

**Universidade do Estado do Amazonas  
Escola Normal Superior**

**História Evolutiva de *Scoloplax empousa* Schaefer, Weitzman & Britski,  
1989 (Siluriformes: Scoloplacidae)**

**Manaus – AM  
2019**

**Universidade do Estado do Amazonas  
Escola Normal Superior**

Fernando Sanches dos Santos Martins

**História Evolutiva de *Scoloplax empousa* Schaefer, Weitzman & Britski,  
1989 (Siluriformes: Scoloplacidae)**

Orientador: Dr. Marcelo Salles Rocha

Trabalho de Conclusão Curso de Licenciatura  
em Ciências Biológicas na Universidade do  
Estado do Amazonas, como requisito para  
obtenção de título de Licenciado em Ciências  
Biológicas

**Manaus – AM  
2019**

### Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).  
**Sistema Integrado de Bibliotecas da Universidade do Estado do Amazonas.**

M386h Martins, Fernando Sanches dos  
História Evolutiva de Scoloplax empousa Schaefer,  
Weitzman & Britski, 1989 (Siluriformes: Scoloplacidae) /  
Fernando Sanches dos Martins. Manaus : [s.n], 2019.  
31 f.: color.; 21 cm.

TCC - Graduação em Ciências Biológicas - Licenciatura  
- Universidade do Estado do Amazonas, Manaus, 2019.  
Inclui bibliografia  
Orientador: Rocha, Marcelo Salles

1. Biogeografia. 2. Scoloplax. 3. Ictiofauna. I.  
Rocha, Marcelo Salles (Orient.). II. Universidade do  
Estado do Amazonas. III. História Evolutiva de Scoloplax  
empousa Schaefer, Weitzman & Britski, 1989  
(Siluriformes: Scoloplacidae)

**Elaborado por Jeane Macelino Galves - CRB-11/463**

**Fernando Sanches dos Santos Martins**

**História Evolutiva de *Scoloplax empousa* Schaefer, Weitzman & Britski,  
1989 (Siluriformes: Scoloplacidae)**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao curso de Licenciatura em Ciências Biológicas da Universidade Estadual do Amazonas como requisito para obtenção de título de Licenciado em Ciências Biológicas

Aprovado em \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

**BANCA EXAMINADORA**

---

Dr. Marcelo Salles Rocha

---

Dra. Cristina Motta Buhrnheim

---

Dra. Valéria Nogueira Machado

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço em primeiro lugar a Deus por todas as forças que me proporcionou nos momentos mais difíceis e por ser meu companheiro nos momentos em que estava sozinho.

Aos meus pais que sempre me incentivaram para que eu fosse maior e melhor do que o mundo dizia que eu era.

Também aos amigos que estiveram do meu lado dando suporte e me ensinando a como ser melhor nos últimos cinco anos de graduação, em especial, Jackeline Damasceno, Thais Mayumi, Karina Oliveira e Matheus Raiol.

Ao meu orientador, pelo tempo, atenção e dedicação ao ensinar e ajudar a concluir a pesquisa

## RESUMO

Os estudos biogeográficos com a ictiofauna neotropical são escassos, visto isso pesquisas para dada área da ciência são bem-vindas. A análise de diversos métodos de delimitação foi utilizada para buscar a melhor compreensão da espécie *Scoloplax empousa* e sua distribuição nas Bacias do Alto Paraná e Paraguai. Abordagens taxonômicas moleculares como o DNA *Barcode*, vem sendo utilizadas com sucesso nos mais variados níveis e grupos taxonômicos, promovendo a descoberta de espécies crípticas, a resolução da variação morfológica e a explicação das ambiguidades dentro de um grupo taxonômico. Essa abordagem é importante para a determinação de faunas pouco conhecidas, como é o caso da espécie *Scoloplax empousa* e o gênero *Scoloplax* no geral. Estudos com *DNA Barcode* se mostraram muito eficientes em delimitar dois grupos identificados morfológicamente como *S. empousa* coincidentemente nas regiões isoladas de tais bacias. Processos biogeográficos como barreiras vicariantes foram considerados para explicar tal divergência genética entre as duas populações, ainda usando como comparativo o grupo taxonômico irmão *S. distolothrix*.

**Palavras-chave:** Barcode, Vicariância, Ictiofauna

## ABSTRACT

Biogeographic studies with neotropical ichthyofauna are scarce, since research for a given area of science is welcome. The analysis of several delimitation methods was used to better understand the species *Scoloplax empousa* and its distribution in the Upper Paraná and Paraguay Basins. Molecular taxonomic approaches such as *Barcode DNA* have been successfully used in various taxonomic levels and groups, promoting the discovery of cryptic species, the resolution of morphological variation and the explanation of ambiguities within a taxonomic group. This approach is important for the determination of poorly known faunas, such as the *Scoloplax empousa* species and the genus *Scoloplax* in general. Studies with *Barcode DNA* proved to be very efficient in delimiting two morphologically identified groups as *S. empousa* coincidentally in the isolated regions of such basins. Biogeographic processes such as vicarious barriers were considered to explain such genetic divergence between the two populations, still using as comparative the brother taxonomic group *S. distolothrix*.

**Keyword:** Barcode, Vicariance, Ichthyofauna

## LISTAS DE FIGURAS

|  |    |
|--|----|
| Figura 1 - Mapa de distribuição de <i>Scoloplax empousa</i> e seu grupo taxonômico irmão <i>Scoloplax distolothrix</i> .....   | 14 |
| Figura 2 - Árvore filogenética de inferência bayesiana construída com o uso de sequências concatenadas de COI e 16s, barras coloridas indicam as OTU's delimitadas pelos testes ABGD, PTP e GMYC, respectivamente..... | 17 |

## LISTAS DE TABELAS

Tabela 1 - Distância genética de Kimura 2- Parâmetros interespecífica (coluna abaixo da diagonal) e intraespecífica (linha na diagonal) dos grupos de *S. empousa* (Bacia do Alto Paraguai e Bacia do Paraná) delimitados pelos testes ..... 18

Tabela 2 - Distância genética de Kimura 2- Parâmetros interespecífica (coluna abaixo da diagonal) e intraespecífica (linha na diagonal) dos grupos de *S. empousa* (Bacia do Alto Paraguai e Bacia do Paraná) e dos grupos de *S. distolothrix* (Bacia do Baixo e Alto Xingu) ..... 19

## LISTAS DE SIGLAS E ABREVIações

**PTP** - *Poisson Tree Processes*

**GMYC** - *General Mixed Yule Coalescent*

**ML** - Máxima verossimilhança

**IB** - Inferência Bayesiana

**K2P** - Kimura 2 - Parâmetros

**COI** - Subunidade 1 da Citocromo c Oxidase

**ABDG** - *Automatic Barcode Gap Discovery*

**CBOL** - *Consortium for the Barcodes of Life*

**OTU** - *Operational Taxonomic Unit*

**PEG** - Polietilenoglicol

**ESS** - *Effective sampling size*

**Ma** – Milhões de anos

## SUMÁRIO

|   |    |
|---|----|
| 1. INTRODUÇÃO.....                      | 11 |
| 2. OBJETIVO GERAL .....                 | 15 |
| 2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....         | 15 |
| 3. MATERIAL E MÉTODOS .....             | 15 |
| 3.1 AMOSTRAGEM .....                    | 15 |
| 3.2 EXTRAÇÃO E AMPLIFICAÇÃO DE DNA..... | 16 |
| 3.3 RECONSTRUÇÃO FILOGENÉTICA.....      | 17 |
| 3.4 DATAÇÃO MOLECULAR .....             | 18 |
| 4. RESULTADOS .....                     | 19 |
| 5. DISCUSSÃO.....                       | 21 |
| 6. CONCLUSÃO.....                       | 23 |
| 7. REFERÊNCIAS.....                     | 23 |

## 1. INTRODUÇÃO

Segundo Neil et al. (2006) a Amazônia é caracterizada por ser a maior floresta tropical, possuindo também a maior drenagem do mundo. Seu território se estende por nove países, sendo 63% de sua totalidade em território nacional brasileiro, e os 37% restantes nos países arredores ao Brasil. Não somente seu território é extenso como também sua bacia hidrográfica, que constituída por rios de diferentes classificações, que lhe garantem a definição de maior bacia de drenagem do mundo. Um dos grandes destaques da Amazônia é sua grande diversidade de espécies de vertebrados (SILVA et al., 2005).

Segundo o Ministério do Meio Ambiente (2006) a região hidrográfica amazônica representa aproximadamente 40% do território brasileiro e estima-se que ela seja portadora de mais de 60% de toda a disponibilidade hídrica do país. A hidrografia da região amazônica apresenta, além do curso principal, o rio Solimões/Amazonas, além de cursos de águas que complementam essa bacia de drenagem. Dessa forma um grande e denso conjunto de rios e cursos de água de menor porte, extensão e volume, constituem uma rede que banha o Amazonas. De acordo com Vari & Malabarba (1998) estima-se que a região hidrográfica neotropical possua 8000 espécies de peixes se caracteriza como 25% da diversidade de peixes existentes no mundo.

Essa vasta distribuição hidrográfica abriga 43 famílias endêmicas de peixes, ainda apresentando uma grande variedade de espécies de vertebrados com características diferenciadas e histórias de distribuições geográficas distintas. Atualmente diversas pesquisas buscam inferir como determinadas espécies se distribuíram na bacia hidrográfica amazônica com a influência de fatores históricos e geográficos, tendo em vista que a Bacia Amazônica se encontra em formação ainda atualmente.

Dentre as 43 famílias endêmicas confirmadas por Reis et al. (2003) está a Scoloplacidae. Anteriormente foi considerada uma subfamília de Loricariidae (BAILEY & BASKIN, 1989), mas em estudos que aconteceram na década de 80 à mesma foi elevada ao nível de família (SCHAEFER, 2003). Atualmente a família é composta por seis espécies, todas pertencentes ao gênero *Scoloplax*, sendo um grupo endêmico da região neotropical, esse grupo também ocorre

em tributários da bacia amazônica, Paraná e Paraguai, não sendo encontrados na bacia do São Francisco. Os mesmos habitam pequenos cursos de águas de fundos com folhas e galhos. (SCHAEFER et al., 1989; SCHAEFER, 1990; SCHAEFER, 2003; ROCHA et al., 2008; DE OLIVEIRA et al., 2009).

As características anatômicas das seis espécies da família Scoloplacidae apresentam similaridades, sendo elas o tamanho reduzido, que pode variar em tamanho até 1,99 cm. As espécies deste gênero apresentam na região superior ao focinho uma placa com pequenos odontoides, também uma placa óssea bilateral na linha dorsal entre as nadadeiras dorsal e caudal, e por último outra série de placas ósseas entre as nadadeiras anal e caudal. (ROCHA et al., 2008).

Ainda, exemplares de *Scoloplax* podem ser caracterizados por possuírem barbilhão maxilar bem desenvolvido, podendo alcançar a inserção do espinho peitoral; barbilhões mentonianos na linha mediana situados logo posteriormente à sínfise mandibular, podendo ser um único par ou dois pares; e barbilhões mandibulares presentes ou ausentes, situados entre os barbilhões mentonianos e maxilares. Odontoides também estão presentes na cabeça, nadadeiras dorsal, peitoral e pélvica, e também nas placas ósseas (SCHAEFER, 2003; ROCHA et al., 2008).

A espécie em questão foi objeto de estudo para compreender a distribuição de uma espécie da família Scoloplacidae através de filogeografia. A espécie *Scoloplax empousa* se caracteriza segundo Sazima et. al (2000), como uma espécie que ocorre no Pantanal localizado na bacia do Paraguai, rio Ivinhema no alto Paraná e alto Guaporé na Bacia Amazônica. Embora sejam peixes, os grandes rios atuam como barreiras, restringindo sua distribuição. Um estudo conduzido por Schaefer (1990) o qual envolveu toda a superfamília Loricarioidea, mostra que as famílias Callichthyidae, Scoloplacidae, Astroblepidae e Loricariidae constituem um grupo monofilético e também indica que *Scoloplax empousa* é grupo irmão de *Scoloplax distolothrix*.

Com o uso da filogeografia que é o estudo dos princípios e processos que determinam a distribuição geográfica de linhagens genealógicas (AVISE e col., 1987) o estudo de *Scoloplax empousa* busca atribuir mais conhecimentos sobre os padrões de distribuição da espécie, através de análises filogenéticas

para discutir o tempo de divergência da espécie, assim comparando com o fator histórico de isolamento das bacias hidrográficas, e também determinar a distância genética entre as populações de *S. empousa*.

Estudos filogeográficos são abundantes, mas se mostram escassos para espécies de vertebrados aquáticos, contendo um número maior para espécies de vertebrados de terra firme. As teorias utilizadas para tais estudos são as de rios como barreiras apresentada por Wallace e as de refúgios pleistocênicos de Haffer (1969). Segundo Lundberg et al. (1998) os estudos filogeográficos para vertebrados aquáticos fazem uso de eventos históricos e mudanças geográficas como, por exemplo, a alteração do curso dos rios, as regressões e incursões marinhas, e os processos de drenagem e isolamento que foram pontos importantes para que as espécies da biota aquática fossem bem distribuídas e enriquecidas na região hidrográfica amazônica. Diante disso, estudos utilizando *DNA barcoding* têm sido amplamente utilizados para delimitação e resolução de complexo de espécies (DE CARVALHO et al., 2011; LARA et al., 2010; HEBERT & GREGORY, 2005; PEREIRA et al., 2013, 2011; VALDEZ-MORENO et al., 2009). O *DNA barcoding* corresponde ao gene mitocondrial da Subunidade 1 da Citocromo c Oxidase (COI). Esse gene é a principal ferramenta do projeto mundial *Consortium for the Barcodes of Life* (CBoL) para animais, funcionando como um código de barras individual (HEBERT et al., 2003).

As distâncias genéticas para o gene COI, foram testadas dentro dos valores percentuais de 1% e 3%, que são os mais comuns para estudos com a ictiofauna neotropical (LARA et al., 2010; PEREIRA et al., 2013, 2011). Ainda foram utilizados métodos que levam em conta teorias evolutivas como o *Automatic Barcode Gap Discovery* (ABDG) (PUILLANDRE et al., 2012), *General Mixed Yule Coalescent* (GMYC) (FUJISAWA & BARRACLOUGH, 2013; PONS et al., 2006) e o *Poisson Tree Processes* (PTP) (ZHANG et al., 2013). Esses dois últimos métodos fazem a combinação da teoria de coalescência com modelos de diversificação e como resultado geram limites que delimitam linhagens que evoluem independentemente, conhecidas como OTU's (*Operational Taxonomic Unit*) (FLOYD et al., 2002).

## 2. OBJETIVO GERAL

Determinar os padrões de distribuição biogeográfica e o tempo de divergência entre as populações de *Scoloplax empousa* da bacia do Paraná e do Paraguai e também entre a espécie e seu grupo irmão.

### 2.1 Objetivos Específicos

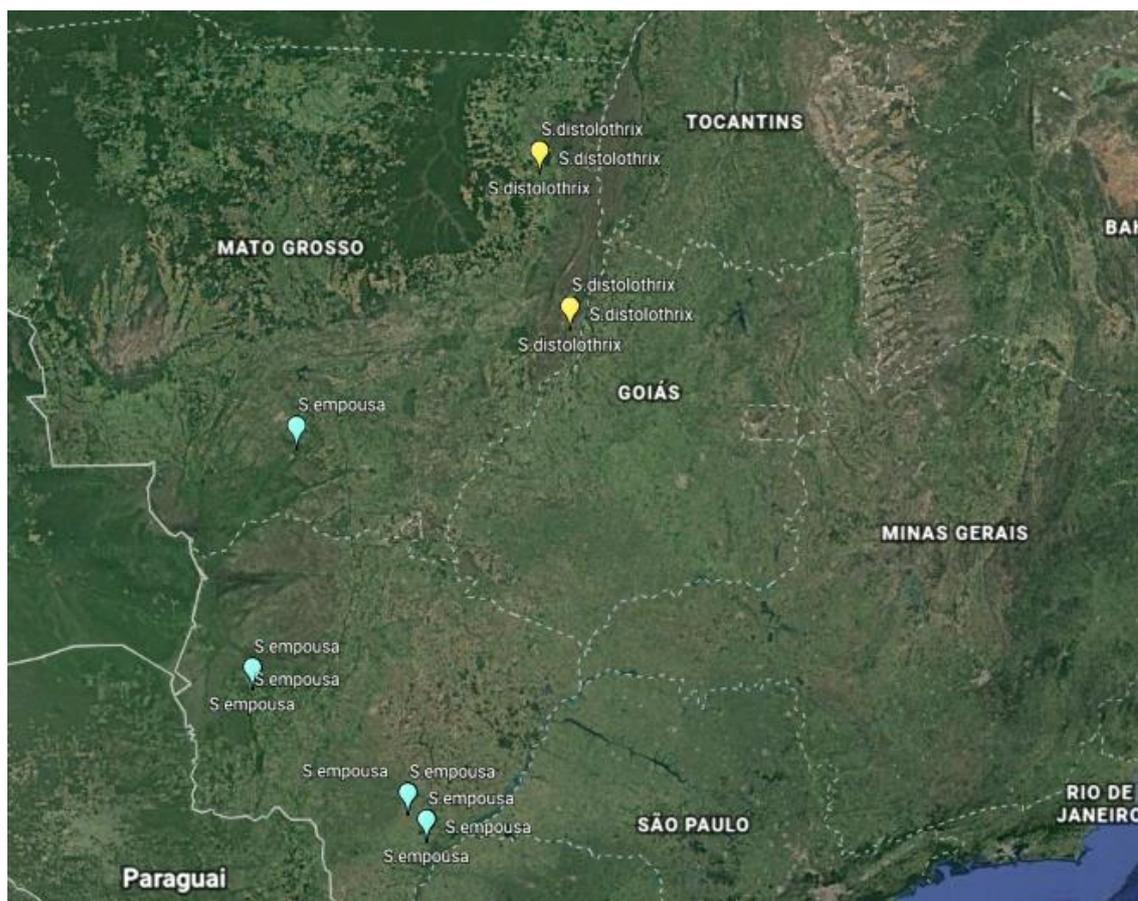
- Comparar as populações com uso de *barcode* para verificar se as mesmas podem ser discriminadas.
- Comparar o tempo de divergência das populações com o tempo de isolamento das bacias hidrográficas do Paraná e Paraguai.
- Estimar a distância genética das populações de *S. empousa*

## 3. MATERIAL E MÉTODOS

### 3.1 Amostragem

A distribuição atual de *Scoloplax empousa* corresponde ao Pantanal na bacia do rio Paraguai, rio Ivinhema no Alto rio Paraná e Alto rio Guaporé na Bacia Amazônica. Foram amostrados indivíduos de *S. empousa* dos rios Ivinhema, Miranda e Poconé (todos da bacia do rio Paraguai). Amostras de tecidos musculares foram cedidas do acervo da coleção zoológica do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia. No total foram analisados 11 indivíduos de *S. empousa* de 4 localidades (Fig. 1).

Figura 1 – Mapa de distribuição de *Scoloplex empoua* e seu grupo taxonômico irmão *S. distolothrix* nas bacias do Paraguai e Paraná.



Fonte: Google Earth – adaptado

Os procedimentos após a obtenção das amostras foram realizados seguindo os protocolos indicados pelo laboratório.

A amostragem também incluiu representantes de outras espécies de *Scoloplex* (*S. dicra*, *S. baskini*, *S. dolicholophia*, *S. distolothrix*) e outras espécies da ordem Siluriformes. Para efeito de comparação, espécies consideradas basais foram escolhidas como *outgroup* de todos os Siluriformes, a espécie *Diplomystes mesembrinus* foi utilizada como raiz para o *outgroup*.

### 3.2 Extração e amplificação de DNA

O DNA foi extraído do tecido dos espécimes com o kit comercial A1125 da marca Promega, seguindo as instruções do fabricante. A quantificação do DNA foi realizada por meio do gel de agarose. Os genes mitocondriais

amplificados por meio de reações de polimerase em cadeia foram COI e 16s, com primers específicos.

A amplificação foi realizada por meio de termociclador disponível no laboratório. A reação de amplificação foi realizada utilizando o protocolo utilizado para outros siluriformes. O resultado da amplificação foi visualizado em eletroforese em gel de agarose para comparação com tamanhos conhecidos de DNA *ladder* 100pb. A purificação dos produtos amplificados foi realizada com a utilização de polietilenoglicol (PEG) 8000 20%, seguindo os protocolos disponíveis. Para o sequenciamento houve a utilização do kit BigDye® Terminator 3.1, e o sequenciador 3130x da Applied Biosystems.

### 3.3 Reconstrução Filogenética

Após o sequenciamento as sequências foram editadas e alinhadas manualmente utilizando o algoritmo MUSCLE, adaptado ao software Aliview (LARSON, 2014). Todas as sequências foram analisadas e verificadas certificando de que todas seguiram o padrão de leitura correto e não incluíam códons de parada.

Após esse processo as sequencias referentes aos dois marcadores mitocondriais foram concatenadas em uma matriz única para as análises filogenéticas através do software Mega X (TAMURA et al., 2018).

Segundo Carstens et al. (2013) é recomendada a utilização de mais de um teste de delimitação de OTU's. Sendo assim três abordagens foram utilizadas para delimitar as possíveis OTU's, sendo essas ABGD, PTP e GMYC.

Os dois últimos métodos (PTP e GMYC) diferente do ABGD, necessitam da entrada de uma árvore filogenética para ajustarem os processos de especiação e de coalescência (TANG et al., 2014). Tais arvores necessárias para o input nos testes foram geradas por meio de métodos estatísticos de máxima verossimilhança (ML) (STAMATAKIS, 2006) e inferência bayesiana (IB) (HUELSENBECK, 2001).

Segundo Puillandre et al. (2012) o teste ABGD funciona agindo na identificação de clusters de sequencias de possíveis espécies, baseado em

pares de distancias genéticas e nas diferenças entre as variações intra e interespecíficas (*barcoding gap*).

O teste de ABGD é realizado online com o auxílio de um tutorial introdutório (<https://bioinfo.mnhn.fr/abi/public/abgd/abgdweb.html>) e seguindo a proposta de Puillandre et al. (2012) o modelo de substituição nucleotídica selecionado é Kimura 2 – parâmetros (K2P).

A análise de máxima verossimilhança (ML) foi feita no software MEGA X, utilizando o modelo de substituição nucleotídica GTR. A árvore resultado desta análise foi enraizada e utilizada para o teste PTP disponível no endereço <http://species.h-its.org/ptp/>. O teste PTP calcula o momento de transição entre eventos de especiação (entre espécies) e eventos de ramificação (dentro da espécie).

Com relação a árvore ultramétrica, a mesma foi construída com base no método estatístico de inferência bayesiana no programa Beauti v.1.10.4 (DRUMMOND et al., 2006), com as seguintes definições: Cadeias de MCMC para 10 milhões de gerações, com amostragem de árvores a cada 1000 gerações; Relógio molecular relaxado não correlacionado ou seja, permitem que cada ramo de uma árvore filogenética tenha sua própria taxa evolutiva (DRUMMOND et al., 2006). Após a escolha dos parâmetros no programa Beauti, um arquivo XML foi gerado e o mesmo foi inserido no programa BEAST v.1.10.4 (DRUMMOND et al., 2006) para a construção da árvore ultramétrica. A verificação da convergência das cadeias e o *effective sampling size* (ESS > 200) foi realizada no software Tracer v.1.5 (DRUMMOND & RAMBAUT, 2007).

A árvore resultante da análise no BEAST foi utilizada para o teste GMYC, que identifica o ponto de transição entre o processo de especiação (YULE, 1925) e coalescência (HUDSON, 1990).

As distâncias genéticas entre *Scoloplax empousa* e seu grupo irmão *Scoloplax distolothrix* foram calculadas utilizando o modelo de substituição K2P no programa Mega X.

### **3.4 Datação Molecular**

Para a obtenção de dados referentes ao tempo de divergência e dados que permitissem inferir os principais processos e eventos que moldaram a



A delimitação de OTU's pelos métodos de PTP e GMYC, foi efetuada com auxílio das árvores obtidas. Os resultados das análises de ABGD, PTP e GMYC são representados na Figura 2, junto do tempo de divergência estimado entre as espécies. Cada OTU que o GMYC definiu representou um grupo, que teve sua denominação relacionada com o nome da espécie, ou bacia hidrográfica a qual pertence. No total foram obtidos 26 grupos pelos testes. (Apêndice A)

Para visualizar as amostras específicas com as delimitações de OTU's checar o Apêndice B.

Todos os testes apontam dois grupos para a espécie *Scoloplax empousa*, com distâncias genéticas para o marcador mitocondrial COI de 0,4% a 11% (intraespecífica e interespecífica) que se agruparam com organizações diferentes, o primeiro grupo foi composto por indivíduos da bacia hidrográfica do alto Paraguai e o segundo com indivíduos da bacia hidrográfica do Paraná e os grupos restantes. (Tabela 1)

Tabela 1. Distância genética utilizando o marcador mitocondrial COI e o modelo Kimura 2-Parâmetros. Interespecífica (coluna abaixo da diagonal) e intraespecífica (linha na diagonal) dos grupos de *S. empousa* (Bacia do Alto Paraguai e Bacia do Paraná) delimitados pelos testes

|               | Alto Paraguai | Paraná | Paraná | Paraná | Paraná | Paraná |
|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|--------|--------|--------|--------|--------|
| Alto Paraguai |               |               |               |               |               |        |        |        |        |        |
| Alto Paraguai | 0,46%         |               |               |               |               |        |        |        |        |        |
| Alto Paraguai | 0,23%         | 0,23%         |               |               |               |        |        |        |        |        |
| Alto Paraguai | 0,46%         | 0,46%         | 0,23%         |               |               |        |        |        |        |        |
| Alto Paraguai | 0,23%         | 0,23%         | 0,00%         | 0,23%         |               |        |        |        |        |        |
| Paraná        | 11,76%        | 11,76%        | 11,42%        | 11,42%        | 11,42%        |        |        |        |        |        |
| Paraná        | 11,76%        | 11,76%        | 11,42%        | 11,42%        | 11,42%        | 0,00%  |        |        |        |        |
| Paraná        | 11,76%        | 11,76%        | 11,42%        | 11,42%        | 11,42%        | 0,00%  | 0,00%  |        |        |        |
| Paraná        | 11,76%        | 11,76%        | 11,42%        | 11,42%        | 11,42%        | 0,00%  | 0,00%  | 0,00%  |        |        |
| Paraná        | 11,76%        | 11,76%        | 11,42%        | 11,42%        | 11,42%        | 0,00%  | 0,00%  | 0,00%  | 0,00%  |        |
| Paraná        | 11,76%        | 11,76%        | 11,42%        | 11,42%        | 11,42%        | 0,00%  | 0,00%  | 0,00%  | 0,00%  | 0,00%  |

Fonte: Martins, 2019

Após o teste de distância genética K2P para os dois grupos de *S. empousa* feito com o marcador mitocondrial COI, foi realizado o mesmo teste com os dois grupos delimitados de *S. distolothrix*, com indivíduos do alto e baixo Xingu, também utilizando o marcador COI.

Onde os mesmos demonstraram distâncias genéticas interespecíficas entre o grupo de *S. distolothrix* do baixo e alto Xingu para com o grupo da Bacia do Alto Paraguai equivalentes a 8%. (Tabela 2)

Tabela 2. Distância genética com o marcador mitocondrial COI utilizando Kimura 2- Parâmetros. Interespecífica (coluna abaixo da diagonal) e intraespecífica (linha na diagonal) dos grupos de *S. empousa* (Bacia do Alto Paraguai e Bacia do Paraná) e dos grupos de *S. distolothrix* (Bacia do Baixo e Alto Xingu)

|                        | S. d         | S. e          | S. e         | S. e         | S. e         | S. e         |
|------------------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|---------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| <i>S. distolothrix</i> |              |              |              |              |              |              |              |              |              |              |               |              |              |              |              |
| <i>S. distolothrix</i> | <b>0,93%</b> |              |              |              |              |              |              |              |              |              |               |              |              |              |              |
| <i>S. distolothrix</i> | 0,23%        | <b>1,17%</b> |              |              |              |              |              |              |              |              |               |              |              |              |              |
| <i>S. distolothrix</i> | 0,00%        | 0,93%        | <b>0,23%</b> |              |              |              |              |              |              |              |               |              |              |              |              |
| <i>S. distolothrix</i> | 0,93%        | 0,00%        | 1,17%        | <b>0,93%</b> |              |              |              |              |              |              |               |              |              |              |              |
| <i>S. distolothrix</i> | 0,93%        | 0,00%        | 1,17%        | 0,93%        | <b>0,00%</b> |              |              |              |              |              |               |              |              |              |              |
| <i>S. empousa</i>      | 8,11%        | 8,72%        | 7,84%        | 8,11%        | 8,72%        | <b>8,72%</b> |              |              |              |              |               |              |              |              |              |
| <i>S. empousa</i>      | 8,11%        | 8,72%        | 7,84%        | 8,11%        | 8,72%        | 8,72%        | <b>0,46%</b> |              |              |              |               |              |              |              |              |
| <i>S. empousa</i>      | 7,80%        | 8,41%        | 7,54%        | 7,80%        | 8,41%        | 8,41%        | 0,23%        | <b>0,23%</b> |              |              |               |              |              |              |              |
| <i>S. empousa</i>      | 7,80%        | 8,41%        | 7,84%        | 7,80%        | 8,41%        | 8,41%        | 0,46%        | 0,46%        | <b>0,23%</b> |              |               |              |              |              |              |
| <i>S. empousa</i>      | 7,80%        | 8,41%        | 7,54%        | 7,80%        | 8,41%        | 8,41%        | 0,23%        | 0,23%        | 0,00%        | <b>0,23%</b> |               |              |              |              |              |
| <i>S. empousa</i>      | 11,97%       | 12,65%       | 12,27%       | 11,97%       | 12,65%       | 12,65%       | 11,76%       | 11,76%       | 11,42%       | 11,42%       | <b>11,42%</b> |              |              |              |              |
| <i>S. empousa</i>      | 11,97%       | 12,65%       | 12,27%       | 11,97%       | 12,65%       | 12,65%       | 11,76%       | 11,76%       | 11,42%       | 11,42%       | 11,42%        | <b>0,00%</b> |              |              |              |
| <i>S. empousa</i>      | 11,97%       | 12,65%       | 12,27%       | 11,97%       | 12,65%       | 12,65%       | 11,76%       | 11,76%       | 11,42%       | 11,42%       | 11,42%        | 0,00%        | <b>0,00%</b> |              |              |
| <i>S. empousa</i>      | 11,97%       | 12,65%       | 12,27%       | 11,97%       | 12,65%       | 12,65%       | 11,76%       | 11,76%       | 11,42%       | 11,42%       | 11,42%        | 0,00%        | 0,00%        | <b>0,00%</b> |              |
| <i>S. empousa</i>      | 11,97%       | 12,65%       | 12,27%       | 11,97%       | 12,65%       | 12,65%       | 11,76%       | 11,76%       | 11,42%       | 11,42%       | 11,42%        | 0,00%        | 0,00%        | 0,00%        | <b>0,00%</b> |
| <i>S. empousa</i>      | 11,97%       | 12,65%       | 12,27%       | 11,97%       | 12,65%       | 12,65%       | 11,76%       | 11,76%       | 11,42%       | 11,42%       | 11,42%        | 0,00%        | 0,00%        | 0,00%        | 0,00%        |

Fonte: Martins, 2019

## 5. DISCUSSÃO

Em todos os testes utilizados para delimitação, obtivemos dois grupos identificados morfologicamente como *Scoloplax empousa*, com uma distância genética de 11% entre si, isso indica que temos dois grupos diferentes geneticamente. A variação intraespecífica consiste nas diferenças genéticas comuns entre indivíduos da mesma espécie. A divergência interespecífica são as diferenças que se acumulam entre as espécies. Esse indicador de distância genética é considerado alto e logo pode indicar alta possibilidade de espécies

diferentes. Nos trabalhos de Hebert et al. (2003) um valor igual a 3% é aceito como um limite suficiente para separar duas espécies. Ainda levando em consideração diversos outros trabalhos com a ictiofauna neotropical, as distâncias intraespecíficas médias não ultrapassam 1%. (GOMES et al., 2015; LARA et al., 2010; PEREIRA et al., 2013, 2011; ROSSO et al., 2012).

É possível relacionar as datações encontradas com eventos biogeográficos recentes pois as duas espécies se encontram em bacias que atualmente se encontram isoladas. A separação das bacias do Paraná e Amazônica ocorreu há 42 – 15 Ma com o soerguimento do Arco Michicola (DECELLES & HORTON, 2003). A data de tal evento corresponde a separação de *S. dicra*, uma espécie encontrada na Bacia Amazônica com *S. empousa* e *S. distolothrix*, nas bacias de drenagem do Paraná e Paraguai. (Figura 2)

Segundo a distância K2P obtidas para as duas populações de *S. empousa* (Tabela 1), é possível segundo Hebert et al. (2003) discriminar esses dois grupos coletados e identificados morfológicamente como *S. empousa* com altos valores de divergência genética, como possivelmente duas espécies diferentes.

Os dois grupos se encontram em regiões geomorfológicas recentes que datam 14 Ma, no Quaternário, onde o evento de subsidência do Pantanal ocorreu no final do Mioceno. Tal evento foi responsável pelo isolamento das bacias do Alto Paraná e Paraguai que uma vez foram ligadas (ASSINE et al, 2015). Esse isolamento funcionou como barreira vicariante, assim gerando a especiação do grupo de *Scoloplax empousa* da Bacia do Paraguai com o grupo da bacia do Paraná. Hoje como duas bacias isoladas, é possível inferir que tal acontecimento tenha sido um fator biogeográfico vicariante, e que os indivíduos hoje encontrados na Bacia do Alto Paraná são divergentes geneticamente dos encontrados na Bacia do Paraguai no Pantanal.

Segundo as análises com o grupo taxonômico irmão *S. distolothrix*, os valores de distância genética de 8%, caracterizam como uma espécie diferente o grupo de *S. empousa* da Bacia do Paraguai. E o tempo de surgimento dos grupos de *S. empousa* da bacia do Paraguai é de 1 Ma, indicando uma especiação recente do grupo da bacia do Paraná. Desta forma mais um fator colabora para a confirmação de que temos uma nova espécie de *Scoloplax*

para a bacia do Paraguai no Pantanal, visto que a localidade-tipo para a espécie é do Paraná.

As hipóteses de migração ou vicariância foram consideradas, entretanto a mais aplicável ao estudo é a de vicariância, visto que nos estudos de Sazima (2000), a espécie *S. empousa* é caracterizada como sedentária e de hábitos noturnos, habitando partes rasas dos rios, e desenvolvendo uma técnica de caça que envolve o método de “sentar e esperar” até a presa aparecer em seu campo de ação. Logo considerando essas informações, migração se torna um fator dificultoso para peixes em miniatura como esses.

Após os resultados obtidos pode-se considerar um aumento no número de espécies para a bacia do Paraguai e a Bacia do Paraná.

O registro das amostras identificadas morfologicamente como *Scoloplax empousa* foram depositadas e registradas no site BOLD onde não haviam registros da espécie anteriormente gerando a dificuldade de identificação para comparar a probabilidade de similaridade genética. Com relação as espécies restantes do gênero *Scoloplax*, não existem sequencias registradas, apenas para *Scoloplax distolothrix*, portanto a identificação não foi possível. A pesquisa então gerou a complementação do banco de dados do site, referentes a espécie estudada.

## 6. CONCLUSÃO

Por meio desse estudo houve o aumento de informações referentes a espécie *S. empousa*, o redirecionamento para uma possível revisão taxonômica com relação a um dos grupos definidos pelos testes realizados e o entendimento inicial de padrões biogeográficos para a espécie. A hipótese de vicariância foi sugerida como fator para a divergência dos dois grupos delimitados, visto o fator de isolamento das bacias de drenagem nas quais se encontram por meio do soerguimento do arco Michicola. O estudo também gerou a atualização do banco de dados de *S. empousa* no site BOLD.

## 7. REFERÊNCIAS

AVISE, J. C., ARNOLD, J., BALL, R. M., BERMINGHAM, E., LAMB, T., NEIGEL, J.E., REEB, C.A., SAUNDERS, N.C. (1987). **Intraspecific phylogeography: The mitochondrial DNA bridge between Population genetics and systematics.** *Annual Review of Ecology and Systematics* 18, 489-522.

BAILEY, R.M., BASKIN, J. A. 1989 **Scoloplax dicra, a new armored catfish from the Bolivian amazon.** *Mus. Zool. Univ. Mich* 1-113

CARSTENS, B.C., PELLETIER, T.A., REID, N.M., SATLER, J.D., 2013. **How to fail at species delimitation.** *Mol. Ecol.* 22, 4369–4383.

CARVALHO, D.C., OLIVEIRA, D.A.A., POMPEU, P.S., LEAL, C.G., OLIVEIRA, C., HANNER, R., 2011. **Deep barcode divergence in Brazilian freshwater fishes: the case of the São Francisco River basin.** *Mitochondrial DNA* 22, 80–86

DRUMMOND, A.J., RAMBAULT, A., SHAPIRO, B., PYBUS O. G. **Bayesian Coalescent Inference of Past Population Dynamics from Molecular Sequences** (2005) *Department of Zoology, University of Oxford, Oxford, United Kingdom*

DRUMMOND, A.J., HO, S.Y.W., PHILLIPS, M.J., RAMBAUT, A., 2006. **Relaxed phylogenetics and dating with confidence.** *PLoS Biol.* 4, 699–710. doi:10.1371/journal.pbio.0040088

DE OLIVEIRA, R.R.; ROCHA M.S.; ANJOS, M.B.; ZUANON, J.A. & RAPP PY-DANIEL, L. 2009. **Fish fauna of small streams of the Catua-Ipixuna Extractive Reserve, State of Amazonas, Brazil.** *Check List*, 5(2): 154–172.

FUJISAWA, T., BARRACLOUGH, T.G., 2013. **Delimiting species using single-locus data and the generalized mixed yule coalescent approach: A revised method and evaluation on simulated data sets.** *Syst. Biol.* 62, 707–724

GOMES, L.C., PESSALI, T.C., Sales, N.G., POMPEU, P.S., CARVALHO, D.C., 2015. **Integrative taxonomy detects cryptic and overlooked fish species in a neotropical river basin.** *Genética* 143, 581–588

HEBERT, P., GREGORY, T.R., 2005. **The Promise of DNA Barcoding for Taxonomy.** *Syst. Biol.* 54, 852–859.

HUELSENBECK, J.P., 2001. **Bayesian Inference of Phylogeny and Its Impact on Evolutionary Biology.** *Science* (80). 294, 2310–2314.

HUDSON R.R. 2002. **Generating samples under aWright-Fisher neutral model of genetic variation.** *Bioinformatics* 18:337–338. Parenti and Rauchenberger, 1989

HEBERT, P.D.N., CYWINSKA, A., BALL, S.L., DEWAARD, J.R., 2003. **Biological identifications through DNA barcodes.** *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 270, 313–32

HORTON, B. K., DECELLES, P. G., **The modern foreland basin system adjacent to the Central Andes.** *Geology*; October 1997; v. 25; no. 10; p. 895–898

LARSSON, A., (2014) **AliView: a fast and lightweight alignment viewer and editor for large datasets.** *Bioinformatics*, 30 n. 22, p. 3276-327.

LUNDBERG, J.G., MARSHALL, L.G., GUERREROG, J., HORTON, B., MALABARBA, M.C.S.L., WESSELINGH, F., 1998. **The stage for neotropical fish diversification a history of tropical south american rivers.** *Phylogeny Classif. Neotrop. Fishes* 603.

LARA, A., PONCE DE LEÓN, J.L., RODRIGUEZ, R., CASANE, D., CÔTE, G., BERNATCHEZ, L., GARCIAMACHADO, E., 2010. **DNA barcoding of Cuban**

**freshwater fishes: Evidence for cryptic species and taxonomic conflicts.** Mol. Ecol. Resour. 10, 421–430.

MINISTERIO DO MEIO AMBIENTE, Secretaria de Recursos hídricos. **Caderno da região hidrográfica amazônica.** Ed.01. Brasília, DF. Ministério da educação. 2006. 124p

NEIL, C.; ELSENBEER, H.; KRUSCHE, A. V.; LEHMANN, J.; MARKEWITH; FIGUEIREDO, R.de O. (2006). **Hydrological and Biogeochemical Processes in a Changing Amazon: Results from small watershed studies and the Large-Scale Biosphere- Atmosphere Experiment.** *Hydrological processes.* 20, p. 2467-2477.

PEREIRA, L.H.G., MAIA, G.M.G., HANNER, R., FORESTI, F., OLIVEIRA, C., 2013. **Can DNA barcoding accurately discriminate megadiverse neotropical freshwater fish fauna?** BMC Genet. 14, 20.

PEREIRA, L.H.G., MAIA, G.M.G., HANNER, R., FORESTI, F., OLIVEIRA, C., 2011. **DNA barcodes discriminate freshwater fishes from the Paraíba do Sul River Basin, São Paulo, Brazil.** Mitochondrial DNA 22, 71–79.

PULLANDRE, N., LAMBERT, A., BROUILLET, S., ACHAZ, G., 2012. **ABGD, Automatic Barcode Gap Discovery for primary species delimitation.** Mol. Ecol. 21, 1864–1877.

PONS, J., BARRACLOUGH, T., GOME-ZURITA, J., CARDOSO, A., DURAN, D., HAZELL, S., KAMOUN, S., SUMLIN, W., VOGLER, A., 2006. **Sequence-Based Species Delimitation for the DNA Taxonomy of Undescribed Insects.** Syst. Biol. 55, 595–609.

ROSSO, J.J., MAGABRAGAÑA, E., GONZÁLEZ, C, M., DIAZ DE ASTARLOA, J.M., 2012. **DNA barcoding neotropical fishes: Recent advances from the Pampa Plain, Argentina.** Mol. Ecol. Resour. 12, 999–1011.

ROCHA, M.S.; DE OLIVEIRA, R.R. & RAPP PY-DANIEL, L. 2008. ***Scoloplax baskini*: a new spiny dwarf catfish from rio Aripuanã, Amazonas, Brazil (Loricarioidei: Scoloplacidae)**. *Neotropical Ichthyology*, 6 (3): 323–328.

SILVA, J. M. C., RYLANDS, A. B., FONSECA, G. A. B. 2005 **The fate of Amazonian areas of endemism**. *Conserv. Biol.* 19, 689–694.

SCHAEFER, S.A. 1990. **Anatomy and relationships of the scoloplacidae catfishes**. *Proceedings of the Academy of Natural Sciences of Philadelphia*, 142: 167–210.

SCHAEFER, S.A. 2003. Scoloplacidae. *In*: Reis, R.E.; Kullander, S.O., & Ferraris, Jr., C.J. (Eds.). **Checklist of the freshwater fishes of South and Central America**. Edipucrs, Porto Alegre. p. 310–311.

SCHAEFER, S.A.; WEITZMAN, S.H. & BRISTIK, H.A. 1989. **Review of the neotropical catfish genus *Scoloplax* (Pisces: Loricarioidea: Scoloplacidae) with comments on reductive characters in phylogenetic analysis**. *Proceedings of the Academy of Natural Sciences of Philadelphia*, 141: 181–211.

SAZIMA, I.; MACHADO, F.A. & ZUANNON, J.A. 2000. **Natural history of *Scoloplax empousa* (Scoloplacidae), a minute spiny catfish from the Pantanal wetlands in western Brazil**. *Ichthyological Exploration of Freshwaters*, 11: 89–95.

TAMURA, K., STECHER, G., PETERSON, D., FILIPSKI, A., KUMAR, S., 2018. **MEGAX: Molecular evolutionary genetics analysis version 10.0**. *Mol. Biol. Evol.* 30, 2725–2729.

STAMATAKIS, A., 2006. **RAxML-VI-HPC: Maximum likelihood-based phylogenetic analyses with thousands of taxa and mixed models**. *Bioinformatics* 22, 2688–2690.

TANG, C.Q., HUMPHREYS, A.M., FONTANETO, D., BARRACLOUGH, T.G., 2014. **Effects of phylogenetic reconstruction method on the robustness of species delimitation using single-locus data** 1086–1094. doi:10.1111/2041-210X.12246

VARI, R.P., MALABARBA, L.R., 1998. **Neotropical Ichthyology: An Overview**. *Phylogeny Classif. Neotrop. Fishes* 1870, 1–11.

VALDEZ-MORENO, M., IVANOVA, N. V., ELIAS-GUTIÉRREZ, M., CONTRERAS-BALDERAS, S., HEBERT, P.D.N., 2009. **Probing diversity in freshwater fishes from Mexico and Guatemala with DNA barcodes**. *J. Fish Biol.* 74, 377–402.

YULE, G.U., 1925. **A mathematical theory of evolution, based on the conclusions of Dr. J. C. Willis**, F.R.S. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B* 213, 402–410.

ZHANG, J., KAPLI, P., PAVLIDIS, P., STAMATAKIS, A., 2013. **A general species delimitation method with applications to phylogenetic placements** 29, 2869–2876.

## APÊNDICE A

## Resultados ABGD

**Número de grupos encontrados:** 26

**Distância máxima anterior:** P = 0,001000

**Grupo [ 1 ] n: 1:** Corydoras\_aeneus\_GB  
**Grupo [ 2 ] n: 1:** Corydoras\_ourastigma\_GB  
**Grupo [ 3 ] n: 1:** Callichthys\_callichthys\_GB  
**Grupo [ 4 ] n: 1:** Hoplosternum\_littorale\_GB  
**Grupo [ 5 ] n: 6:** S\_empousa\_84\_Piraveve S\_empousa\_85\_Piraveve  
 S\_empousa\_86\_Piraveve S\_empousa\_87\_Guirai S\_empousa\_88\_Guirai  
 S\_empousa\_89\_Guirai  
**Grupo [ 6 ] n: 5:** S\_empousa\_35\_Pocone S\_empousa\_39\_Miranda  
 S\_empousa\_52\_Miranda S\_empousa\_51\_Miranda S\_empousa\_53\_Miranda  
**Grupo [ 7 ] n: 3:** S\_distolothrix\_44\_Alto\_Xingu S\_distolothrix\_83\_Alto\_Xingu  
 S\_distolothrix\_MCP\_40282\_Alto\_Xingu  
**Grupo [ 8 ] n: 2:** S\_virua\_34 S\_virua\_70  
**Grupo [ 9 ] n: 1:** S\_dolicholophia\_79\_Iranduba  
**Grupo [ 10 ] n: 2:** S\_purus\_38 S\_purus\_45  
**Grupo [ 11 ] n: 2:** S\_baskini\_43\_Palhalzinho S\_baskini\_56\_Palhalzinho  
**Grupo [ 12 ] n: 1:** S\_dicra\_25\_Cautario  
**Grupo [ 13 ] n: 1:** 32129\_Mafish\_G12  
**Grupo [ 14 ] n: 1:** 32610\_Mafish\_H12  
**Grupo [ 15 ] n: 1:** Diplomystes\_mesembrinus\_GB  
**Grupo [ 16 ] n: 1:** Nematogenys\_inermis\_GB  
**Grupo [ 17 ] n: 1:** Isbrueckerichthys\_epakmos\_GB  
**Grupo [ 18 ] n: 2:** Neoplec\_paranensis\_GB\_17441  
 Neoplec\_paranensis\_GB\_17444  
**Grupo [ 19 ] n: 1:** Astroblepus\_GB  
**Grupo [ 20 ] n: 1:** Hemipsilichthys\_gobio\_GB  
**Grupo [ 21 ] n: 1:** Hemipsilichthys\_papillatus\_GB  
**Grupo [ 22 ] n: 3:** S\_distolothrix\_36\_Altamira S\_distolothrix\_73\_Altamira  
 S\_distolothrix\_72\_Altamira  
**Grupo [ 23 ] n: 3:** S\_dolicholophia\_42\_Taruma S\_dolicholophia\_54\_Taruma  
 S\_dolicholophia\_71\_Taruma  
**Grupo [ 24 ] n: 1:** S\_dolicholophia\_75\_Jufari  
**Grupo [ 25 ] n: 1:** S\_dolicholophia\_77\_Iranduba  
**Grupo [ 26 ] n: 4:** S\_dolicholophia\_40\_SGC  
 S\_dolicholophia\_74\_JufarS\_dolicholophia\_78\_Iranduba  
 S\_dolicholophia\_80\_Iranduba

