

UNIVERSIDADE DO ESTADO DO AMAZONAS

WELTON LUIZ GATO MELO

**FILOGEOGRAFIA *Scoloplax dolicholophia* SCHAEFER, WEITZMAN & BRITSKI,
1989 (SILURIFORMES, LORICARIOIDEA, SCOLOPLACIDAE)**

Manaus/AM
2017

WELTON LUIZ GATO MELO

**FILOGEOGRAFIA *Scoloplax dolicholophia* SCHAEFER, WEITZMAN & BRITSKI,
1989 (SILURIFORMES, LORICARIOIDEA, SCOLOPLACIDAE)**

Trabalho de conclusão de curso apresentado
como parte dos requisitos para obtenção do
grau de Licenciado em Ciências Biológicas
da Universidade do Estado do Amazonas.

Orientador:
Prof^o Dr Marcelo Salles Rocha

Manaus/AM
2017



GOVERNO DO ESTADO DO
AMAZONAS

UNIVERSIDADE DO ESTADO DO AMAZONAS - UEA
ESCOLA NORMAL SUPERIOR - ENS
CURSO DE LICENCIATURA EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

RELATÓRIO DE AVALIAÇÃO FINAL DO TCC IV (NOTA DA API)

ALUNO: <i>Welton Luiz Gato Melo</i>
TÍTULO DO TCC: <i>Filogeografia de <u>Scotoplax dolicholophia</u> Schaefer, Weitzman & Britski, 1989 (siluriformes, Loricariidae, Scotoplacidae)</i>

AVALIAÇÃO DA BANCA AVALIADORA

BANCA EXAMINADORA	NOTAS ATRIBUÍDAS
a) Professor orientador: <i>marcelo Salles Rocha</i>	<i>8,3</i>
b) 1º avaliador(a): <i>Rafaela Priscila Ito</i>	<i>7,9</i>
c) 2º avaliador(a): <i>Christina Notta Büchtemeyer</i>	<i>9,1</i>
MÉDIA DA NOTA (a+b+c)/3	<i>8,4</i>

MÉDIA DA NOTA: *8,4*

Manaus, *08* de *novembro* de 2017.

ASSINATURA DOS MEMBROS DA BANCA AVALIADORA

marcelo Salles Rocha

Orientador(a)

Rafaela Priscila Ito

1º Avaliador(a)

Christina Notta Büchtemeyer

2º Avaliador(a)

Melo, Welton Luiz Gato

M528f Filogeografia *Scoloplax dolicholophia* SCHAEFER, WEITZMAN & BRITSKI, 1989 (SILURIFORMES, LORICARIOIDEA, SCOLOPLACIDAE) / Welton Luiz Gato Melo. 2017 28 f.: il. color; 31 cm.

Orientador: Marcelo Salles Rocha TCC de Graduação (Licenciatura em Ciências Biológicas) – Universidade do Estado do Amazonas.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, e os meus pais que sempre me ajudaram, apoiaram e colaboraram com minha formação da melhor forma que eles podem, embora estejam longe sempre os tenho comigo em pensamento. Agradecer ao meu Orientador, Profº Marcelo que sempre me ajudou como um parceiro e amigo, que para sempre levarei como uma referência.

Agradeço também ao Laboratório Temático de Biologia Molecular do INPA, e todas as pessoas que me ajudaram, Joyce Ieda, Amanda, Jaqueline, Kiara, Erico e Gisele, que sempre me ensinaram e mostraram que entre dificuldades a perseverança pode trazer resultados positivos.

Agradeço também a pessoas que me apoiaram entre momentos bons e ruins, Karina Kethelen, Joicyene, Rodrigo Taveira e Fábio Rolim.

Sou grato também pelas pessoas que conheci e que me fizeram companhia e me acolheram com carinho, LabEco da Escola Normal Superior, "o Biscoito, Glória, Gabriela e principalmente ao profº Jair, que tem sido um professor e amigo.

E a todos que me ajudaram de forma direta ou indireta para chegar onde cheguei, sou muitíssimo grato.

"Embora a visão possa se ofuscar na caminhada, a vida pode se adaptar e contornar as dificuldades."
(do autor)

RESUMO

Este trabalho apresenta diferentes tipos de abordagens filogenéticas, com fins de analisar a filogeografia da espécie *Scoloplax dolicholophia*, possibilitando responder a hipóteses de distribuição desse grupo, uma vez que esta espécie faz parte de praticamente toda a extensão do Rio Negro, desde São Gabriel da Cachoeira até a foz próximo ao município de Manaus. Foram utilizadas 8 amostras sendo, 1 de São Gabriel da Cachoeira, 2 coletadas no Rio Jufari (Médio Rio Negro), 2 amostras do Rio Tarumã e 3 amostras do município de Iranduba. Os DNAs dessas amostras foram extraídas e sequenciadas (região Citocromo Oxidase I e 16s) no Laboratório Temático de Biologia Molecular no INPA. Essas amostras posteriormente foram analisadas pelos modelos *General Time Reversible Model*, *Gamma Distributed* através do software MEGA, para a análise filogenética e *Bootstrap* 5000 repetições, no mesmo software. Para a distância genética foi utilizado o método P, que resultou em uma maior divergência de 0,0026 para o grupo do Rio Jufari e para o grupo de coletado em Iranduba, e menor divergência para o Grupo de São Gabriel da Cachoeira e Rio Jufari com o valor de 0.0014. Para o número de haplótipos temos 5 regiões que foram acusadas pelo programa DNASP, e configuradas como uma rede de haplótipos no software NETWORK, revelando ligação entre os grupos do Rio Negro, porém, apontam para um isolamento dos exemplares do Município de Iranduba.

Palavras-chave: Genética de populações, rio Negro, Loricarioidea

ABSTRACT

This paper presents different phylogenetic approaches, for purposes of analyzing the phylogeography of the species *Scoloplax dolicholophia*, enabling respond to distribution assumptions that group, since this species is part of virtually the entire length of the Rio Negro, from São Gabriel da Cachoeira to the mouth near the city of Manaus. 8 samples were used with 1, St. Gabriel, Rio collected Jufari 2 (Medium Black River), 2 samples and 3 samples River Tarumã the municipality of Iranduba. DNAs were extracted from these samples and sequenced (region 16s and cytochrome oxidase I) in Molecular Biology Laboratory at INPA theme. These samples were then analyzed by General Time Reversible Model models, Gamma Distributed by MEGA software, for phylogenetic analysis and Bootstrap 5000 repetitions in the same software. For the genetic distance was used P method, which resulted in a greater divergence of 0.0026 for the group Jufari River and the collected group in Iranduba, and less divergence for the San Gabriel Group waterfall and river with Jufari the value of 0.0014. For the number of haplotypes have five regions that have been indicted by the DNASP program, and configured as a haplotype network in the NETWORK software, revealing links between the Rio Negro groups, however, point to an isolation of the copies of the municipality of Iranduba. and less divergence for the Group of Sao Gabriel and Rio Jufari with a value of 0.0014. For the number of haplotypes have five regions that have been indicted by the DNASP program, and configured as a haplotype network in the NETWORK software, revealing links between the Rio Negro groups, however, point to an isolation of the copies of the municipality of Iranduba. and less divergence for the Group of Sao Gabriel and Rio Jufari with a value of 0.0014. For the number of haplotypes have five regions that have been indicted by the DNASP program, and configured as a haplotype network in the NETWORK software, revealing links between the Rio Negro groups, however, point to an isolation of the copies of the municipality of Iranduba.

Keyword: Genetics of populations, rio Negro, Loricarioidea.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - *Scoloplax dolicholophia*. Holótipo, MZUSP 6788, 10,51mm CP. Brasil, Amazonas, Igarapé pequeno Tributário do rio Tarumãzinho aproximadamente 45km ao norte do município de Manaus. A) vista ventral; B) vista lateral da cabeça..... 13
- Figura 2 - Mapa parcial da região Norte do Brasil, mostrando os pontos de coleta de exemplares de *S. dolichocophia* na bacia do rio Negro. 16
- Figura 3:Árvore filogenética dos espécimes de *Scoloplax dolicholophia* segundo dos fragmentos de genes (COI, 16s),20
- Figura 4 - Rede de haplótipos de *S. dolicholophia* analisados neste estudo.22

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Sequencias dos primers que serão utilizados na amplificação	17
Tabela 2 - Perfil de temperatura de desnaturação, extensão e anelamento no te	18
Tabela 3 - Perfil de temperatura de desnaturação, extensão e anelamento no te	18
Tabela 4 - Distância genética P.....	21
Tabela 5 - Analise de Variaça Molecular	21

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 OBJETIVOS	15
3 MATERIAL E METODOS	16
3.1 OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS	16
3.2 EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DO MATERIAL GENÉTICO	16
3.3 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE	17
3.3.1 Primers LCO1490/ HCO2198	17
3.3.2 Primers 16sar/16sbr/16saH/16sbr	18
3.3.3 Reação de sequenciamento de DNA	18
3.3.4 Edição, alinhamento dos nucleotídeos e análise filogenética	19
3.3.5 Análise Filogeográfica populacional	19
3 RESULTADOS	20
3.4 Filogênia	20
3.4 Distância Genética	20
3.4.3 Análise de Variância Molecular (AMOVA)	21
3.4.4 Rede de Haplótipos	21
4. DISCUSSÃO	22
REFERÊNCIAS	24

1 INTRODUÇÃO

A filogeografia é a determinação da distribuição geográfica de linhagens genealógicas por meio dos estudos desses processos (AVISE e FELLE, 1987). É importante destacar que os estudos de eventos históricos com relação ao processo de formação de táxons são relevantes para análises filogeográficas. Esses estudos filogeográficos de grupos de animais vêm aumentando desde a década de 70 com o surgimento de marcadores moleculares (MARTINS e DOMINGUES, 2011). Este fato pode ser ligado a componentes de estudos taxonômicos que envolvem processos de formações geológicas recentes, que levam a possíveis processos de vicariância e também estabelece parâmetros que dão suporte para hipóteses de estudos biogeográficos. Os estudos filogeográficos devem ser tratados como transversais aos demais estudos que relacionam o meio ambiente com os táxons, como geologia, taxonomia, genética de populações, entre outras (MARTINS e DOMINGUES, 2011).

Na década de 90 foram realizados muitos estudos na Amazônia para esclarecer as hipóteses que sustentam que as drenagens dos grandes rios podem ser contribuintes para a grande diversidade biológica da região (MARTINS e DOMINGUES, 2011). A mudança nas drenagens da plataforma continental da região neotropical pode ser apontada como fatores de mudanças geológicas (PENHA, 1998; COSTA, 2006, e como consequência divergências entre táxons (RIBEIRO, 2006; POLO, 2015).

As diversificações dos grandes clados de peixes podem ter iniciado junto aos primeiros eventos do soerguimento andino, mas pesquisas voltadas para a área da filogeografia vem mostrando clados recentes pelas formações de cursos de águas no Terciário e Quaternário (LUNDBERG et al., 1998). Entre as principais áreas da região neotropical está a Amazônia, com a maior concentração de peixes ósseos de água doce só na porção brasileira (Brasil = 2106; Amazônia Legal = 1800) (LEWINSOHN e PRADO, 2005), sendo parte destas espécies endêmicas (MENIN, 2007).

Existem teorias e estudos sobre a história da formação da bacia Amazônica, e entre estes estudos estão os filogeográficos. A região da Amazônia apresenta sua configuração atual desde um período considerado recente (Quaternário) (LUNDBERG et al., 1998). Rossetti, Toledo e Góes (2005) afirmam que os fenômenos tectônicos podem ter levado à sedimentação de ambientes,

desenvolvimento de drenagem, relevo e solo, que podem ter afetado os ecossistemas modernos da região da Amazônia. Então toda área dos grandes rios pode ter sido um sistema dinâmico de reconfiguração da região, dando destaque para as suas drenagens, com diferentes perfis climáticos e topográficos. Essas mudanças climáticas e tectônicas são causas de mudanças nas configurações populacionais de espécies e de comunidade de espécies, do ponto de vista genético, desde a formação dos continentes para diversos grupos de animais (VRBA, 1992), e desde o plioceno são motivos de mudanças em populações na região da Amazônia. Rossetti, Toledo e Góes (2005) também deixam claro que a biologia molecular em grupos de animais, associada à geologia, colabora com as teorias de especiação.

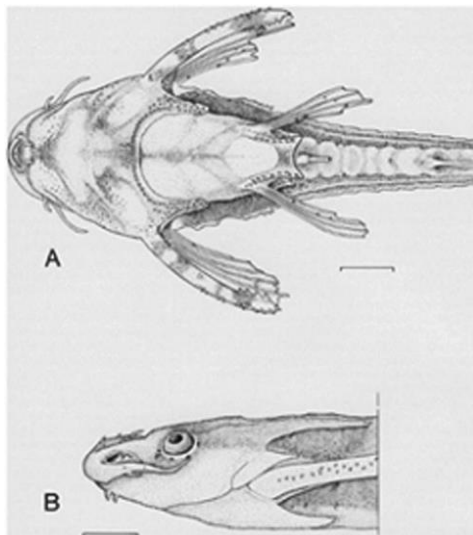
Entre os grupos, num aspecto de filogenia comparada estudados com relações históricas evolutivas, estão aves, répteis, peixes, com resultados que colaboram com processos de vicariância causados por mudanças em drenagens e por transformações tectônicas (GEURGAS e RODRIGUES 2010; GOLDANI, 2013; POLO, 2015). As principais características das análises realizadas em genética de populações com peixes, é que estas são feitas para o teste de hipóteses sobre os táxons ou a distribuição desses táxons em bacias hidrográficas, que permitam entender os grupos de peixes de água doce que são de interesse econômico.

Como os rios são considerados as principais barreiras no processo de variância, os peixes são pouco explorados no sentido de formação teórica para modelos de análise de divergência, que possam colaborar com as informações geológicas, embora possam apontar para relações que chegam a ser debatidas em trabalhos relacionados de filogeografia. Porém, pequenos peixes, como os da família Scoloplacidae, pode ser objeto de colaboração com teorias de divergências entre espécies na região neotropical.

A família Scoloplacidae é composta atualmente por 6 espécies do gênero *Scoloplax*, incluindo a espécie *Scoloplax dolicholophia* (Figura 1) (BAILEY e BASKIN, 1976; SHEAFER, WEITZMAN e BRITSKI, 1989; ROCHA et al., 2008; ROCHA, LAZZAROTTO e PY-DANIEL, 2012). Esses peixes não passam do comprimento de 2 cm e vivem no fundo de pequenos cursos de águas calmas entre folhas e galhos depositados (SHAEFER, 2003; ROCHA et al., 2008). Esse peixe é encontrado desde o baixo rio Negro, que sofre influência do rio Solimões, até o alto rio negro. Próximo ao município de São Gabriel da Cachoeira. No rio Solimões, é

encontrado em igarapés afluentes do rio próximo ao município de Tefé (Médio Amazonas).

Figura 1 - *Scoloplax dolicholophia*. Holótipo, MZUSP 6788, 10,51mm CP. Brasil, Amazonas, Igarapé pequeno Tributário do rio Tarumãzinho aproximadamente 45km ao norte do município de Manaus. A) vista ventral; B) vista lateral da cabeça.



Fonte: modificado de Shafer et al., 1989.

A família Scoloplacidae é a segunda mais recente entre os siluriformes com a primeira espécie descrita no final dos anos 70 (NELSON, 2006), logo, mais estudos como os do presente trabalho, podem revelar os processos evolutivos desse grupo com base na filogeografia.

Outro aspecto é que, conhecer a taxonomia das espécies é fundamental como base para outros estudos em diferentes áreas, como ecológicas e evolutivos, contribuindo para conhecimento dos processos evolutivos (SAVAGE, 1995). E mapeamento é primordial para a conservação da biodiversidade, e trabalhos que aplicam metodologias da biogeografia histórica possibilitam essa tarefa (GOLDANI, 2013).

O DNA mitocondrial (mtDNA) animal é uma molécula de fita dupla que possui 37 genes descritos, dos quais 13 genes são codificadores de RNA mensageiro, 22 RNA transportador (tRNAs), 2 de RNAs ribossômicos (12S e 16S rRNA) e uma região não codificadora chamada de região controle, A+T (invertebrados) ou “alça D” ou “D-loop” (vertebrados).

O DNA mitocondrial possui alguns requisitos básicos e bastante atrativos

para estudos populacionais e evolutivos como: estrutura de organização simples, conteúdo dos genes extremamente conservados, possui herança materna, portanto, não sofre as segregações mendelianas e possui ainda alta taxa evolutiva, sendo superior cerca de dez vezes em relação ao DNA nuclear (ARIAS, 2012).

2 OBJETIVOS

Objetivo Geral

- Conhecer a filogeografia do *Scoloplax dolicholophia*.

Objetivos Específicos

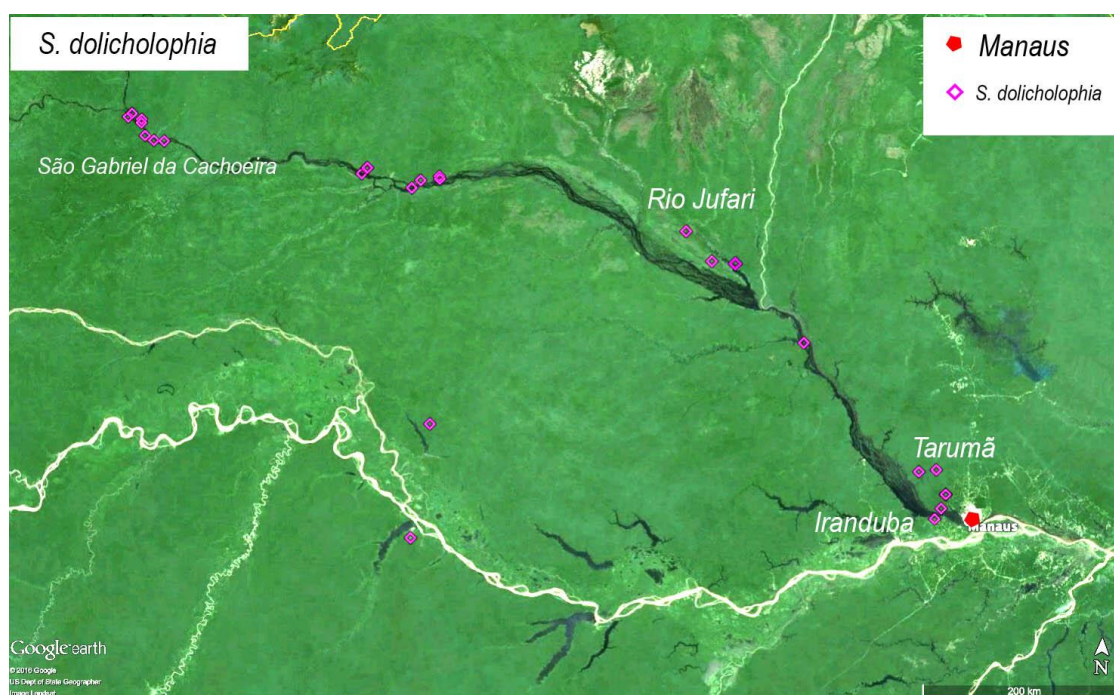
- Estimar a variabilidade genética das populações de *Scoloplax dolicholophia*;
- Estimar o tempo de divergência entre as populações de *Scoloplax dolicholophia*.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS

As amostras utilizadas estão depositadas na Coleção de Recursos Genéticos do Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia - INPA, que possui um grande acervo dessa espécie, de diversas coletas realizadas na região norte. De acordo com o estado de conservação das amostras foram realizadas análises do máximo de amostras possíveis. Esses exemplares estavam conservados em formol e etanol 95%, sendo que apenas os tecidos das nadadeiras foram utilizados. As amostras foram coletadas nos pontos de coletas das regiões apresentadas no mapa (Figura 2).

Figura 2 - Mapa parcial da região Norte do Brasil, mostrando os pontos de coleta de exemplares de *S. dolichocophia* na bacia do rio Negro.



Fonte: do autor.

Embora os pontos de coletas forem diversos, nem todos foram representados nas análises, por conta das expressões no sequenciamento.

3.2 EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DO MATERIAL GENÉTICO

Neste trabalho foram utilizados os genes: 16S e CO I. A região do 16s é a

porção que codifica a subunidade do RNA ribossômico. A região da Citocromo Oxidase I faz parte do complexo que expressão enzimas que fazem parte do processo respiratório. E ambas regiões do DNA mitocondrial em peixes são região que têm um elevado grau de mutações (ARIAS, 2012)

A extração de DNA das espécies foi realizada com o Kit Wizard Genomic DNA Purification (Promega) seguindo o protocolo do fabricante, utilizando-se tecido de fragmentos das nadadeiras de cada exemplar. As concentrações de DNA foram estimadas a partir da comparação com marcadores de concentração conhecida, neste caso o marcador de DNA fago λ , com constatação através de fotodocumentação em gel de agarose 0,8%, após eletroforese por 50 minutos em corrente de 80 V.

3.3 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE

Os fragmentos de DNA mitocondrial das espécies foram amplificados utilizando a técnica Reação da Polimerase em Cadeia (PCR) com primers universais para os genes 16s e CO I (Tabela 1):

Tabela 1 - Sequencias dos primers que foram utilizados na amplificação do DNA das amostras de S. dolicholophia.

Fragmento	Primers	Sequencias dos primers	Referências
CO I	L1490 (F)	5' - GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG - 3'	FOLMER et al. (1994)
	H2198 (R)	3' - TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA - 5'	FOLMER et al. (1994)
16s	16sar-L	5' - CGCCTGTTTATCAAAAACAT - 3'	PALUMBI et al. (1991)
	16sb-L	3' - CCGGTCTGAACTCAGATCATGT - 5'	
	16sa-H	5' - ATGTTTTTGATAAACAGGCG - 3'	PALUMBI et al. (1991)
	16sbr-H	3' - CCGGTCTGAACTCAGATCACGT - 5'	

Diferentes métodos de reações em cadeia da polimerase foram utilizados, para a adequação do que se pode referenciar na literatura de forma a otimizar o procedimento e o resultado de acordo com cada primer específico. As reações se dispuseram da seguinte forma nos experimentos:

3.3.1 Primers LCO1490/ HCO2198

Cada PCR terá um volume final de 25 µL contendo: 1,0 µl DNA genômico (50 ng), 1,5 µl Primer forward (5mM) e 1,5 µl Primer reverso (5mM), 1,2 µl dNTP (1mM), 1,5 µl MgCl₂ (25mM), 1,2 µl Tampão 10X, 0,5 µl Taq DNA polimerase (5U/ µl). A PCR foi processada em termociclador com condições e perfis de temperatura específicos para a amplificação do fragmento utilizado:

Tabela 2 - Perfil de temperatura de desnaturação, extensão e anelamento para o termociclador o primer LCO1490/ HCO2198

Etapas	Temperatura	Tempo	Ciclos
1	95 °C	3 min	1x
2	95 °C	1 min	30x
2	55 °C	1 min	
2	72 °C	1 min	
3	72 °C	10 min	1x
3	20 °C	--	∞

Fonte: FOLMER et al. (1994).

3.3.2 Primers 16sar/16sbr/16saH/16sbr

Cada PCR terá um volume final de 15 µL contendo: 5,5 de H₂O ultra-pura, 1,0 µl DNA genômico (50 ng), 1,5 µl Primer forward (5mM) e 1,5 µl Primer reverso (5mM), 1,5 µl dNTP (1mM), 1,5 µl MgCl₂ (25mM), 1,5 µl Tampão 10X, 0,3 µl Taq DNA polimerase (5U/ µl). A PCR foi processada em termociclador com condições e perfis de temperatura específicos para a amplificação do fragmento utilizado:

Tabela 3 - Perfil de temperatura de desnaturação, extensão e anelamento para o termociclador para os primers 16sar/16sbr/16saH/16sbr.

Ciclo	Temperatura	Tempo	Repetições
1	95 °C	3 min	1x
2	95 °C	1 min	30x
2	55 °C	1 min	
2	72 °C	1 min	
3	72 °C	10 min	1x
4	20 °C	--	∞

O produto amplificado foi analisado por eletroforese em gel de agarose 1%, corado com GelRed (Biotium) e visualizado em fotodocumentador ultra-violeta (UV). Posteriormente foi purificado utilizando-se polietilenoglicol 20% (PEG 8000).

3.3.3 Reação de sequenciamento de DNA

O produto das amplificações foi sequenciado utilizando o primer forward (5 μ M), primer reverse (5 μ M) de cada gene mitocondrial (Região Controle, CO I), juntamente com o Kit Big Dye terminator v3.1, Tampão 5X e água ultra-pura, seguindo as indicações do fabricante. Essa reação foi levada ao termociclador seguida de precipitação em etanol 100%. A placa contendo as amostras foi injetada em analisador automático de DNA ABI 3130xl (AppliedBiosystems).

3.3.4 Edição, alinhamento dos nucleotídeos e análise filogenética

As sequências nucleotídicas foram verificadas, editadas, compiladas e alinhadas com o auxílio dos programas, CHROMAS 2.23 (Technelysium Pty Ltd), para a visualização dos cromatogramas, e BIOEDIT 7.0.9.0 (HALL, 1999) para a edição passo-a-passo das sequencias automaticamente alinhadas que apresentaram defasagens, ou que apresentaram ambiguidades. O modelo evolutivo foi testado no programa MEGA 6.06 (TAMURA et al., 2013)(BEERLI & FELSENSTEIN 2001).

3.3.5 Análise Filogeográfica populacional

Uma rede de haplótipos foi feita com o uso do programa Network 4.6 (POLZIN e VAHDATI, 2004), para estabelecer uma relação entre os haplótipos de acordo com as localidades e com os agrupamentos dados pelo programa de formação desses haplótipos. Isso é possível pela comparação de haplótipos estabelecendo seu grau de relação.

Uma variação do método estatístico F foi utilizado como uma forma de estabelecer as conexões entre as populações de diferentes localidades estabelecendo o seu nível de divergência ou convergência enquanto a populações e subpopulações que podem existir, e até mesmo o efeito da fixação de caracteres em toda a população da espécie.

Essa variação é do teste de AMOVA realizado no software ARLEQUIN 3.11 (EXCOFFIER et al., 2010), com 1000 permutações. Neste caso a tabela gerada que se apresenta om valores percentuais deve ser analisada de acordo com os valores de Fst que poder tender a 0 para uma relação de populações que são muito

similares em relação a sua filogenia ou para mais de 0,25 para populações que são diferentes. Baseando-se nisso chegamos as relações geográficas populacionais.

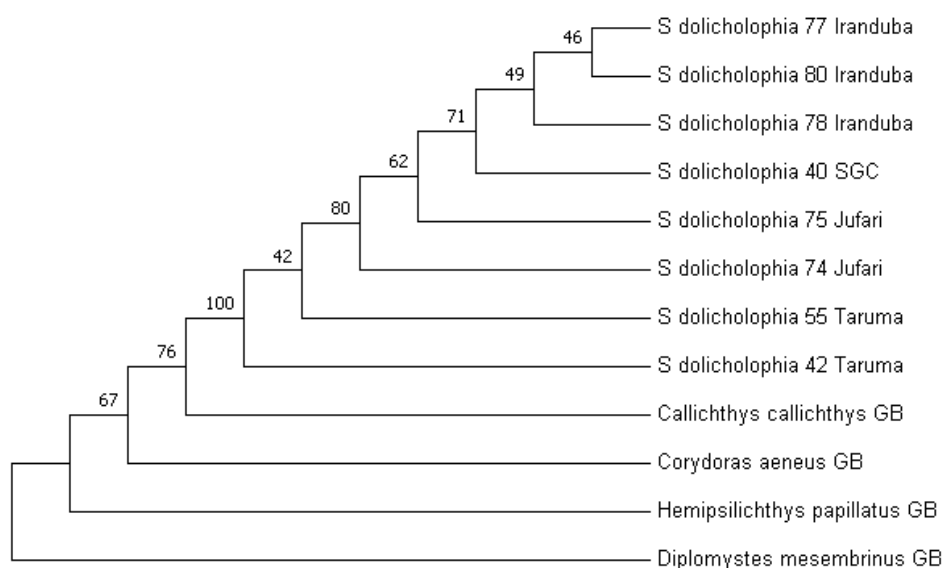
3 RESULTADOS

Os resultados seguirão uma ordem que permite a percepção das análises de acordo com a ordem pela qual ela foi realizada. O número amostral embora seja baixo, abrange uma grande extensão do rio Negro, assim podemos destacar que as condições para análises filogenéticas serão limitadas, porém, neste trabalho foram apenas usados modelos e parâmetros que fazem com que os resultados sejam com mínima interferência em relação a isso.

3.4 Filogênia

Aqui estão os principais componentes de relações geográficas com base filogenética entre os indivíduos. Nesta árvore representa estão os indivíduos do rio Negro. Sendo que existe uma composição de relações entre indivíduos que se localizam geograficamente perto, padrão que já é apontado em outros trabalhos de filogeografia (CARVALHO, 2011).

Figura 3:Árvore filogenética dos espécimes de *Scoloplax dolicholophia* segundo dos fragmentos de genes (COI, 16s), Usando o método de Maximum Likelihood pelo General Time Reversible Model – α .



3.4 Distância Genética

Para a estimativa de distância filogenética entre os grupos definidos, os maiores valores foram para os grupos do rio Jufari e Iraduba e do rio Jufari com São Gabriel da Cachoeira, com 0,0026. E a menor distância está entre São Gabriel da Cachoeira e Tarumã, com 0,0014, porém um pouco menor que São Gabriel da Cachoeira e Rio Tarumã com 0,0015. A população dita como de Iraduba e rio Jufari estão a mesma distância de Iraduba e Tarumã, 0,0026.

Tabela 4 - Distância genética P , entre os grupos de indivíduos de cada região.

	Iraduba	Jufari	SGC	Tarumã
Iraduba	--	--	--	--
Rio Jufari	0.0026	--	--	--
SGC	0.0015	0.0014	--	--
Tarumã	0.0026	0.00228	0.0014	--

Fonte: do autor.

3.4.3 Análise de Variância Molecular (AMOVA)

As estruturas populacionais foram hipotetizadas e baseadas nas configurações apontadas nas análises das distâncias. Como haviam poucos indivíduos e apenas 4 prováveis populações representadas, estas foram comparadas entre si. Uma peculiaridade nesse trabalho foi a possível comparação das duas margens do rio Negro. Nesta situação podemos ver a variabilidade que existe nestas situações. Esses testes podem apontar para possível fluxo gênico em algum momento no passado ligando as populações, e permitindo medir seu grau de ligação.

Tabela 5 - Análise de variação molecular entre populações de *S. dolicholophia*.

Grupos	Situação	Varição
Os 4 grupos	<i>Populações externas</i>	49,75%
	<i>Populações internas</i>	50,25
	<i>Fst</i>	0.4974
As duas margens do rio Negro	<i>Populações externas</i>	46.58%
	<i>Populações internas</i>	53,42%
	<i>Fst</i>	0.4657

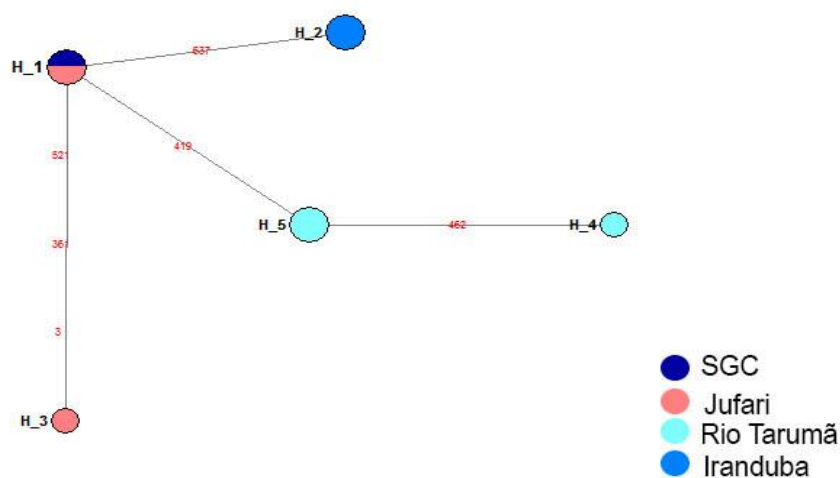
Fonte: do autor.

3.4.4 Rede de Haplótipos.

Esta rede de haplótipos foi realizada com base nas oito sequências que

constituem as amostras, neste caso foram detectados cinco haplótipos que foram usados na configuração para que a rede fosse criada. Embora não haja uma complexidade que aponte para casos de separações específicas de haplótipos, todos estão ligados e fazem parte do mesmo complexo. As relações com os indivíduos do alto rio Negro são neste trabalho consideradas centrais para os outros pontos do rio.

Figura 4 - Rede de haplótipos de *S. dolicholophia* analisados neste estudo.



O haplótipo que está identificado como H_1 corresponde a um indivíduo do rio Jufari e o de São Gabriel da Cachoeira. O H_3 é um indivíduo do rio Jufari. O haplótipo H_5 apresenta uma ramificação que é do haplótipo H_4 onde ambos fazem parte da população do município de Iranduba.

4. DISCUSSÃO

As espécies de pequenos peixes do gênero *Scoloplax* podem ser consideradas como animais que não migram, e se encontram em cursos de água calmos. Isso possibilita determinar que o deslocamento e dispersão dessa espécie pela América do Sul devido a configuração dos ambientes no decorrer de milhões e milhões de anos essa dinâmica promove a diversidade dentro do gênero.

Nos resultados filogenéticos os modelos de análise de tempo de divergência não puderam ser definidos de acordo com as comparações de similaridade entre as regiões do DNA mitocondrial analisadas. Porém, os métodos de análise de variância e de relação haplotípica apontaram para divergências e agrupamentos dos

indivíduos amostrados.

O que pode ser apontado uma situação a ser considerada é a relação de lados variação do valor de F_{st} para Iranduba e para o rio Tarumã (4,5Km) são muito semelhantes com o valor para Iranduba e São Gabriel da Cachoeira (850 Km). Isso pode aponta para uma divergência de grandes proporções em relações filogenéticas para os dois lados do rio Negro em relação a essa espécie estudadas que podem apontar para uma tendência que trabalhos clássicos como o de Wallace (1876), que aponta para divergências entre espécies entre as duas margens do rio.

Carvalho (2012) mostra que complexos de grupos de peixes podem ser formados em diferentes cursos de água, dentro do grupo de Loricariidae que foram estudadas também apresentaram diferentes variações filogeográficas dos grupos divididos pelos rios da região Centro-Oeste. Caso como esse também é visto no nos trabalhos com anuros, coletados na Região nordeste da Amazônia e no estado do Pará (CAMPOS, 2016). No trabalho de Campos também é notável a diferença entre as margens do rio Amazonas, onde ocorrem mínimas sobreposições, mas permitem uma percepção da força dos rios como barreira.

O que permeia a área filogeográfica pode ser apontado como hipóteses, mas que podem ser testadas de acordo com os modelos que são disponibilizados. Esses modelos possibilitam o teste de ínfimas amostragens para que eles possam reforçar abordagens geográficas entorno de espécies, principalmente quando possuem características favoráveis como a espécie estudadas.

5. CONCLUSÃO

De acordo com as análises filogenéticas, e as estimativas de tempo segundo o parâmetro evolutivo utilizado. Não houve uma clara separação de táxons dentro do grupo, impedindo a formação de grupos e datação entre eles, mas dessa forma cabe destacar de que é um grupo que tem uma taxa de evolução que não é perceptível nos marcadores moleculares utilizados. Esse grupo apresenta uma origem de sua divergência a 100 mil anos, recente para esse tipo de marcador.

Entre as análises de variância o que pode ser destacado é a formação de distancias entre os grupos ligeiramente iguas, porem sendo as maiores entre as duas margens do rio (0,26%), o que pode não ser um valor expressivo, mas que pode ser uma tendência entre esse grupo.

6. REFERÊNCIAS

ARIAS, M. C.; INFANTE-MALACHIAS, M. E. 2012. Capítulo 18. RFLP: **O emprego de enzimas de restrição para detecção de polimorfismo no DNA**. p. 176-177. In: MATIOLI, S. R.; FERNANDES, F. M. C. *Biologia Molecular e Evolução*. Ribeirão Preto: Holos, Editora/ Sociedade Brasileira de Genética. p 256. 2012.

AVISE, J. C.; FELLEY, J. **Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics**. *Annual review of ecology and systematics*, p. 489-522, 1987.

BAILEY, R. M.; BASKIN, J. N. **Scoloplax dicra, a new armored catfish from the Bolivian Amazon**. 1976.

BEERLI, P.; FELSENSTEIN, J. **Maximum likelihood estimation of a migration matrix and effective population sizes in n subpopulations by using a coalescent approach**. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 98, n. 8, p. 4563-4568. 2001.

CAMPOS, JULIAN VIEIRA. **Distribuição espacial da variabilidade genética de *Leptodactylus pentadactylus* (Anura, Leptodactylidae): Uma abordagem baseada em modelos filogeográficos e de nicho ecológico**. 2016.

CARVALHO, Pedro Holanda. **Análises filogenéticas e filogeográficas do complexo de espécies *Hypostomus ancistroides* (Siluriformes: Loricariidae)**. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo. 2011.

COSTA, J. B. S., BEMERGUY, R. L., HASUI, Y., DA SILVA BORGES, M., JÚNIOR, C. R. P. F., BEZERRA, P. É. L., ... & FERNANDES, J. M. G. **Neotectônica da região amazônica: aspectos tectônicos, geomorfológicos e deposicionais**. *Revista Geonomos*, v. 4, n. 2, 1996.

EXCOFFIER, L.; LISCHER, H. EL. **Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and**

Windows. Molecular ecology resources, v. 10, n. 3, p. 564-567. 2010.

FOLMER, O.; BLACK, M.; HOEH, W.; LUTZ, R.; VRIJENHOEK, R. **DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates.** Molecular marine biology and biotechnology, v. 3, n. 5, p. 294-299. 1994.

GEURGAS, S. R.; RODRIGUES, M. T.. **The hidden diversity of *Coleodactylus amazonicus* (Sphaerodactylinae, Gekkota) revealed by molecular data.** Molecular Phylogenetics and Evolution. n. 54. p. 583 - 593. 2010.

GOLDANI, Â. **Biogeografia histórica da região neotropical: Análise de Parcimônia de Endemismo com dados distribucionais de peixes.** Revista Eletrônica de Biologia (REB). ISSN 1983-7682, v. 5, n. 3, p. 12-41. 2013.

HALL, T. A. **BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT.** In: Nucleic acids symposium series. p. 95-98. 1999.

LEWINSOHN, T. M.; PRADO, P. I.. **How many species are there in Brazil?.** Conservation Biology, v. 19, n. 3, p. 619-624. 2005.

LUNDBERG, J. G.; MARSHALL, L. G.; GUERRERO, J. HORTON, B.; MALABARBA, M. C. S. L.; WESSELINGH, F. **The stage for Neotropical fish diversification: a history of tropical South American rivers.** 1998.

MARTINS, F. DE M.; DOMINGUES, M. V. **Filogeografia. Revista da Biologia.** v. Especial. Biogeografia. p 26-30, nov. 2011.

MENIN, M. **Amazônia: diversidade biológica e história geológica.** Reptilia, v. 708, p. 273. 2007.

NELSON, J. S. **Fishes of the World.** John Wiley & Sons. 2006.

Palumbi, S. R., Martin, A., Romano, S., McMillan, W. O., Stice, L., & Grabowski, G. The Simple Fool's Guide to PCR, Version 2.0, privately published document compiled. Dept. **Zoology, Univ. Hawaii, Honolulu, HI**, v. 96822, 1991.

PENHA, HÉLIO MOMTEIRO. Processos endogenéticos na formação do relevo. **Geomorfologia: uma atualização das bases e conceitos**. Rio de Janeiro, Bertrand, 472p, p. 51-92, 1998.

POLO, É. M. **Influência da formação do curso atual do rio Negro na origem da diversidade regional em alguns grupos de aves**. Dissertação de mestrado. Instituto De Pesquisas da Amazônia. (Programa de Pós-Graduação em Genética, Conservação E Biologia Evolutiva). 2015.

POLZIN, Tobias; DANESHMAND, Siavash Vahdati. On Steiner trees and minimum spanning trees in hypergraphs. **Operations Research Letters**, v. 31, n. 1, p. 12-20, 2003. RIBEIRO, A C. **Tectonic history and the biogeography of the freshwater fishes from the coastal drainages of eastern Brazil: an example of faunal evolution associated with a divergent continental margin**. *Neotropical Ichthyology*, v. 4, n. 2, p. 225-246. 2006.

ROCHA, M. S.; LAZZAROTTO, H.; PY-DANIEL, L. R.. **A new species of *Scoloplax* with a remarkable new tooth morphology within Loricarioidea (Siluriformes: Scoloplacidae)**. *Copeia*, v. 2012, n. 4, p. 670-677. 2012.

ROCHA, M. S.; OLIVEIRA, R. R. de; PY-DANIEL, LÚCIA H. R.. ***Scoloplax baskini*: a new spiny dwarf catfish from rio Aripuanã, Amazonas, Brazil (Loricarioidei: Scoloplacidae)**. *Neotropical Ichthyology*, v. 6, n. 3, p. 323-328. 2008.

ROSSETTI, D. DE F.; DE TOLEDO, P. M.; GÓES, A. M.. **New geological framework for Western Amazonia (Brazil) and implications for biogeography and evolution**. *Quaternary research*, v. 63, n. 1, p. 78-89. 2005.

SAVAGE, J.M.. **Systematics and the biodiversity crisis**. *BioScience*, 45. p. 637- 679. 1995.

SCHAEFER, S. A. **Family Scoloplacidae (Spiny dwarf catfishes)**. In: REIS, R. E., KULLANDER S. O. & C. J. FERRARIS, JR. (eds.). Checklist of the freshwater fishes of South and Central America. EDIPUCRS, Porto Alegre, Brazil. p. 310-311. 2003.

SCHAEFER, S. A.; WEITZMAN, S. H.; BRITSKI, H. A. **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, p. 181-211. 1989.

TAMURA, K. et al. **MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0**. Molecular biology and evolution, p. mst197. 2013.

VRBA, E. S. **Mammals as a key to evolutionary theory**. Journal of Mammalogy, v. 73, n. 1, p. 1-28. 1992.

WALLACE, Alfred Russel. **The Geographical Distribution of Animals: With a Study of the Relations of Living and Extinct Faunas as Elucidating the Past Changes of the Earth's Surface: In Two Volumes**. 1876.