	0,14996	-
<i>S. cauchense</i> 2	0,15684	0,15682	0,15682	0,15684	0,15684	0,01522
<i>S. quadrifidum</i> 1	0,16016	0,16015	0,16015	0,16016	0,16016	0,11402
<i>S. quadrifidum</i> 2	0,16016	0,16015	0,16015	0,16016	0,16016	0,11402
<i>S. quadrifidum</i> 3	0,16016	0,16015	0,16015	0,16016	0,16016	0,11402
<i>S. quadrifidum</i> 4	0,16004	0,16003	0,16003	0,16004	0,16004	0,12296
<i>S. quadrifidum</i> 5	0,15522	0,15521	0,15521	0,15522	0,15522	0,12070
<i>S. goeldii</i> 1	0,13230	0,13227	0,13227	0,13230	0,13230	0,13205
<i>S. goeldii</i> 2	0,13199	0,13198	0,13198	0,13199	0,13199	0,13167
<i>S. goeldii</i> 3	0,13199	0,13198	0,13198	0,13199	0,13199	0,13167
<i>S. ulyssesi</i> 1	0,12376	0,12374	0,12374	0,12376	0,12376	0,13008
<i>S. ulyssesi</i> 2	0,12300	0,12299	0,12299	0,12300	0,12300	0,12939
<i>S. ulyssesi</i> 3	0,12773	0,12772	0,12772	0,12773	0,12773	0,12989
<i>S. ulyssesi</i> 4	0,12773	0,12772	0,12772	0,12773	0,12773	0,12989
<i>S. daltanhani</i> 1	0,15013	0,15012	0,15012	0,15013	0,15013	0,13145
<i>S. daltanhani</i> 2	0,15013	0,15012	0,15012	0,15013	0,15013	0,13145
<i>S. daltanhani</i> 3	0,15242	0,15240	0,15240	0,15242	0,15242	0,13368
<i>S. daltanhani</i> 4	0,15478	0,15477	0,15477	0,15478	0,15478	0,13600
<i>S. daltanhani</i> 5	0,15013	0,15012	0,15012	0,15013	0,15013	0,13145
<i>Simulium</i> sp. 'A' 1	0,12317	0,12315	0,12315	0,12317	0,12317	0,13173
<i>Simulium</i> sp. 'A' 2	0,12316	0,12315	0,12315	0,12316	0,12316	0,13173
<i>Simulium</i> sp. 'A' 3	0,12089	0,12087	0,12087	0,12089	0,12089	0,12945
<i>Simulium</i> sp. 'A' 4	0,12316	0,12315	0,12315	0,12316	0,12316	0,13173
<i>Simulium</i> sp. 'A' 5	0,12545	0,12544	0,12544	0,12545	0,12545	0,13402
<i>S. oyapockense</i> 1	0,13224	0,13221	0,13221	0,13224	0,13224	0,10964
<i>S. oyapockense</i> 2	0,13224	0,13221	0,13221	0,13224	0,13224	0,10964
<i>S. oyapockense</i> 3	0,12995	0,12992	0,12992	0,12995	0,12995	0,11630
<i>S. oyapockense</i> 4	0,12995	0,12992	0,12992	0,12995	0,12995	0,11630
<i>S. oyapockense</i> 5	0,12995	0,12992	0,12992	0,12995	0,12995	0,11630
<i>S. oyapockense</i> 'S.G.'	0,13943	0,13940	0,13940	0,13943	0,13943	0,12516
<i>S. oyapockense</i> 'S.G.'	0,14386	0,14384	0,14384	0,14386	0,14386	0,12964
<i>S. oyapockense</i> 'S.G.'	0,13937	0,13934	0,13934	0,13937	0,13937	0,12516
<i>S. oyapockense</i> 'S.G.'	0,13937	0,13934	0,13934	0,13937	0,13937	0,12516
<i>S. minusculum</i> 1	0,11891	0,11882	0,11882	0,11891	0,11891	0,14301
<i>S. minusculum</i> 2	0,11891	0,11882	0,11882	0,11891	0,11891	0,14301
<i>S. minusculum</i> 3	0,11891	0,11882	0,11882	0,11891	0,11891	0,14301
<i>S. minusculum</i> 4	0,11891	0,11882	0,11882	0,11891	0,11891	0,14301
<i>S. minusculum</i> 5	0,11891	0,11882	0,11882	0,11891	0,11891	0,14301
<i>S. auristriatum</i> 1	0,13678	0,13677	0,13677	0,13678	0,13678	0,14525
<i>S. auristriatum</i> 2	0,13678	0,13677	0,13677	0,13678	0,13678	0,14525
<i>S. auristriatum</i> 3	0,13678	0,13677	0,13677	0,13678	0,13678	0,14525
<i>S. auristriatum</i> 4	0,13678	0,13677	0,13677	0,13678	0,13678	0,14525
<i>S. tergospinosum</i> 1	0,14885	0,14883	0,14883	0,14885	0,14885	0,14123
<i>S. tergospinosum</i> 2	0,14196	0,14194	0,14194	0,14196	0,14196	0,13440
<i>S. tergospinosum</i> 3	0,14196	0,14194	0,14194	0,14196	0,14196	0,13440
<i>S. tergospinosum</i> 4	0,14196	0,14194	0,14194	0,14196	0,14196	0,13440
<i>S. guaporense</i> 1	0,17906	0,17905	0,17905	0,17906	0,17906	0,12077
<i>S. guaporense</i> 2	0,17898	0,17897	0,17897	0,17898	0,17898	0,12972
<i>S. guaporense</i> 3	0,17906	0,17905	0,17905	0,17906	0,17906	0,12077
<i>S. guaporense</i> 4	0,17660	0,17659	0,17659	0,17660	0,17660	0,11852
<i>S. brevifurcatum</i> 1	0,12551	0,12550	0,12550	0,12551	0,12551	0,13187
<i>S. brevifurcatum</i> 2	0,12784	0,12783	0,12783	0,12784	0,12784	0,13418
<i>S. brevifurcatum</i> 3	0,12551	0,12550	0,12550	0,12551	0,12551	0,13187
<i>S. brevifurcatum</i> 4	0,12625	0,12626	0,12626	0,12625	0,12625	0,13022
<i>S. inaequale</i> 1	0,15751	0,15750	0,15750	0,15751	0,15751	0,16213

Anexo 2: Continuação.

	<i>S. cauchense</i> 2	<i>S. quadrifidum</i> 1	<i>S. quadrifidum</i> 2	<i>S. quadrifidum</i> 3	<i>S. quadrifidum</i> 4	<i>S. quadrifidum</i> 5
<i>S. cauchense</i> 2	-					
<i>S. quadrifidum</i> 1	0,12296	-				
<i>S. quadrifidum</i> 2	0,12296	0,00000	-			
<i>S. quadrifidum</i> 3	0,12296	0,00000	0,00000	-		
<i>S. quadrifidum</i> 4	0,12747	0,02908	0,02908	0,02908	-	
<i>S. quadrifidum</i> 5	0,12519	0,02908	0,02908	0,02908	0,00379	-
<i>S. goeldii</i> 1	0,14116	0,14600	0,14600	0,14600	0,14831	0,14363
<i>S. goeldii</i> 2	0,14079	0,14564	0,14564	0,14564	0,14791	0,14324
<i>S. goeldii</i> 3	0,14079	0,14564	0,14564	0,14564	0,14791	0,14324
<i>S. ulyssezi</i> 1	0,13693	0,15138	0,15138	0,15138	0,14418	0,13952
<i>S. ulyssezi</i> 2	0,13616	0,15053	0,15053	0,15053	0,14338	0,13873
<i>S. ulyssezi</i> 3	0,13665	0,15092	0,15092	0,15092	0,14377	0,13911
<i>S. ulyssezi</i> 4	0,13665	0,15092	0,15092	0,15092	0,14377	0,13911
<i>S. daltanhani</i> 1	0,14258	0,16451	0,16451	0,16451	0,16924	0,16436
<i>S. daltanhani</i> 2	0,14258	0,16451	0,16451	0,16451	0,16924	0,16436
<i>S. daltanhani</i> 3	0,14483	0,16682	0,16682	0,16682	0,17156	0,16668
<i>S. daltanhani</i> 4	0,14268	0,16707	0,16707	0,16707	0,17182	0,16691
<i>S. daltanhani</i> 5	0,14258	0,16451	0,16451	0,16451	0,16924	0,16436
<i>Simulium</i> sp. 'A' 1	0,13393	0,14120	0,14120	0,14120	0,14112	0,13648
<i>Simulium</i> sp. 'A' 2	0,13394	0,13655	0,13655	0,13655	0,13648	0,13188
<i>Simulium</i> sp. 'A' 3	0,13165	0,13887	0,13887	0,13887	0,13880	0,13418
<i>Simulium</i> sp. 'A' 4	0,13394	0,13655	0,13655	0,13655	0,13648	0,13188
<i>Simulium</i> sp. 'A' 5	0,13624	0,13655	0,13655	0,13655	0,13648	0,13188
<i>S. oyapockense</i> 1	0,12034	0,12760	0,12760	0,12760	0,13674	0,13673
<i>S. oyapockense</i> 2	0,12034	0,12760	0,12760	0,12760	0,13674	0,13673
<i>S. oyapockense</i> 3	0,12259	0,13214	0,13214	0,13214	0,14137	0,14137
<i>S. oyapockense</i> 4	0,12259	0,13214	0,13214	0,13214	0,14137	0,14137
<i>S. oyapockense</i> 5	0,12259	0,13214	0,13214	0,13214	0,14137	0,14137
<i>S. oyapockense</i> 'S.G.' 1	0,13620	0,14123	0,14123	0,14123	0,14597	0,14597
<i>S. oyapockense</i> 'S.G.' 2	0,14067	0,14577	0,14577	0,14577	0,15057	0,15058
<i>S. oyapockense</i> 'S.G.' 3	0,13617	0,14117	0,14117	0,14117	0,14594	0,14595
<i>S. oyapockense</i> 'S.G.' 4	0,13617	0,14117	0,14117	0,14117	0,14594	0,14595
<i>S. minusculum</i> 1	0,14297	0,14340	0,14340	0,14340	0,13880	0,13422
<i>S. minusculum</i> 2	0,14297	0,14340	0,14340	0,14340	0,13880	0,13422
<i>S. minusculum</i> 3	0,14297	0,14340	0,14340	0,14340	0,13880	0,13422
<i>S. minusculum</i> 4	0,14297	0,14340	0,14340	0,14340	0,13880	0,13422
<i>S. minusculum</i> 5	0,14297	0,14340	0,14340	0,14340	0,13880	0,13422
<i>S. auristriatum</i> 1	0,14957	0,14737	0,14737	0,14737	0,15445	0,14975
<i>S. auristriatum</i> 2	0,14957	0,14737	0,14737	0,14737	0,15445	0,14975
<i>S. auristriatum</i> 3	0,14957	0,14737	0,14737	0,14737	0,15445	0,14975
<i>S. auristriatum</i> 4	0,14957	0,14737	0,14737	0,14737	0,15445	0,14975
<i>S. tergospinosum</i> 1	0,14781	0,13716	0,13716	0,13716	0,13959	0,13957
<i>S. tergospinosum</i> 2	0,14092	0,13038	0,13038	0,13038	0,13278	0,13277
<i>S. tergospinosum</i> 3	0,14092	0,13038	0,13038	0,13038	0,13278	0,13277
<i>S. tergospinosum</i> 4	0,14092	0,13038	0,13038	0,13038	0,13278	0,13277
<i>S. guaporense</i> 1	0,12750	0,17208	0,17208	0,17208	0,16732	0,16246
<i>S. guaporense</i> 2	0,13651	0,17671	0,17671	0,17671	0,17191	0,16704
<i>S. guaporense</i> 3	0,12750	0,17208	0,17208	0,17208	0,16732	0,16246
<i>S. guaporense</i> 4	0,12523	0,16962	0,16962	0,16962	0,16487	0,16003
<i>S. brevifurcatum</i> 1	0,13639	0,14350	0,14350	0,14350	0,15049	0,14578
<i>S. brevifurcatum</i> 2	0,13871	0,14353	0,14353	0,14353	0,15051	0,14581
<i>S. brevifurcatum</i> 3	0,13639	0,14350	0,14350	0,14350	0,15049	0,14578
<i>S. brevifurcatum</i> 4	0,13472	0,14201	0,14201	0,14201	0,14895	0,14423
<i>S. inaequale</i> 1	0,17151	0,15508	0,15508	0,15508	0,16700	0,16699

Anexo 2: Continuação.

	<i>S. goeldii</i> 1	<i>S. goeldii</i> 2	<i>S. goeldii</i> 3	<i>S. ulyssesi</i> 1	<i>S. ulyssesi</i> 2	<i>S. ulyssesi</i> 3
<i>S. goeldii</i> 1	-					
<i>S. goeldii</i> 2	0,00000	-				
<i>S. goeldii</i> 3	0,00000	0,00000	-			
<i>S. ulyssesi</i> 1	0,02319	0,02315	0,02315	-		
<i>S. ulyssesi</i> 2	0,02313	0,02309	0,02309	0,00000	-	
<i>S. ulyssesi</i> 3	0,01924	0,01920	0,01920	0,00766	0,00760	-
<i>S. ulyssesi</i> 4	0,01924	0,01920	0,01920	0,00766	0,00760	0,00000
<i>S. daltanhani</i> 1	0,13096	0,13068	0,13068	0,12667	0,12604	0,12845
<i>S. daltanhani</i> 2	0,13096	0,13068	0,13068	0,12667	0,12604	0,12845
<i>S. daltanhani</i> 3	0,13316	0,13288	0,13288	0,12889	0,12823	0,13065
<i>S. daltanhani</i> 4	0,13554	0,13524	0,13524	0,13120	0,13057	0,13299
<i>S. daltanhani</i> 5	0,13096	0,13068	0,13068	0,12667	0,12604	0,12845
<i>Simulium</i> sp. 'A' 1	0,09968	0,09950	0,09950	0,09338	0,09287	0,09295
<i>Simulium</i> sp. 'A' 2	0,09968	0,09950	0,09950	0,09338	0,09287	0,09295
<i>Simulium</i> sp. 'A' 3	0,09745	0,09728	0,09728	0,09118	0,09067	0,09076
<i>Simulium</i> sp. 'A' 4	0,09968	0,09950	0,09950	0,09338	0,09287	0,09295
<i>Simulium</i> sp. 'A' 5	0,10191	0,10173	0,10173	0,09559	0,09507	0,09515
<i>S. oyapockense</i> 1	0,14197	0,14156	0,14156	0,13333	0,13245	0,13730
<i>S. oyapockense</i> 2	0,14197	0,14156	0,14156	0,13333	0,13245	0,13730
<i>S. oyapockense</i> 3	0,14668	0,14626	0,14626	0,13795	0,13709	0,14196
<i>S. oyapockense</i> 4	0,14668	0,14626	0,14626	0,13795	0,13709	0,14196
<i>S. oyapockense</i> 5	0,14668	0,14626	0,14626	0,13795	0,13709	0,14196
<i>S. oyapockense</i> 'S.G.' 1	0,14666	0,14626	0,14626	0,13791	0,13706	0,14193
<i>S. oyapockense</i> 'S.G.' 2	0,15114	0,15073	0,15073	0,14230	0,14147	0,14634
<i>S. oyapockense</i> 'S.G.' 3	0,14657	0,14617	0,14617	0,13782	0,13697	0,14183
<i>S. oyapockense</i> 'S.G.' 4	0,14657	0,14617	0,14617	0,13782	0,13697	0,14183
<i>S. minusculum</i> 1	0,13059	0,13033	0,13033	0,12651	0,12571	0,13050
<i>S. minusculum</i> 2	0,13059	0,13033	0,13033	0,12651	0,12571	0,13050
<i>S. minusculum</i> 3	0,13059	0,13033	0,13033	0,12651	0,12571	0,13050
<i>S. minusculum</i> 4	0,13059	0,13033	0,13033	0,12651	0,12571	0,13050
<i>S. minusculum</i> 5	0,13059	0,13033	0,13033	0,12651	0,12571	0,13050
<i>S. auristriatum</i> 1	0,13016	0,12992	0,12992	0,13042	0,12968	0,13000
<i>S. auristriatum</i> 2	0,13016	0,12992	0,12992	0,13042	0,12968	0,13000
<i>S. auristriatum</i> 3	0,13016	0,12992	0,12992	0,13042	0,12968	0,13000
<i>S. auristriatum</i> 4	0,13016	0,12992	0,12992	0,13042	0,12968	0,13000
<i>S. tergospinosum</i> 1	0,15871	0,15838	0,15838	0,15923	0,15862	0,16613
<i>S. tergospinosum</i> 2	0,15172	0,15140	0,15140	0,15224	0,15164	0,15908
<i>S. tergospinosum</i> 3	0,15172	0,15140	0,15140	0,15224	0,15164	0,15908
<i>S. tergospinosum</i> 4	0,15172	0,15140	0,15140	0,15224	0,15164	0,15908
<i>S. guaporense</i> 1	0,16291	0,16241	0,16241	0,16326	0,16243	0,16502
<i>S. guaporense</i> 2	0,16750	0,16700	0,16700	0,16788	0,16701	0,16963
<i>S. guaporense</i> 3	0,16291	0,16241	0,16241	0,16326	0,16243	0,16502
<i>S. guaporense</i> 4	0,16048	0,15998	0,15998	0,16083	0,16000	0,16258
<i>S. brevifurcatum</i> 1	0,13321	0,13296	0,13296	0,13115	0,13037	0,13072
<i>S. brevifurcatum</i> 2	0,13558	0,13533	0,13533	0,13349	0,13272	0,13307
<i>S. brevifurcatum</i> 3	0,13321	0,13296	0,13296	0,13115	0,13037	0,13072
<i>S. brevifurcatum</i> 4	0,13170	0,13145	0,13145	0,12970	0,12892	0,12926
<i>S. inaequale</i> 1	0,15854	0,15819	0,15819	0,16597	0,16518	0,16558

Anexo 2: Continuação.

	<i>S. ulyssesi</i> 4	<i>S. daltanhani</i> 1	<i>S. daltanhani</i> 2	<i>S. daltanhani</i> 3	<i>S. daltanhani</i> 4	<i>S. daltanhani</i> 5
<i>S. ulyssesi</i> 4	-					
<i>S. daltanhani</i> 1	0,12845	-				
<i>S. daltanhani</i> 2	0,12845	0,00000	-			
<i>S. daltanhani</i> 3	0,13065	0,00188	0,00188	-		
<i>S. daltanhani</i> 4	0,13299	0,00377	0,00377	0,00566	-	
<i>S. daltanhani</i> 5	0,12845	0,00000	0,00000	0,00188	0,00377	-
<i>Simulium</i> sp. 'A' 1	0,09295	0,13938	0,13938	0,14161	0,14399	0,13938
<i>Simulium</i> sp. 'A' 2	0,09295	0,14174	0,14174	0,14398	0,14637	0,14174
<i>Simulium</i> sp. 'A' 3	0,09076	0,13938	0,13938	0,14161	0,14399	0,13938
<i>Simulium</i> sp. 'A' 4	0,09295	0,14174	0,14174	0,14398	0,14637	0,14174
<i>Simulium</i> sp. 'A' 5	0,09515	0,14413	0,14413	0,14637	0,14877	0,14413
<i>S. oyapockense</i> 1	0,13730	0,11372	0,11372	0,11592	0,11812	0,11372
<i>S. oyapockense</i> 2	0,13730	0,11372	0,11372	0,11592	0,11812	0,11372
<i>S. oyapockense</i> 3	0,14196	0,11373	0,11373	0,11593	0,11813	0,11373
<i>S. oyapockense</i> 4	0,14196	0,11373	0,11373	0,11593	0,11813	0,11373
<i>S. oyapockense</i> 5	0,14196	0,11373	0,11373	0,11593	0,11813	0,11373
<i>S. oyapockense</i> 'S.G.' 1	0,14193	0,12268	0,12268	0,12491	0,12715	0,12268
<i>S. oyapockense</i> 'S.G.' 2	0,14634	0,13157	0,13157	0,13381	0,13608	0,13157
<i>S. oyapockense</i> 'S.G.' 3	0,14183	0,12267	0,12267	0,12488	0,12713	0,12267
<i>S. oyapockense</i> 'S.G.' 4	0,14183	0,12267	0,12267	0,12488	0,12713	0,12267
<i>S. minusculum</i> 1	0,13050	0,15347	0,15347	0,15575	0,15817	0,15347
<i>S. minusculum</i> 2	0,13050	0,15347	0,15347	0,15575	0,15817	0,15347
<i>S. minusculum</i> 3	0,13050	0,15347	0,15347	0,15575	0,15817	0,15347
<i>S. minusculum</i> 4	0,13050	0,15347	0,15347	0,15575	0,15817	0,15347
<i>S. minusculum</i> 5	0,13050	0,15347	0,15347	0,15575	0,15817	0,15347
<i>S. auristriatum</i> 1	0,13000	0,16120	0,16120	0,16345	0,16603	0,16120
<i>S. auristriatum</i> 2	0,13000	0,16120	0,16120	0,16345	0,16603	0,16120
<i>S. auristriatum</i> 3	0,13000	0,16120	0,16120	0,16345	0,16603	0,16120
<i>S. auristriatum</i> 4	0,13000	0,16120	0,16120	0,16345	0,16603	0,16120
<i>S. tergospinosum</i> 1	0,16613	0,14601	0,14601	0,14829	0,15064	0,14601
<i>S. tergospinosum</i> 2	0,15908	0,13914	0,13914	0,14139	0,14372	0,13914
<i>S. tergospinosum</i> 3	0,15908	0,13914	0,13914	0,14139	0,14372	0,13914
<i>S. tergospinosum</i> 4	0,15908	0,13914	0,13914	0,14139	0,14372	0,13914
<i>S. guaporense</i> 1	0,16502	0,15774	0,15774	0,16003	0,16029	0,15774
<i>S. guaporense</i> 2	0,16963	0,16717	0,16717	0,16949	0,16975	0,16717
<i>S. guaporense</i> 3	0,16502	0,15774	0,15774	0,16003	0,16029	0,15774
<i>S. guaporense</i> 4	0,16258	0,15531	0,15531	0,15759	0,15784	0,15531
<i>S. brevifurcatum</i> 1	0,13072	0,14251	0,14251	0,14474	0,14717	0,14251
<i>S. brevifurcatum</i> 2	0,13307	0,14494	0,14494	0,14718	0,14962	0,14494
<i>S. brevifurcatum</i> 3	0,13072	0,14251	0,14251	0,14474	0,14717	0,14251
<i>S. brevifurcatum</i> 4	0,12926	0,14345	0,14345	0,14569	0,14813	0,14345
<i>S. inaequale</i> 1	0,16558	0,16986	0,16986	0,17219	0,17465	0,16986

Anexo 2: Continuação.

	<i>Simulium</i> sp. 'A' 1	<i>Simulium</i> sp. 'A' 2	<i>Simulium</i> sp. 'A' 3	<i>Simulium</i> sp. 'A' 4	<i>Simulium</i> sp. 'A' 5	<i>S. oyapockense</i> 1
<i>Simulium</i> sp. 'A' 1	-					
<i>Simulium</i> sp. 'A' 2	0,00760	-				
<i>Simulium</i> sp. 'A' 3	0,00569	0,00189	-			
<i>Simulium</i> sp. 'A' 4	0,00760	0,00000	0,00189	-		
<i>Simulium</i> sp. 'A' 5	0,00952	0,00189	0,00379	0,00189	-	
<i>S. oyapockense</i> 1	0,11441	0,11440	0,11217	0,11440	0,11664	-
<i>S. oyapockense</i> 2	0,11441	0,11440	0,11217	0,11440	0,11664	0,00000
<i>S. oyapockense</i> 3	0,11666	0,11665	0,11442	0,11665	0,11891	0,00569
<i>S. oyapockense</i> 4	0,11666	0,11665	0,11442	0,11665	0,11891	0,00569
<i>S. oyapockense</i> 5	0,11666	0,11665	0,11442	0,11665	0,11891	0,00569
<i>S. oyapockense</i> 'S.G.' 1	0,12115	0,12572	0,12344	0,12572	0,12342	0,03098
<i>S. oyapockense</i> 'S.G.' 2	0,12550	0,13011	0,12781	0,13011	0,12780	0,03884
<i>S. oyapockense</i> 'S.G.' 3	0,12108	0,12567	0,12338	0,12567	0,12336	0,03103
<i>S. oyapockense</i> 'S.G.' 4	0,12108	0,12567	0,12338	0,12567	0,12336	0,03103
<i>S. minusculum</i> 1	0,13721	0,14190	0,13955	0,14190	0,14190	0,12562
<i>S. minusculum</i> 2	0,13721	0,14190	0,13955	0,14190	0,14190	0,12562
<i>S. minusculum</i> 3	0,13721	0,14190	0,13955	0,14190	0,14190	0,12562
<i>S. minusculum</i> 4	0,13721	0,14190	0,13955	0,14190	0,14190	0,12562
<i>S. minusculum</i> 5	0,13721	0,14190	0,13955	0,14190	0,14190	0,12562
<i>S. auristriatum</i> 1	0,11658	0,11896	0,12123	0,11896	0,12123	0,14190
<i>S. auristriatum</i> 2	0,11658	0,11896	0,12123	0,11896	0,12123	0,14190
<i>S. auristriatum</i> 3	0,11658	0,11896	0,12123	0,11896	0,12123	0,14190
<i>S. auristriatum</i> 4	0,11658	0,11896	0,12123	0,11896	0,12123	0,14190
<i>S. tergo-spinosum</i> 1	0,14206	0,14208	0,13972	0,14208	0,14208	0,10576
<i>S. tergo-spinosum</i> 2	0,13523	0,13525	0,13291	0,13525	0,13525	0,09926
<i>S. tergo-spinosum</i> 3	0,13523	0,13525	0,13291	0,13525	0,13525	0,09926
<i>S. tergo-spinosum</i> 4	0,13523	0,13525	0,13291	0,13525	0,13525	0,09926
<i>S. guaporense</i> 1	0,15550	0,15550	0,15310	0,15550	0,15790	0,12353
<i>S. guaporense</i> 2	0,15542	0,15542	0,15303	0,15542	0,15782	0,12810
<i>S. guaporense</i> 3	0,15550	0,15550	0,15310	0,15550	0,15790	0,12353
<i>S. guaporense</i> 4	0,15309	0,15309	0,15071	0,15309	0,15548	0,12123
<i>S. brevifurcatum</i> 1	0,10357	0,10135	0,10357	0,10135	0,10356	0,12159
<i>S. brevifurcatum</i> 2	0,10582	0,10359	0,10582	0,10359	0,10581	0,12391
<i>S. brevifurcatum</i> 3	0,10357	0,10135	0,10357	0,10135	0,10356	0,12159
<i>S. brevifurcatum</i> 4	0,10195	0,09970	0,10193	0,09970	0,10193	0,11997
<i>S. inaequale</i> 1	0,15325	0,15805	0,15564	0,15805	0,15805	0,16996

Anexo 2: Continuação.

	<i>S. oyapockense</i> 2	<i>S. oyapockense</i> 3	<i>S. oyapockense</i> 4	<i>S. oyapockense</i> 5	<i>S. oyapockense</i> 'S.G.' 1	<i>S. oyapockense</i> 'S.G.' 2
<i>S. oyapockense</i> 2	-					
<i>S. oyapockense</i> 3	0,00569	-				
<i>S. oyapockense</i> 4	0,00569	0,00000	-			
<i>S. oyapockense</i> 5	0,00569	0,00000	0,00000	-		
<i>S. oyapockense</i> 'S.G.' 1	0,03098	0,03298	0,03298	0,03298	-	
<i>S. oyapockense</i> 'S.G.' 2	0,03884	0,04088	0,04088	0,04088	0,00948	-
<i>S. oyapockense</i> 'S.G.' 3	0,03103	0,03303	0,03303	0,03303	0,00000	0,00758
<i>S. oyapockense</i> 'S.G.' 4	0,03103	0,03303	0,03303	0,03303	0,00000	0,00758
<i>S. minusculum</i> 1	0,12562	0,12786	0,12786	0,12786	0,13695	0,14132
<i>S. minusculum</i> 2	0,12562	0,12786	0,12786	0,12786	0,13695	0,14132
<i>S. minusculum</i> 3	0,12562	0,12786	0,12786	0,12786	0,13695	0,14132
<i>S. minusculum</i> 4	0,12562	0,12786	0,12786	0,12786	0,13695	0,14132
<i>S. minusculum</i> 5	0,12562	0,12786	0,12786	0,12786	0,13695	0,14132
<i>S. auristriatum</i> 1	0,14190	0,14192	0,14192	0,14192	0,13967	0,14853
<i>S. auristriatum</i> 2	0,14190	0,14192	0,14192	0,14192	0,13967	0,14853
<i>S. auristriatum</i> 3	0,14190	0,14192	0,14192	0,14192	0,13967	0,14853
<i>S. auristriatum</i> 4	0,14190	0,14192	0,14192	0,14192	0,13967	0,14853
<i>S. tergospinosum</i> 1	0,10576	0,10574	0,10574	0,10574	0,10821	0,11678
<i>S. tergospinosum</i> 2	0,09926	0,09924	0,09924	0,09924	0,10168	0,11018
<i>S. tergospinosum</i> 3	0,09926	0,09924	0,09924	0,09924	0,10168	0,11018
<i>S. tergospinosum</i> 4	0,09926	0,09924	0,09924	0,09924	0,10168	0,11018
<i>S. guaporense</i> 1	0,12353	0,12813	0,12813	0,12813	0,13264	0,14179
<i>S. guaporense</i> 2	0,12810	0,13272	0,13272	0,13272	0,13726	0,14642
<i>S. guaporense</i> 3	0,12353	0,12813	0,12813	0,12813	0,13264	0,14179
<i>S. guaporense</i> 4	0,12123	0,12581	0,12581	0,12581	0,13030	0,13945
<i>S. brevifurcatum</i> 1	0,12159	0,12388	0,12388	0,12388	0,13323	0,14224
<i>S. brevifurcatum</i> 2	0,12391	0,12621	0,12621	0,12621	0,13561	0,14463
<i>S. brevifurcatum</i> 3	0,12159	0,12388	0,12388	0,12388	0,13323	0,14224
<i>S. brevifurcatum</i> 4	0,11997	0,12221	0,12221	0,12221	0,13173	0,14074
<i>S. inaequale</i> 1	0,16996	0,16751	0,16751	0,16751	0,16742	0,17676

Anexo 2: Continuação.

	<i>S. oyapockense</i> 'S.G.' 3	<i>S. oyapockense</i> 'S.G.' 4	<i>S. minusculum</i> 1	<i>S. minusculum</i> 2	<i>S. minusculum</i> 3	<i>S. minusculum</i> 4
<i>S. oyapockense</i> 'S.G.' 3	-					
<i>S. oyapockense</i> 'S.G.' 4	0,00000	-				
<i>S. minusculum</i> 1	0,13685	0,13685	-			
<i>S. minusculum</i> 2	0,13685	0,13685	0,00000	-		
<i>S. minusculum</i> 3	0,13685	0,13685	0,00000	0,00000	-	
<i>S. minusculum</i> 4	0,13685	0,13685	0,00000	0,00000	0,00000	-
<i>S. minusculum</i> 5	0,13685	0,13685	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000
<i>S. auristriatum</i> 1	0,13960	0,13960	0,15254	0,15254	0,15254	0,15254
<i>S. auristriatum</i> 2	0,13960	0,13960	0,15254	0,15254	0,15254	0,15254
<i>S. auristriatum</i> 3	0,13960	0,13960	0,15254	0,15254	0,15254	0,15254
<i>S. auristriatum</i> 4	0,13960	0,13960	0,15254	0,15254	0,15254	0,15254
<i>S. tergospinosum</i> 1	0,10815	0,10815	0,13742	0,13742	0,13742	0,13742
<i>S. tergospinosum</i> 2	0,10162	0,10162	0,13063	0,13063	0,13063	0,13063
<i>S. tergospinosum</i> 3	0,10162	0,10162	0,13063	0,13063	0,13063	0,13063
<i>S. tergospinosum</i> 4	0,10162	0,10162	0,13063	0,13063	0,13063	0,13063
<i>S. guaporense</i> 1	0,13271	0,13271	0,16739	0,16739	0,16739	0,16739
<i>S. guaporense</i> 2	0,13730	0,13730	0,16729	0,16729	0,16729	0,16729
<i>S. guaporense</i> 3	0,13271	0,13271	0,16739	0,16739	0,16739	0,16739
<i>S. guaporense</i> 4	0,13038	0,13038	0,16498	0,16498	0,16498	0,16498
<i>S. brevifurcatum</i> 1	0,13324	0,13324	0,14414	0,14414	0,14414	0,14414
<i>S. brevifurcatum</i> 2	0,13561	0,13561	0,14653	0,14653	0,14653	0,14653
<i>S. brevifurcatum</i> 3	0,13324	0,13324	0,14414	0,14414	0,14414	0,14414
<i>S. brevifurcatum</i> 4	0,13173	0,13173	0,14264	0,14264	0,14264	0,14264
<i>S. inaequale</i> 1	0,16730	0,16730	0,17200	0,17200	0,17200	0,17200

	<i>S. minusculum</i> 5	<i>S. auristriatum</i> 1	<i>S. auristriatum</i> 2	<i>S. auristriatum</i> 3	<i>S. auristriatum</i> 4	<i>S. tergospinosum</i> 1
<i>S. minusculum</i> 5	-					
<i>S. auristriatum</i> 1	0,15254	-				
<i>S. auristriatum</i> 2	0,15254	0,00000	-			
<i>S. auristriatum</i> 3	0,15254	0,00000	0,00000	-		
<i>S. auristriatum</i> 4	0,15254	0,00000	0,00000	0,00000	-	
<i>S. tergospinosum</i> 1	0,13742	0,16481	0,16481	0,16481	0,16481	-
<i>S. tergospinosum</i> 2	0,13063	0,15772	0,15772	0,15772	0,15772	0,00569
<i>S. tergospinosum</i> 3	0,13063	0,15772	0,15772	0,15772	0,15772	0,00569
<i>S. tergospinosum</i> 4	0,13063	0,15772	0,15772	0,15772	0,15772	0,00569
<i>S. guaporense</i> 1	0,16739	0,17724	0,17724	0,17724	0,17724	0,16109
<i>S. guaporense</i> 2	0,16729	0,18164	0,18164	0,18164	0,18164	0,16098
<i>S. guaporense</i> 3	0,16739	0,17724	0,17724	0,17724	0,17724	0,16109
<i>S. guaporense</i> 4	0,16498	0,17475	0,17475	0,17475	0,17475	0,15865
<i>S. brevifurcatum</i> 1	0,14414	0,05371	0,05371	0,05371	0,05371	0,14908
<i>S. brevifurcatum</i> 2	0,14653	0,05153	0,05153	0,05153	0,05153	0,15148
<i>S. brevifurcatum</i> 3	0,14414	0,05371	0,05371	0,05371	0,05371	0,14908
<i>S. brevifurcatum</i> 4	0,14264	0,05416	0,05416	0,05416	0,05416	0,14760
<i>S. inaequale</i> 1	0,17200	0,15165	0,15165	0,15165	0,15165	0,15563

Anexo 2: Continuação.

	<i>S. tergo-spinosum</i> 2	<i>S. tergo-spinosum</i> 3	<i>S. tergo-spinosum</i> 4	<i>S. guaporense</i> 1	<i>S. guaporense</i> 2	<i>S. guaporense</i> 3
<i>S. tergo-spinosum</i> 2	-					
<i>S. tergo-spinosum</i> 3	0,00000	-				
<i>S. tergo-spinosum</i> 4	0,00000	0,00000	-			
<i>S. guaporense</i> 1	0,15406	0,15406	0,15406	-		
<i>S. guaporense</i> 2	0,15396	0,15396	0,15396	0,00760	-	
<i>S. guaporense</i> 3	0,15406	0,15406	0,15406	0,00000	0,00760	-
<i>S. guaporense</i> 4	0,15165	0,15165	0,15165	0,00189	0,00951	0,00189
<i>S. brevifurcatum</i> 1	0,14217	0,14217	0,14217	0,15330	0,15779	0,15330
<i>S. brevifurcatum</i> 2	0,14455	0,14455	0,14455	0,15571	0,16021	0,15571
<i>S. brevifurcatum</i> 3	0,14217	0,14217	0,14217	0,15330	0,15779	0,15330
<i>S. brevifurcatum</i> 4	0,14068	0,14068	0,14068	0,15157	0,15608	0,15157
<i>S. inaequale</i> 1	0,14868	0,14868	0,14868	0,18764	0,18750	0,18764

	<i>S. guaporense</i> 4	<i>S. brevifurcatum</i> 1	<i>S. brevifurcatum</i> 2	<i>S. brevifurcatum</i> 3	<i>S. brevifurcatum</i> 4	<i>S. inaequale</i> 1
<i>S. guaporense</i> 4	-					
<i>S. brevifurcatum</i> 1	0,15091	-				
<i>S. brevifurcatum</i> 2	0,15331	0,00189	-			
<i>S. brevifurcatum</i> 3	0,15091	0,00000	0,00189	-		
<i>S. brevifurcatum</i> 4	0,14916	0,00000	0,00191	0,00000	-	
<i>S. inaequale</i> 1	0,18510	0,15049	0,14811	0,15049	0,14900	-