

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA EVOLUTIVA E BIOLOGIA  
MOLECULAR**

**CESAR AUGUSTO DOS SANTOS**

***DNA BARCODING DO GÊNERO SCHIZODON (CHARACIFORMES,  
ANOSTOMIDAE)***

**SÃO CARLOS  
2018**

**CESAR AUGUSTO DOS SANTOS**

***DNA BARCODING DO GÊNERO SCHIZODON (CHARACIFORMES,  
ANOSTOMIDAE)***

**Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestrado em Ciências.**

**Orientador: Dr. Pedro Manoel Galetti Junior**

**Co-orientador: Dr. Jorge Luis Ramirez Malaver**

**SÃO CARLOS**

**2018**



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Biológicas e da Saúde  
Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular

---

Folha de Aprovação

---

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa da Dissertação de Mestrado do candidato Cesar Augusto dos Santos, realizada em 28/08/2018:

---

Prof. Dr. Pedro Mancel Galeffi Júnior  
UFSCar

---

Prof. Dr. Orlando Moreira Filho  
UFSCar

---

Prof. Dra. Ana Lúcia Dias  
UEL

Dedico aos meus pais: Cicero Miguel dos Santos e Roseli Prestes dos Santos, razão de minha existência.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a minha esposa Alessandra Heloisa Garcia e filho Miguel Augusto Garcia dos Santos, pela compreensão com a minha ausência no percurso desse trabalho, sendo meu porto seguro em períodos mais conturbados. Aos meus pais Cicero Miguel dos Santos e Roseli Prestes dos Santos, pelas cobranças para alcançar o término desse mestrado e auxílios, mostrando sempre que amor e a preocupação com os filhos não tem idade.

Ao meu orientador Dr. Pedro Manoel Galetti Junior e co-orientador Dr. Jorge Luis Ramirez Malaver pela oportunidade da vivência científica e grandes ensinamentos. À Dra. Carolina de Barros Machado da Silva por me inserir nesse mundo científico, ensinado sempre com dedicação e sabedoria.

Aos amigos do Laboratório de Genética e Conservação da UFSCar: Dr. Bruno Henrique Saranholi, Ms. Rosane Santos, Ms. Paola Andrea Ayala Burbano, Marina Elisa de Oliveira, Dra. Maria Tereza Thomé e Dra. Karen Rodríguez Castro entre outros, pelo apoio, companheirismo e pelo incentivo amigo para romper os obstáculos desse mestrado.

À mestranda Nayra Rodrigues pelo apoio técnico de bancada e a Ms. Carmen Elena Barragán Ruiz pela ajuda com os Mapas desse trabalho.

À Universidade Federal de São Carlos, através do Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular (PPGGEv), pela oportunidade concedida aos professores para formação acadêmica.

"O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001"

“Feliz aquele que transfere o que sabe e aprende o que ensina.”

Cora Coralina

## RESUMO

Os peixes do gênero *Schizodon* possuem representação importante nas maiores bacias da América do Sul. Historicamente passaram por várias revisões taxonômicas, devido à alta plasticidade fenotípica e os caracteres ontogênicos encontrados entre as espécies desse grupo. O objetivo desse trabalho foi avaliar a congruência entre as unidades moleculares (MOTUs) e as denominações das espécies nominais de *Schizodon* reconhecidas como válidas na presente taxonomia, utilizando a ferramenta *DNA barcoding*. Foi realizada a extração do DNA e a amplificação e análise da região COI de 68 amostras; adicionalmente, 19 sequências disponíveis no BOLD system foram adicionadas à análise. Para edição das sequências e alinhamento fez-se uso do programa *CodonCode Aligner*. As distâncias genéticas foram calculadas no software MEGA 7, usando o modelo de substituição K2P (Kimura 2-Parâmetros). Para a delimitação de espécies baseada em distância, utilizou-se o método *DNA barcoding* com três valores diferentes de *thresholds* (2%, 1,4% e 1%). Embora evidenciando diferentes números de MOTUs, os resultados foram congruentes em sugerir uma possível sinonímia de *S. jacuiensis* e *S. platae*. Com os *thresholds* 1,4% e 1%, *S. vittatus* subdividiu-se em duas MOTUs, evidenciando a existência de uma espécie críptica dentro dessa denominação. Esses resultados foram corroborados na análise de delimitação de espécies do GMYC (*Generalized Mixed Yule-coalescent*). Assim, os achados desse trabalho mostram que há discordâncias e concordâncias entre as unidades moleculares e a taxonomia atualmente válida para o gênero, indicando a necessidade de uma revisão taxonômica extensa, utilizando ferramentas morfológicas e moleculares que incluam diferentes genes, para uma melhor decisão sobre o status taxonômico dentro do gênero *Schizodon*.

**Palavras-Chaves:** *DNA barcoding*, peixe, delimitação de espécie, GMYC, MOTU

## ABSTRACT

Fish of the *Schizodon* genus have important representation in the largest South American basins. Historically they underwent through several taxonomic revisions, due to their high phenotypic plasticity and the ontogenetic characters found among the species of this group. The goal of this work was to evaluate the congruence between the molecular units (MOTUs) and the nominal species currently valid, using the DNA barcoding and coalescent methods. DNA extraction, amplification and analysis of the mitochondrial COI region from 68 samples were performed; additionally, 19 sequences available on the BOLD system were added to the analyses. The CodonCode Aligner program was used to edit the sequences and alignment. The genetic distances were calculated in the MEGA 7 software, using the K2P model (Kimura 2-Parameters). For the distance-based species delimitation, the DNA barcoding method was used with three different values of thresholds (2%, 1.4% and 1%). Although evidencing different numbers of MOTUs, the results were congruent in suggesting a possible synonymy of *S. jacuiensis* and *S. platae*. With the thresholds 1.4% and 1%, *S. vittatus* was subdivided into two MOTUs, evidencing the existence of a potential cryptic species. These results were corroborated in the GMYC (Generalized Mixed Yule-coalescent) species delimitation analysis. Thus, the findings of this work show that there are disagreements between the molecular units and the currently valid taxonomy for the genus. This indicates that an extensive taxonomic revision, using morphological and molecular tools, which include different genes, is still needed for a better decision on the taxonomic status within the *Schizodon* genus.

**Keywords:** *DNA barcoding*, fish, species delimitation, GMYC, MOTU.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1. Mapa de distribuição dos pontos amostrais nas bacias hidrográficas da América do Sul, pertencentes das coletas em campo (Tabela 1) e amostragem do BOLD (Tabela 2)..... 16
- Figura 2. Gráfico de quadrantes considerando 627 nucleotídeos por sequências com os dados nominais e *threshold* de 2% (A) 1,4% (B) e 1% (C). .....23
- Figura 3. Árvore ultramétrica bayesiana, gerada no software BEAST v2.5.0, mostrando diferentes abordagens de delimitação de espécies baseada no marcador mitocondrial COI. Círculos pretos nos nós representam valores de probabilidade maiores que 0,9. ....28
- Figura 4. Distribuição de espécies nominais concordante (A) e discordantes (B) com a delimitação de MOTUS estimadas pelo GMYC. ....29

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Locais de coleta do gênero <i>Schizodon</i> na América do Sul. ....	16
Tabela 2. Espécimes do gênero <i>Schizodon</i> obtido na BOLD. ....	19
Tabela 3. Média das distâncias intraespecífica (em negrito) e interespecífica, por meio do modelo K2P, entre as dez espécies de <i>Schizodon</i> . ....	22
Tabela 4. MOTUS do gênero <i>Schizodon</i> determina pelo método de distância utilizando como <i>threshold</i> 2%, 1,4% e 1%. ....	26

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>10</b>
1.1 <i>DNA BARCODING E A IDENTIFICAÇÃO DE ESPÉCIES NO GÊNERO SCHIZODON</i> .....	11
<b>2. OBJETIVO GERAL</b> .....	<b>14</b>
<b>3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b> .....	<b>14</b>
<b>4. METODOLOGIA</b> .....	<b>15</b>
4.1. COLETA DO MATERIAL .....	15
4.2 EXTRAÇÃO DE DNA, AMPLIFICAÇÃO, PURIFICAÇÃO E SEQUENCIAMENTO DO GENE COI .....	18
4.3 ANÁLISE DE DADOS .....	18
<b>5. RESULTADOS</b> .....	<b>22</b>
<b>6. DISCUSSÃO</b> .....	<b>30</b>
<b>7. CONCLUSÕES</b> .....	<b>34</b>
<b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>35</b>

## 1. INTRODUÇÃO

A diversidade biológica sempre passou por grandes extinções ao longo de eras geológicas e atualmente a ação antrópica faz aumentar a taxa de desaparecimento das espécies. Na corrida para a preservação, diversos atributos são abordados em seus programas, sendo a diversidade genética da espécie uma condição crítica que pode impactar na perpetuação do organismo alvo (FRANKHAM et al., 2008). Assim, o conhecimento da diversidade genética nas regiões de ocorrência natural do organismo e toda a sua condição biológica, são parte de um conjunto de informações vinculadas a tomada de decisão de ações de conservação.

Entre as informações a serem levantadas para melhor conhecer o animal, está a correta classificação taxonômica da espécie. Atualmente, a taxonomia é baseada em caracteres morfológicos e esses caracteres podem variar ontogeneticamente e plasticamente. No caso do gênero *Schizodon* essa variação é comum, como em outros gêneros da família Anostomidae (NAKATANI et al., 2003; SIDLAUSKAS; GARAVELLO; JELLEN, 2007), que é composta por 15 gêneros de peixes fusiformes de águas continentais, encontrados exclusivamente na região neotropical e constituída por aproximadamente 145 espécies válidas (REIS, R. E.; KULLANDER, S. O.; FERRARIS JR., 2003; ESCHMEYER; FONG, 2017; RAMIREZ; BIRINDELLI; GALETTI, 2017). A validação da espécie, vem em resposta as diferentes considerações taxonômicas clássicas e filogenéticas, que, no caso do gênero *Schizodon*, sofreram muitas mudanças ao longo dos anos, permanecendo com 15 espécies válidas (REIS, R. E.; KULLANDER, S. O.; FERRARIS JR., 2003).

Conhecido como ximborê, taguara, piava, araqu, boga, entre outras variações de acordo com a região e espécie, o *Schizodon* é um gênero de peixes que habita diversas bacias da América do Sul, com maior representatividade nas bacias dos rios Paraná, Paraguai e Uruguai. As espécies desse gênero foram descritas de acordo com a presença ou ausência de listras e manchas ao longo das escamas do corpo do animal, bem como por valores merísticos característicos (NAKATANI et al., 2003; SANTOS, 1980; SIDLAUSKAS; GARAVELLO; JELLEN, 2007; SIDLAUSKAS; VARI, 2008). De importância para a pesca, todas as espécies são encontradas nas diversas bacias hidrográficas brasileiras (SIDLAUSKAS; GARAVELLO; JELLEN, 2007), com seu principal representante o *S. fasciatus* (LOPES; LEAL, 2010; SOUZA et al., 2014). São peixes de médio e grande porte, que possuem comportamento migratório e

habitam preferencialmente as calhas dos rios, podendo ser encontrados em ambientes lóticos (BRITTO et al., 2006). O hábito alimentar vegetariano, os enquadra entre os consumidores primários na cascata trófica dos rios (BENNEMANN; CASATTI; OLIVEIRA, 2006; YABE; BENNEMANN, 1994).

O conhecimento do grupo de espécies de *Schizodon* é basicamente construído na taxonomia clássica que, em diversas vezes, foi questionada por divergência das observações de seus caracteres morfológicos ou pelas características ontogenéticas comuns nesse grupo, variando de acordo com a fase de desenvolvimento (ABREU, 2013; SANTOS, 1980; SIDLAUSKAS; GARAVELLO; JELLEN, 2007).

### 1.1 *DNA barcoding* e a identificação de espécies no gênero *Schizodon*

O *DNA barcoding*, proposto por Hebert et al. (2003), é uma ferramenta da biologia molecular que visa identificar um organismo por meio de uma sequência de nucleotídeos do genoma, especificamente o *Citocromo C Oxidase subunidade I* (COI) do DNA mitocondrial para a maioria dos animais. De importância fundamental na respiração celular, o gene COI apresenta taxa mutacional estável pela demanda adaptativa e ação deletéria dos polimorfismos, ausência de *íntrons* e variabilidade genética favorável à distinção intra e interespecífica, com ampla distribuição em todo o organismo e em quantidade significativa por célula (HEBERT; RATNASINGHAM; DE WAARD, 2003). Nas plantas, entretanto, são empregados os genes do cloroplasto (*rbcla*, *rbclb* e *matk*); para os fungos, a região ITS (Internal Transcribed Spacer) do DNA ribossômico e, em insetos, o gene 28S (BANDYOPADHYAYA et al., 2013).

Assim, a sequência *barcode* de uma espécie pode ser comparada a outras sequências de outros organismos relacionados, encontrados em banco de dados, como o caso do BOLD – The *Barcoding of Life Database System* (RATNASINGHAM; HEBERT, 2007). Quando observado estatisticamente a divergência entre as sequências, o valor levantado é denominado distância genética entre os espécimes; a premissa do *DNA barcoding* é que quanto maior é o número de diferenças entre as sequências maior a distância entre os organismos. Assim, a análise das sequências propõe estimar comparativamente a divergência genética, menor entre os indivíduos de uma mesma unidade taxonômica do que entre representantes de distintas espécies (HEBERT et al., 2004), independente das características morfológicas.

Essa abordagem foi estruturada em 2004 com o surgimento do *Consortium for the Barcoding of Life* (CBOL) ([www.barcoding.si.edu](http://www.barcoding.si.edu)), que objetiva favorecer a

viabilidade da ferramenta para a pesquisa taxonômica, garantindo a identificação concreta dos espécimes (MARSHALL, 2005; RATNASINGHAM; HEBERT, 2007). As sequências COI registradas no BOLD *Systems* fez desse método a referência no campo da identificação molecular, visto que suas diferenças mutacionais são principalmente significativas após a especiação e o distanciamento genético (HEBERT; RATNASINGHAM; DE WAARD, 2003).

O *DNA barcoding* apresenta características que fundamentam sua viabilidade, tais como: a amostragem é possível com poucas células; é facilmente replicável por métodos já bem conhecidos de extração e PCR; e apresenta resultado rápido e econômico (HEBERT et al., 2003). Essa abordagem tem crescido num processo de reconhecimento da técnica para diversos fins, além do que inicialmente idealizado por Hebert et al. (2003), levando o uso da identificação de espécie (RATNASINGHAM; HEBERT, 2007) para diversas finalidades (HENTER et al., 2016; HUBERT; HANNER, 2015; NAAUM et al., 2015; NETO, 2013).

Entre as principais limitações podemos mencionar a herança materna do DNA mitocondrial, podendo criar falsos resultados no caso de hibridação; a potencial presença de cópias do genoma nuclear (*numts*); a extinção dos caracteres polimórficos pela redução efetiva populacional; e a história evolutiva recente, quando o tempo não foi suficiente para acumular as mutações no gene COI de diferentes espécies (HEBERT; RATNASINGHAM; DE WAARD, 2003; WARD; HANNER; HEBERT, 2009).

Quando proposto para a identificação de linhagem genética, o *DNA barcoding* é uma ferramenta que supera os problemas taxonômicos ocasionadas pelo uso de caracteres morfológicos. Em casos de amostra biológica fragmentada ou desconhecida, o *barcode* serve para representar o organismo, como método de rápida identificação e independente da etapa/fase do desenvolvimento do espécime (MOREIRA, 2015).

O uso de técnicas alternativas para auxiliar na taxonomia vem sendo sugerido há algumas décadas. Para o gênero *Schizodon*, as primeiras abordagens usaram métodos citogenéticos (MARTINS; GALETTI, 2000); recentemente, o *DNA barcoding* mostrou ser uma ferramenta viável para identificação e delimitação de espécies na família Anostomidae (RAMIREZ; GALETTI, 2015).

A outra abordagem para a delimitação de espécies está baseada em um método filogenético coalescente: *Generalized Mixed Yule Coalescent* (GMYC - PONS

et al., 2006). Essa abordagem utiliza os comprimentos de ramos de uma árvore ultramétrica, isto é, que considera que os táxons estão igualmente distantes da raiz para estabelecer as relações intra (eventos de coalescência) e interespecíficas (eventos de extinção e especiação). Por utilizar uma função de verossimilhança, que modela os processos evolutivo de interesse, o GMYC representa uma vantagem nas críticas de métodos de delimitação baseados em distância. A plasticidade fenotípica apresentada em alguns caracteres comuns usados na identificação taxonômica, a existência de espécies crípticas e a restrição das chaves morfológicas para um único estágio do ciclo de vida justificam a utilização do *DNA barcoding* no gênero *Schizodon* (RAMIREZ, 2015).

## **2. OBJETIVO GERAL**

O presente estudo tem como objetivo a delimitação de espécie com uso da análise de *DNA barcoding* de um grupo de espécies nominais pertencentes ao gênero *Schizodon*, família Anostomidae.

## **3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

Levando em conta a viabilidade dessa técnica para identificar e caracterizar diferentes espécies de peixes Neotropicais e a necessidade de informações moleculares sobre a diversidade desse grupo, este trabalho tem como objetivos específicos:

- . Avaliar a congruência entre a taxonomia vigente e os dados moleculares;
- . Revelar possíveis casos de espécies crípticas ou, ao contrário, de sinonímia.

#### 4. METODOLOGIA

##### 4.1. Coleta do Material

A coleta de peixes de diferentes espécies do gênero *Schizodon* ocorreu em diversas bacias da América do Sul, apresentadas na Figura 1. As amostras biológicas consistiram de fragmentos de nadadeiras e de tecidos musculares e estão depositadas no banco de tecidos do Laboratório de Biodiversidade Molecular e Conservação - LabBMC, UFSCar, São Carlos – SP (Tabela 1). No total, foram amostrados 68 espécimes de *Schizodon*, sendo que 23 indivíduos *vouchers* foram depositados no Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo (MZUSP), Museu de Ciências e Tecnologia da PUCRS (MCP), *Museo de Historia Natural de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos* (MUSM), *Instituto de Ciencias Naturales, Museo de Historia Natural, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia* (ICNMHN), Coleção ictiológica do Laboratório de Ictiologia Sistemática da UFSCar (LISDEBE), no museu de Ictiologia do Departamento de Ecologia e Biologia Evolutiva, da UFSCar. As amostras foram então fixadas e armazenadas a 4°C até posteriores análises moleculares.

Figura 1. Mapa de distribuição dos pontos amostrais nas bacias hidrográficas da América do Sul, pertencentes das coletas em campo (Tabela 1) e amostragem do BOLD (Tabela 2).

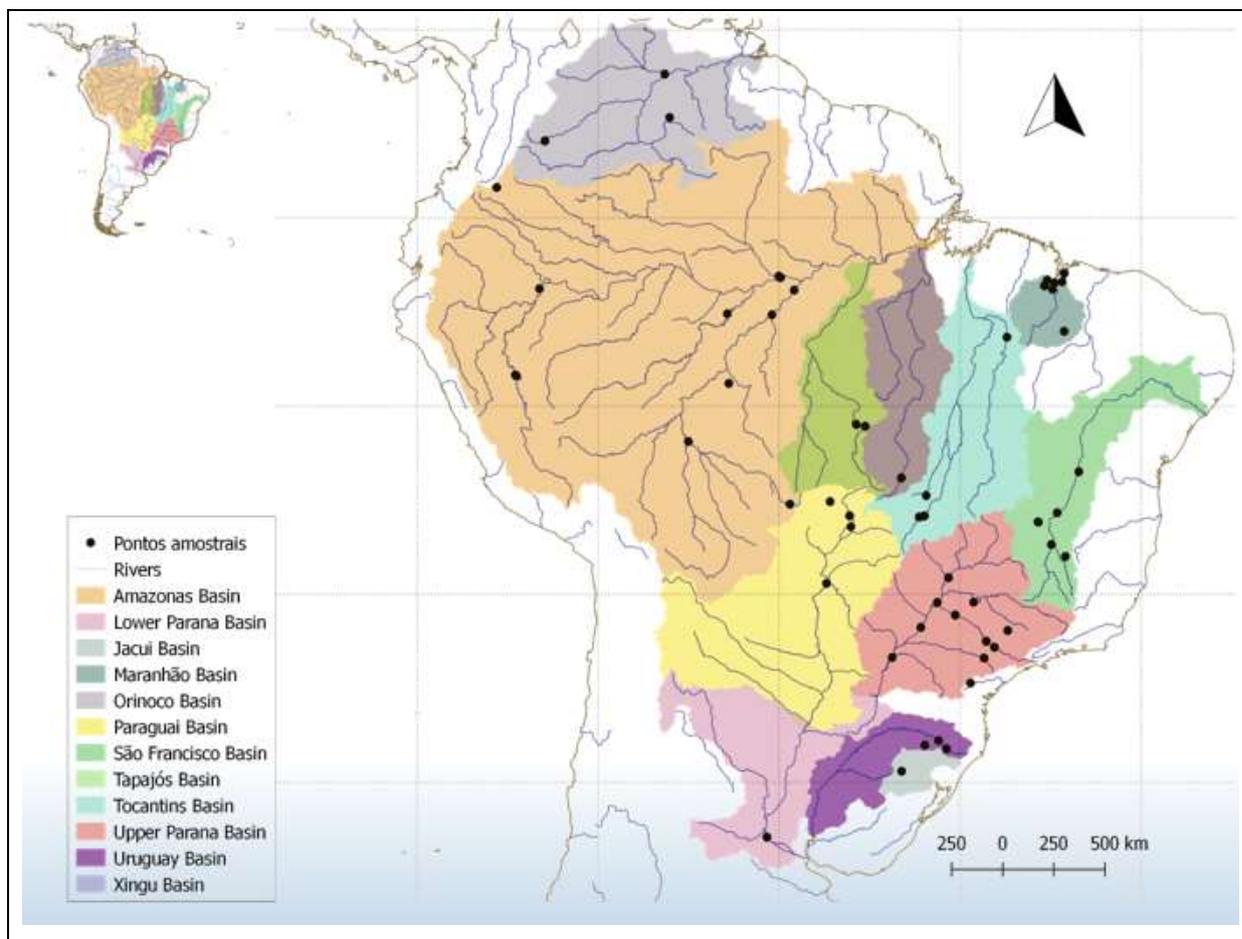


Tabela 1. Locais de coleta do gênero *Schizodon* na América do Sul.

Bacia Hidrográfica	Rio	Espécie	Coordenadas Latitude	Geográficas Longitude
Alto Paraná	Turvo	<i>Schizodon intermedius</i>	-20.423333333	-49.254611111
Alto Paraná	Paraná	<i>Schizodon borellii</i>	-23.360780556	-53.753416667
Alto Paraná	Tiete	<i>Schizodon intermedius</i>	-22.501975	-48.554511111
Alto Paraná	Tiete	<i>Schizodon intermedius</i>	-22.501975	-48.554511111
Alto Paraná	Tiete	<i>Schizodon intermedius</i>	-22.501975	-48.554511111
Alto Paraná	Paraná	<i>Schizodon intermedius</i>	-21.763763889	-52.169152778
Alto Paraná	Mogi-Guaçu	<i>Schizodon nasutus</i>	-21.927388889	-47.366222222
Alto Paraná	Turvo	<i>Schizodon nasutus</i>	-24.722316667	-49.425691667
Alto Paraná	Rio Claro	<i>Schizodon nasutus</i>	-19.118305556	-50.643805556
Alto Paraná	Rio Claro	<i>Schizodon nasutus</i>	-19.118305556	-50.643805556
Alto Paraná	Rio Claro	<i>Schizodon nasutus</i>	-19.118305556	-50.643805556
Alto Paraná	Rio Claro	<i>Schizodon nasutus</i>	-19.118305556	-50.643805556

Alto Paraná	Rio Claro	<i>Schizodon nasutus</i>	-19.1183055556	-50.6438055556
Alto Paraná	Rio Claro	<i>Schizodon nasutus</i>	-19.1183055556	-50.6438055556
Alto Paraná	Rio Mogi-Guaçu	<i>Schizodon nasutus</i>	-21.9266111111	-47.3674611111
Alto Paraná	Paranapanema	<i>Schizodon intermedius</i>	-23.3942388889	-48.6759111111
Amazônica	Turiaçu	<i>Schizodon fasciatus</i>	-5.09614166667	-62.8632972222
Amazônica	Ucayali	<i>Schizodon fasciatus</i>	-8.38805555556	-74.5280555556
Amazônica	Ucayali	<i>Schizodon fasciatus</i>	-8.38805555556	-74.5280555556
Amazônica	Yarinacocha	<i>Schizodon fasciatus</i>	-8.35055555556	-74.5766666667
Amazônica	Amazonas	<i>Schizodon fasciatus</i>	-3.765	-73.2458333333
Amazônica	Orteguaza	<i>Schizodon fasciatus</i>	1.61724444444	-75.6074888889
Amazônica	Rio Preto	<i>Schizodon fasciatus</i>	-8.79435277778	-62.7783888889
Amazônica	Lago Catalão	<i>Schizodon fasciatus</i>	-3.17196388889	-59.9222472222
Amazônica	Lago Catalão	<i>Schizodon fasciatus</i>	-3.17196388889	-59.9222472222
Amazônica	Guaporé	<i>Schizodon fasciatus</i>	-15.2160055556	-59.4039694444
Amazônica	Aripuanã	<i>Schizodon fasciatus</i>	-5.14880555556	-60.3973055556
Amazônica	Lago Sampaio	<i>Schizodon fasciatus</i>	-3.84	-59.1697222222
Amazônica	Mamoré	<i>Schizodon fasciatus</i>	-11.8833333333	-65.0166666667
Jacuí	Jacuí	<i>Schizodon jacuiensis</i>	-29.4077777778	-53.2305555556
Maranhão	Itapecuru	<i>Schizodon dissimilis</i>	-3.39283333333	-44.3613805556
Maranhão	Pindaré	<i>Schizodon dissimilis</i>	-3.60251666667	-45.3389166667
Maranhão	Pindaré	<i>Schizodon dissimilis</i>	-3.60251666667	-45.3389166667
Maranhão	Pindaré	<i>Schizodon dissimilis</i>	-3.60251666667	-45.3389166667
Maranhão	Pindaré	<i>Schizodon dissimilis</i>	-3.60251666667	-45.3389166667
Maranhão	Lago Açú	<i>Schizodon dissimilis</i>	-3.78933055556	-44.8973055556
Maranhão	Pindaré	<i>Schizodon dissimilis</i>	-3.60251666667	-45.3389166667
Maranhão	Pindaré	<i>Schizodon dissimilis</i>	-3.60251666667	-45.3389166667
Maranhão	Lagoa Cajari	<i>Schizodon dissimilis</i>	-3.30148333333	-45.1819555556
Maranhão	Mearim	<i>Schizodon dissimilis</i>	-3.45085833333	-44.783425
Orinoco	Meta	<i>Schizodon scotorhabdotus</i>	4.09273333333	-72.9423583333
Orinoco	Meta	<i>Schizodon scotorhabdotus</i>	4.09273333333	-72.9423583333
Paraguai	Bugres	<i>Schizodon borellii</i>	-15.0763611111	-57.1843333333
Paraguai	Cuiabá	<i>Schizodon borellii</i>	-15.8364277778	-56.1029722222
Paraguai	Paraguai	<i>Schizodon borellii</i>	-15.8365	-56.1029722222
Paraguai	Cuiabá	<i>Schizodon borellii</i>	-16.4108805556	-56.0336
Paraguai	Paraguai	<i>Schizodon borellii</i>	-19.4197388889	-57.3801305556
Paraguai	Paraguai	<i>Schizodon borellii</i>	-19.4197388889	-57.3801305556
São Francisco	São Francisco	<i>Schizodon knerii</i>	-17.3567222222	-44.9534777778
São Francisco	Urucuia	<i>Schizodon knerii</i>	-16.1515555556	-45.6941
São Francisco	Pandeiros	<i>Schizodon knerii</i>	-15.6716666667	-44.63675
São Francisco	Curimataí	<i>Schizodon knerii</i>	-17.9924722222	-44.1799055556
São Francisco	Rio São Francisco	<i>Schizodon knerii</i>	-13.4872222222	-43.4383333333
Tapajós	Teles Pires	<i>Schizodon vittatus</i>	-11.0733333333	-55.2430555556
Tapajós	Teles Pires	<i>Schizodon vittatus</i>	-10.975	-55.7341666667
Tocantins	Tocantins	<i>Schizodon vittatus</i>	-6.34366388889	-47.4110833333
Tocantins	Araguaia	<i>Schizodon vittatus</i>	-14.76	-51.8738888889

Tocantins	Araguaia	<i>Schizodon vittatus</i>	-15.8355555556	-51.975
Tocantins	Araguaia	<i>Schizodon vittatus</i>	-15.8355555556	-51.975
Tocantins	Araguaia	<i>Schizodon vittatus</i>	-15.8355555556	-51.975
Tocantins	Araguaia	<i>Schizodon vittatus</i>	-15.8951027778	-52.2545722222
Tocantins	Araguaia	<i>Schizodon vittatus</i>	-15.8951027778	-52.2545722222
Tocantins	Araguaia	<i>Schizodon vittatus</i>	-15.8951027778	-52.2545722222
Uruguai	Pelotas	<i>Schizodon nasutus</i>	-27.7755	-51.1950833333
Uruguai	Pelotas	<i>Schizodon nasutus</i>	-28.2137777778	-50.7562777778
Uruguai	Vacas Gordas	<i>Schizodon nasutus</i>	-28.0209722222	-51.9502777778
Xingu	Culuene	<i>Schizodon vittatus</i>	-13.8171722222	-53.2464694444
Xingu	Culuene	<i>Schizodon vittatus</i>	-13.8171722222	-53.2464694444

#### 4.2 Extração de DNA, amplificação, purificação e sequenciamento do gene COI

O DNA genômico foi então extraído da amostra biológica utilizando o protocolo fenol: clorofórmio proposto por Sambrook; Fritsch; Maniatis (1989). Para o *DNA barcoding* foi amplificado 650 pares de base do gene mitocondrial COI a partir dos *primers* AnosCOIF (5'-ACAAACCACAAAGAYATYGG-3') e AnosCOIR (5'-TCWGGGTGACCAAARAATCA-3') (RAMIREZ; GALETTI, 2015). A amplificação do gene COI foi realizada em meio a solução (5 µL 5X de GOTAQ (Buffer-1X); 13,3 µL de água mili-Q; 2µL de dNTPs (0,2 mM); 0,5 µL de MgCl<sub>2</sub> (1 mM), 1µL de cada primer (0,4mM) e 0,2 µL de Taq polimerase (1 U/mL) -Life Technologies) completando com água Mili-Q um volume final de 25 µL. As reações de PCR foram conduzidas no termociclador *Veriti® 96 Well Thermal Cycler - Applied Biosystems* nas seguintes condições: uma etapa inicial de 94 °C por 5 minutos, seguida de 35 ciclos contendo a desnaturação do DNA a 92 °C por 45 segundos, hibridação dos *primers* a 51°C por 45 segundos e extensão das sequencias à 72°C por 45 segundos, finalizando com 72 °C por 10 minutos. A verificação dos produtos de PCR foi feita em gel de agarose a 1% e a purificação foi baseada no protocolo de polietilenoglicol (20%) (KUSUKAWA et al., 1990). O sequenciamento foi realizado utilizando o método Sanger em sequenciador automático AB13730XL, *Applied Biosystems*, nos sentidos *forward* e *reverse*.

#### 4.3 Análise de dados

As espécies foram identificadas com uso de artigos de descrição das espécies de *Schizodon*. Juntamente com os fragmentos COI sequenciados, no presente estudo, foram incorporadas dezenove sequências do gênero obtidas no BOLD (ver Tabela 2), totalizando dez espécies nominais (*S. borelli*, *S. dissimilis*, *S. fasciatus*, *S.*

*intermedius*, *S. jacuiensis*, *S. knerii*, *S. nasutus*, *S. platae*, *S. scotorhabdotus* e *S. vittatus*).

Tabela 2. Espécimes do gênero *Schizodon* obtido na BOLD.

Bacia Hidrográfica	Rio	ID. Bold	Espécie	Coordenadas Latitude	Geográficas Longitude
Alto Paraná	Tietê	B014	<i>Schizodon intermedius</i>	-22.8204	-48.1041
Alto Paraná	Tietê	B015	<i>Schizodon intermedius</i>	-22.8204	-48.1041
Alto Paraná	Tietê	B016	<i>Schizodon nasutus</i>	-21.107	-50.2646
Alto Paraná	Tietê	B017	<i>Schizodon nasutus</i>	-21.107	-50.2646
Alto Paraná	Tietê	B018	<i>Schizodon nasutus</i>	-21.107	-50.2646
Alto Paraná	São José dos Dourados	B019	<i>Schizodon nasutus</i>	-20.4335	-51.2614
Amazonas	Amazonas	B011	<i>Schizodon fasciatus</i>	-3.1	-60.0167
Baixo Paraná	Paraná	B135	<i>Schizodon platae</i>	-32.9099	-60.6747
Baixo Paraná	Paraná	B136	<i>Schizodon platae</i>	-32.9099	-60.6747
Baixo Paraná	Paraná	B138	<i>Schizodon platae</i>	-32.9099	-60.6747
Baixo Paraná	Paraná	B139	<i>Schizodon platae</i>	-32.9099	-60.6747
Maranhão	Itapecuru	B022	<i>Schizodon dissimilis</i>	-2.94	-44.2408
Maranhão	Itapecuru	B023	<i>Schizodon dissimilis</i>	-2.94	-44.2408
Maranhão	Itapecuru	B024	<i>Schizodon dissimilis</i>	-2.94	-44.2408
Maranhão	Itapecuru	B025	<i>Schizodon dissimilis</i>	-2.94	-44.2408
Maranhão	Itapecuru	B027	<i>Schizodon dissimilis</i>	-6.02583	-44.2492
Orinoco	Manapiare	B156	<i>Schizodon scotorhabdotus</i>	5.34	-66.0515
Orinoco	Orinoco	B214	<i>Schizodon scotorhabdotus</i>	7.6366	-66.3178
São Francisco	Urucuia	B012	<i>Schizodon knerii</i>	-16.166	-45.673

O conjunto de dados foi editado e alinhado no programa *CodonCode Aligner*, (CodonCode Corporation, [www.codoncode.com](http://www.codoncode.com)) que resultou em um documento FASTA. As 87 sequências do gene COI foram analisadas para identificar a presença dos sítios polimórficos, inserção e deleção de nucleotídeos e *stop codons* pelo programa Mega7 (KUMAR; STECHER; TAMURA, 2016).

Para testar se cada espécie nominal forma uma única unidade molecular, foram utilizadas duas abordagens: *DNA barcoding* (HEBERT; RATNASINGHAM; DE WAARD, 2003) e análise GMYC (*Generalized Mixed Yule Coalescent* - PONS et al., 2006).

A abordagem *DNA barcoding* é baseada em distância genética. A premissa é que indivíduos de uma mesma espécie apresentam uma distância genética menor do que indivíduos pertencentes a outras espécies, dado um valor de *threshold* escolhido.

No presente trabalho foram utilizados três valores de *thresholds*: um sugerido para peixes Neotropicais, cujo valor é de 2% (PEREIRA et al., 2013), outro calculado a partir do presente conjunto de dados no pacote SPIDER (*SPecies IDentity and Evolution in R* – BROWN et al., 2012) e outro no valor de 1%, em acordo com os trabalhos desenvolvidos para os peixes da família Anostomidae (RAMIREZ; GALETTI, 2015). Pelo programa SPIDER, utilizando a função *localMinima* foi possível estimar como melhor *threshold* o valor de 1,4 %. A função *localMinima* usa uma matriz de distância comparando as sequências de maneira par-a-par, criando assim um objeto de densidade. Nesse objeto, cada mergulho na densidade das distâncias genéticas aponta a transição entre intra e interespecífico, conforme o *Barcoding gap*.

A partir desses três *thresholds* (2%, 1,4% e 1%) foi utilizado o software jMOTU (JONES; GHOORAH; BLAXTER, 2011) para estimar as unidades taxonômicas operacionais moleculares, MOTUs (BLAXTER et al., 2005; GALIMBERTI et al., 2012). As MOTUs são agrupamentos de sequências que não necessariamente correspondem a espécie. Esse conceito de unidades moleculares é comumente adotado no *DNA barcoding* e servirá para testar a hipótese de que a espécie nominal é um táxon válido.

No MEGA 7, foram calculadas as médias das distâncias genéticas intra e interespecífica, usando o modelo de substituição Kimura 2-Parâmetros (K2P) (KIMURA, 1980), e a opção *pairwise deletion* para o *Missing Data treatment*.

A análise pelo GMYC foi realizada no pacote SPLITs (*SPecies Limits by Threshold Statistics*) na plataforma R (<http://R-Forge.R-project.org>), utilizando único *threshold* e parâmetro de intervalo padrão (intervalo = c(1,10)).

Para estimar a árvore ultramétrica foi utilizado o *software* BEAST v2.5.0 (BOUCKAERT et al., 2014). O modelo de substituição nucleotídica foi selecionado com uso do programa jModeltest 2 (DARRIBA et al., 2012) utilizando o *Bayesian Information Criterion* (BIC). O modelo de substituição nucleotídica com a melhor probabilidade foi HKY+I+G. A árvore ultramétrica foi reconstruída utilizando o relógio relaxado do tipo *log normal* e como *prior* da árvore o modelo de *Yule*. Foram realizadas três corridas independentes, com 10 milhões de gerações cada, sendo uma árvore amostrada a cada 10 mil. No Tracer v1.6 (RAMBAUT A, SUCHARD MA, XIE D, 2014 - <http://beast.bio.ed.ac.uk/Tracer>), verificou a convergência apropriada dos parâmetros, considerando que os valores de ESS (*effective sample size*) devem ser maiores que 200. A combinação das corridas foi realizada a partir dos arquivos *log* e

*trees* utilizando LogCombiner v.2.5.0 (BOUCKAERT et al., 2014), com *burn-in* de 25%. O TreeAnotator foi utilizado para converter o arquivo *.trees* em um arquivo que foi visualizado no programa FigTree v1.4.3 (RAMBAUT A, SUCHARD MA, XIE D, 2014 - <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>).

## 5. RESULTADOS

Após o alinhamento e edição das sequências, foram obtidos 87 fragmentos do gene COI, sendo 68 adquiridos no presente estudo e 19 a partir do banco de dados BOLD. A média do comprimento desse fragmento foi de aproximadamente 608 pares de base (variando de 590 a 627), contendo 109 polimorfismos (105 parcimoniosamente informativos). Os polimorfismos ocorreram em sua maioria (87%) na terceira base do códon. Apenas uma das alterações foi não sinônima, com a única ocorrência na segunda posição do códon. Não foram encontradas inserções, deleções ou *stop codons*, sustentando a hipótese de que as origens dos fragmentos são de sequências funcionais e não pseudogenes do gene COI.

As médias das distâncias intra e interespecíficas são visualizadas na Tabela.3, onde todas as médias intraespecíficas foram menores que todos os *thresholds* (2%, 1,4% e 1,0%) usados nesse trabalho, exceto *S. vittatus* que apresenta um valor menor do que os *thresholds* 2% e 1,4%, porém maior que 1%. A comparação *S. platae* - *S. jacuiensis* mostrou uma distância interespecífica menor que todos os valores de *thresholds* empregados.

Tabela 3. Média das distâncias intraespecífica (em negrito) e interespecífica, por meio do modelo K2P, entre as dez espécies de *Schizodon*.

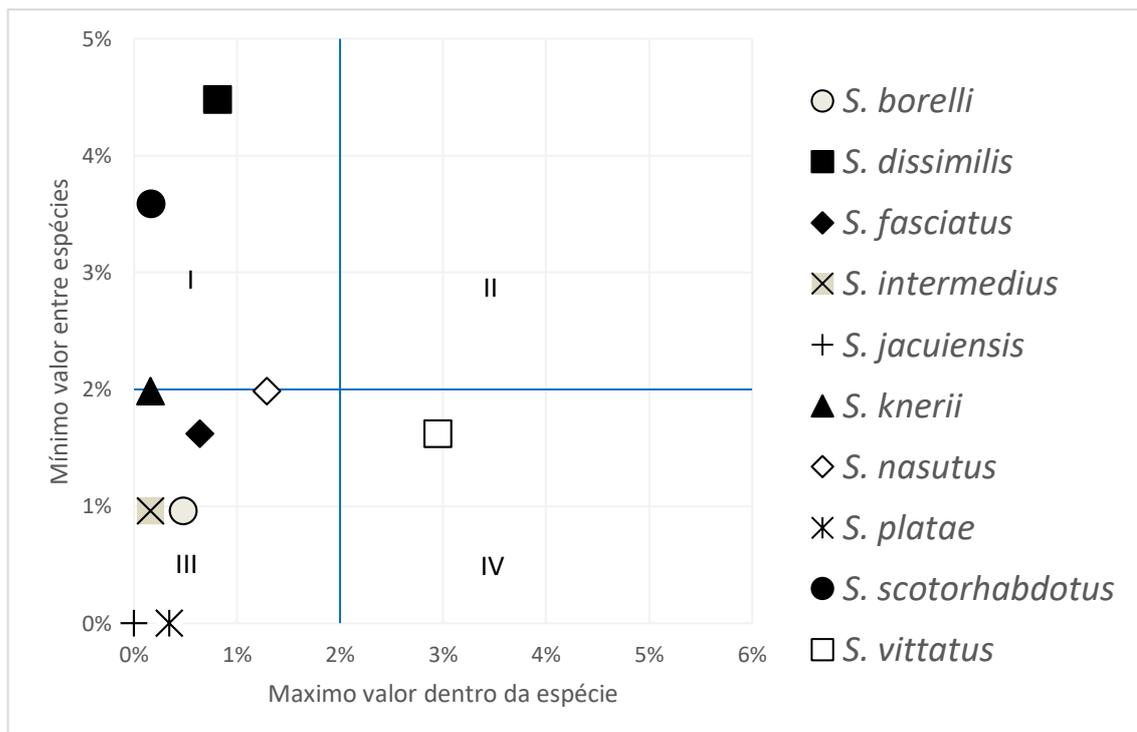
Espécies	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1 <i>S. borelli</i>	<b>0,002</b>									
2 <i>S. dissimilis</i>	0,054	<b>0,004</b>								
3 <i>S. fasciatus</i>	0,028	0,052	<b>0,002</b>							
4 <i>S. intermedius</i>	0,011	0,054	0,027	<b>0,000</b>						
5 <i>S. jacuiensis</i>	0,095	0,120	0,105	0,099	<b>n/c</b>					
6 <i>S. knerii</i>	0,084	0,101	0,091	0,092	0,074	<b>0,001</b>				
7 <i>S. nasutus</i>	0,089	0,098	0,089	0,092	0,069	0,023	<b>0,006</b>			
8 <i>S. platae</i>	0,093	0,119	0,103	0,096	0,001	0,072	0,068	<b>0,002</b>		
9 <i>S. scotorhabdotus</i>	0,047	0,055	0,042	0,043	0,102	0,086	0,081	0,102	<b>0,001</b>	
10 <i>S. vittatus</i>	0,033	0,055	0,026	0,031	0,099	0,090	0,086	0,097	0,047	<b>0,013</b>

Para evitar superestimar a variação entre as espécies, pelo uso de distâncias médias, foi adotada a comparação entre as distâncias mínima interespecífica e máxima intraespecífica, resultando em um gráfico de quadrantes (Figura 2). As espécies situadas no quadrante I, apresentam o valor máximo intraespecífico sempre menor que o *threshold* e o valor mínimo interespecífico sempre maior, indicando que os dados moleculares estão em concordância com a taxonomia vigente. O quadrante

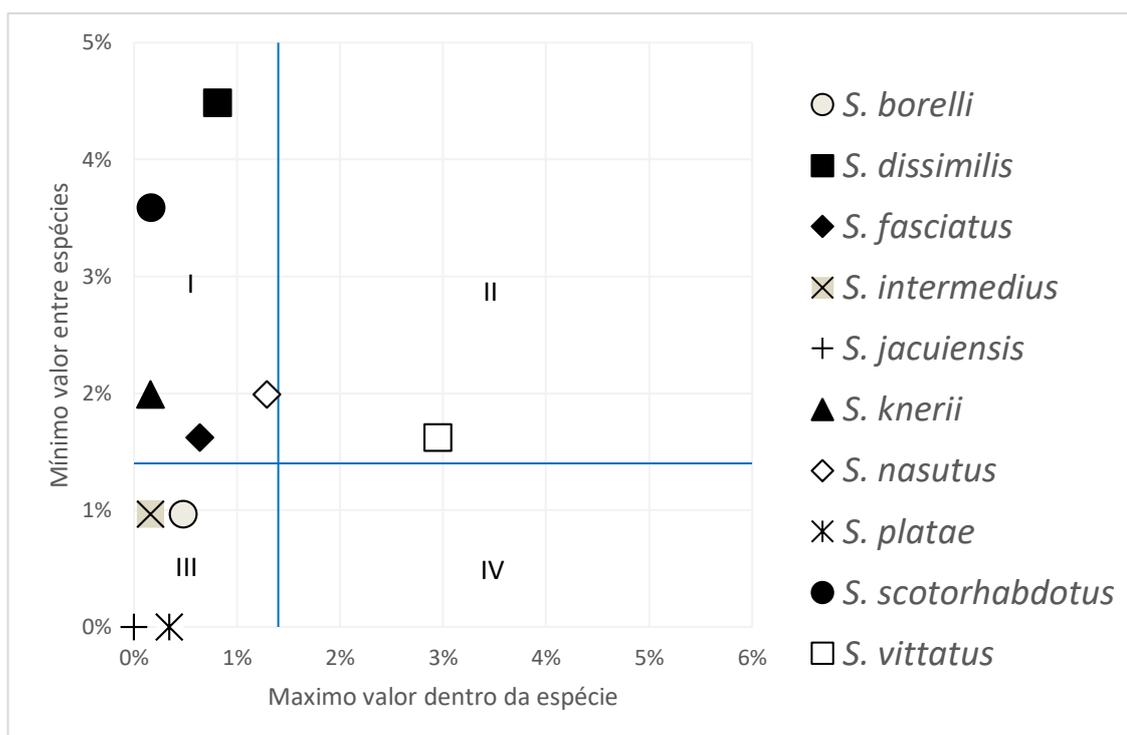
II contém táxon com valores intra e interespecífico maiores que o *threshold*, indicando presença de espécies crípticas. No quadrante III, estão os casos de baixos valores intra e interespecífico das distâncias genéticas, que podem indicar uma situação de especiação recente, sinonímia ou hibridização. Por fim, no quadrante IV estão representados os casos que mostram um alto valor intraespecífico e baixo valor interespecífico, indicando não congruência entre a taxonomia vigente e os dados moleculares. Quando empregado o *threshold* 2%, *S. vittatus* mostra um alto valor intraespecífico (quadrante IV), enquanto *S. borelli*, *S. borelli*, *S. intermedius*, *S. jacuiensis*, *S. platae* apresentam baixos valores intra e interespecíficos (quadrante III). Os resultados são similares com o valor de *threshold* 1,4%, mas *S. vittatus* passa a evidenciar um típico caso de ocorrência de espécies crípticas (quadrante II). Com o valor de *threshold* 1%, somente *S. jacuiensis* e *S. platae* mostram-se como uma provável sinonímia; *S. vittatus* permanece evidenciando espécies crípticas e *S. nasutus* também aparece com um valor intraespecífico maior que o valor de *threshold*.

Figura 2. Gráfico de quadrantes considerando 627 nucleotídeos por sequências com os dados nominais e *threshold* de 2% (A) 1,4% (B) e 1% (C).

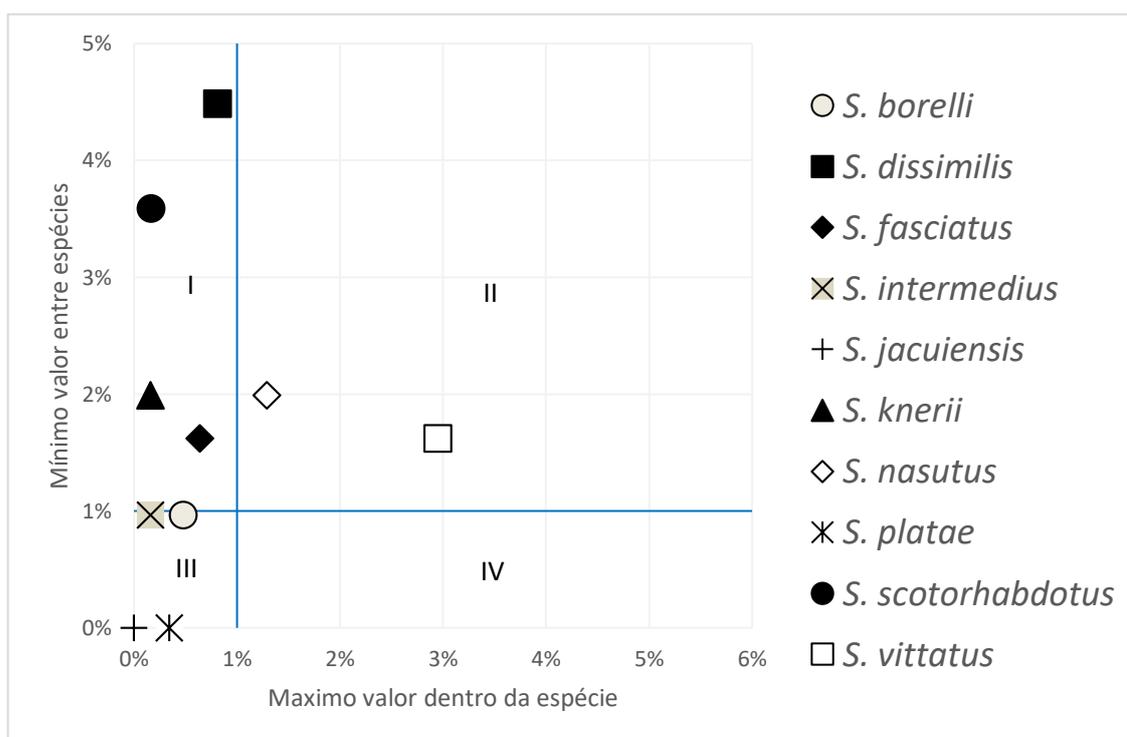
A.



B.



C.



Quando calculado o número de MOTUs pelo software jMOTU foram obtidos os seguintes resultados (Tabela 4): com o *threshold* 2%, obtiveram-se sete MOTUs (denominadas com a letra A), sendo as espécies *S. borellii* e *S. intermedius* agrupadas

na MOTU\_2A, *S. vittatus* e *S. fasciatus* agrupadas na MOTU\_4A, e *S. jacuiensis* e *S. platae* integradas na MOTU\_6A. As demais espécies são constituídas por única MOTUs em congruência com a taxonomia atual. Para o *threshold* 1,4%, foram encontradas nove MOTUs (denominadas B). As espécies *S. borellii* e *S. intermedius* são parte de uma única unidade taxonômica molecular (MOTU\_2B) e o *S. jacuiensis* e *S. platae* continuam como pertencente a uma única MOTU (MOTU\_8B). A espécie nominal *S. vittatus* aparece constituída por duas MOTUs (MOTU\_4B e MOTU\_7B, distância mínima interespecífica de 1,8%), pertencentes às bacias do Tocantins e Xingu-Tapajós, respectivamente. As demais espécies estão constituídas por uma única MOTU. O uso do *threshold* de 1% resultou em dez MOTUs (denominadas C). A espécie *S. vittatus* continua dividida em duas MOTUs (MOTU\_4C e MOTU\_7C) e as espécies *S. jacuiensis* e *S. platae* continuam pertencentes a uma única unidade molecular (MOTU\_9C).

Na análise do GMYC, a verossimilhança do modelo ( $L=680.7669$ ) foi significativamente superior a verossimilhança do modelo nulo ( $L_0=628.0964$ , *p-value* 0.000). O único ponto de transição entre os processos de coalescência e extinção/especiação revelou 12 MOTUs (Figura 3), sendo o intervalo de confiança de 9 a 13. O GMYC, diferente das demais metodologias, separou *S. nasutus* e *S. dissimilis* em duas MOTUs cada, concordantes com as bacias hidrográficas que elas ocupam. Os demais resultados foram idênticos aos obtidos com o valor de *threshold* 1% (Figura 4).

Tabela 4. MOTUS do gênero *Schizodon* determina pelo método de distância utilizando como *threshold* 2%, 1,4% e 1%.

<i>Threshold</i> 2%	<i>Threshold</i> 1,4%	<i>Threshold</i> 1%
<b>MOTU_1A: <i>S. nasutus</i></b> SC_nas_B016; SC_nas_B017; SC_nas_B018; SC_nas_B019; SC_nas_L0926; SC_nas_L1066; SC_nas_L1093; SC_nas_L1099; SC_nas_L1100; SC_nas_L1103; SC_nas_L1111; SC_nas_L1178; SC_nas_L243; SC_nas_L244; SC_nas_L245; SC_nas_L889	<b>MOTU_1B: <i>S. nasutus</i></b> SC_nas_B016; SC_nas_B017; SC_nas_B018; SC_nas_B019; SC_nas_L0926; SC_nas_L1066; SC_nas_L1093; SC_nas_L1099; SC_nas_L1100; SC_nas_L1103; SC_nas_L1111; SC_nas_L1178; SC_nas_L243; SC_nas_L244; SC_nas_L245; SC_nas_L889	<b>MOTU_1C: <i>S. nasutus</i></b> SC_nas_B016; SC_nas_B017; SC_nas_B018; SC_nas_B019; SC_nas_L0926; SC_nas_L1066; SC_nas_L1093; SC_nas_L1099; SC_nas_L1100; SC_nas_L1103; SC_nas_L1111; SC_nas_L1178; SC_nas_L243; SC_nas_L244; SC_nas_L245; SC_nas_L889
<b>MOTU_2A: <i>S. borellii</i> e <i>S. intermedius</i></b> SC_bor_L0063; SC_bor_L0086; SC_bor_L0117; SC_bor_L0224; SC_bor_L0899; SC_bor_L1176; SC_bor_L1177; SC_int_B014; SC_int_B015; SC_int_L012; SC_int_L0217; SC_int_L1201; SC_int_L214; SC_int_L219; SC_int_L372	<b>MOTU_2B: <i>S. borellii</i> e <i>S. intermedius</i></b> SC_bor_L0063; SC_bor_L0086; SC_bor_L0117; SC_bor_L0224; SC_bor_L0899; SC_bor_L1176; SC_bor_L1177; SC_int_B014; SC_int_B015; SC_int_L012; SC_int_L0217; SC_int_L1201; SC_int_L214; SC_int_L219; SC_int_L372	<b>MOTU_2C: <i>S. borellii</i></b> SC_bor_L0063; SC_bor_L0086; SC_bor_L0117; SC_bor_L0224; SC_bor_L0899; SC_bor_L1176; SC_bor_L1177
<b>MOTU_3A: <i>S. knerii</i></b> SC_kne_B012; SC_kne_L0857; SC_kne_L270; SC_kne_L361; SC_kne_L363; SC_kne_L365	<b>MOTU_3B: <i>S. knerii</i></b> SC_kne_B012; SC_kne_L0857; SC_kne_L270; SC_kne_L361; SC_kne_L363; SC_kne_L365	<b>MOTU_3C: <i>S. knerii</i></b> SC_kne_B012; SC_kne_L0857; SC_kne_L270; SC_kne_L361; SC_kne_L363; SC_kne_L365
<b>MOTU_4A: <i>S. vittatus</i> e <i>S. fasciatus</i></b> SC_fas_B011; SC_fas_L0544; SC_fas_L0629; SC_fas_L0650; SC_fas_L082; SC_fas_L0936; SC_fas_L0951; SC_fas_L0968; SC_fas_L259; SC_fas_L541; SC_fas_L542; SC_fas_L626; SC_fas_L698; SC_fas_L918; SC_vit_L0613; SC_vit_L0750; SC_vit_L100; SC_vit_L197; SC_vit_L205; SC_vit_L206; SC_vit_L207; SC_vit_L208; SC_vit_L209; SC_vit_L380; SC_vit_L558; SC_vit_L733	<b>MOTU_4B: <i>S. vittatus</i></b> SC_vit_L100; SC_vit_L197; SC_vit_L205; SC_vit_L206; SC_vit_L207; SC_vit_L208; SC_vit_L209; SC_vit_L380	<b>MOTU_4C: <i>S. vittatus</i></b> SC_vit_L100; SC_vit_L197; SC_vit_L205; SC_vit_L206; SC_vit_L207; SC_vit_L208; SC_vit_L209; SC_vit_L380
<b>MOTU_5A: <i>S. scotorhabdotus</i></b> SC_sco_B156; SC_sco_B214; SC_sco_L0906; SC_sco_L905	<b>MOTU_5B: <i>S. scotorhabdotus</i></b> SC_sco_B156; SC_sco_B214; SC_sco_L0906; SC_sco_L905	<b>MOTU_5C: <i>S. scotorhabdotus</i></b> SC_sco_B156; SC_sco_B214; SC_sco_L0906; SC_sco_L905;
<b>MOTU_6A: <i>S. jacuiensis</i> e <i>S. platae</i></b> SC_jac_L546; SC_pla_B135; SC_pla_B136; SC_pla_B138; SC_pla_B139	<b>MOTU_6B: <i>S. fasciatus</i></b> SC_fas_B011; SC_fas_L0544; SC_fas_L0629; SC_fas_L0650; SC_fas_L082; SC_fas_L0936; SC_fas_L0951; SC_fas_L0968; SC_fas_L259; SC_fas_L541; SC_fas_L542; SC_fas_L626; SC_fas_L698; SC_fas_L918	<b>MOTU_6C: <i>S. fasciatus</i></b> SC_fas_B011; SC_fas_L0544; SC_fas_L0629; SC_fas_L0650; SC_fas_L082; SC_fas_L0936; SC_fas_L0951; SC_fas_L0968; SC_fas_L259; SC_fas_L541; SC_fas_L542; SC_fas_L626; SC_fas_L698; SC_fas_L918
<b>MOTU_7A: <i>S. dissimilis</i></b> SC_dis_B022; SC_dis_B023; SC_dis_B024; SC_dis_B025; SC_dis_B027; SC_dis_L236;	<b>MOTU_7B: <i>S. vittatus</i></b> SC_vit_L0613; SC_vit_L0750; SC_vit_L558; SC_vit_L733;	<b>MOTU_7C: <i>S. vittatus</i></b> SC_vit_L0613; SC_vit_L0750; SC_vit_L558; SC_vit_L733;

SC\_dis\_L237; SC\_dis\_L239; SC\_dis\_L242;  
 SC\_dis\_L260; SC\_dis\_L261; SC\_dis\_L262;  
 SC\_dis\_L263; SC\_dis\_L264; SC\_dis\_L265

MOTU\_8B: *S. jacuiensis* e *S. platae*

SC\_jac\_L546; SC\_pla\_B135; SC\_pla\_B136;  
 SC\_pla\_B138; SC\_pla\_B139

MOTU\_8C: *S. intermedius*

SC\_int\_B014; SC\_int\_B015; SC\_int\_L012;  
 SC\_int\_L0217; SC\_int\_L1201; SC\_int\_L214;  
 SC\_int\_L219; SC\_int\_L372

MOTU\_9B: *S. dissimilis*

SC\_dis\_B022; SC\_dis\_B023; SC\_dis\_B024;  
 SC\_dis\_B025; SC\_dis\_B027; SC\_dis\_L236;  
 SC\_dis\_L237; SC\_dis\_L239; SC\_dis\_L242;  
 SC\_dis\_L260; SC\_dis\_L261; SC\_dis\_L262;  
 SC\_dis\_L263; SC\_dis\_L264; SC\_dis\_L265

MOTU\_9C: *S. jacuiensis* e *S. platae*

SC\_jac\_L546; SC\_pla\_B135; SC\_pla\_B136;  
 SC\_pla\_B138; SC\_pla\_B139

MOTU\_10C: *S. dissimilis*

SC\_dis\_B022; SC\_dis\_B023; SC\_dis\_B024;  
 SC\_dis\_B025; SC\_dis\_B027; SC\_dis\_L236;  
 SC\_dis\_L237; SC\_dis\_L239; SC\_dis\_L242;  
 SC\_dis\_L260; SC\_dis\_L261; SC\_dis\_L262;  
 SC\_dis\_L263; SC\_dis\_L264; SC\_dis\_L265

---

Figura 3. Árvore ultramétrica bayesiana, gerada no software BEAST v2.5.0, mostrando diferentes abordagens de delimitação de espécies baseada no marcador mitocondrial COI. Círculos pretos nos nós representam valores de probabilidade maiores que 0,9.

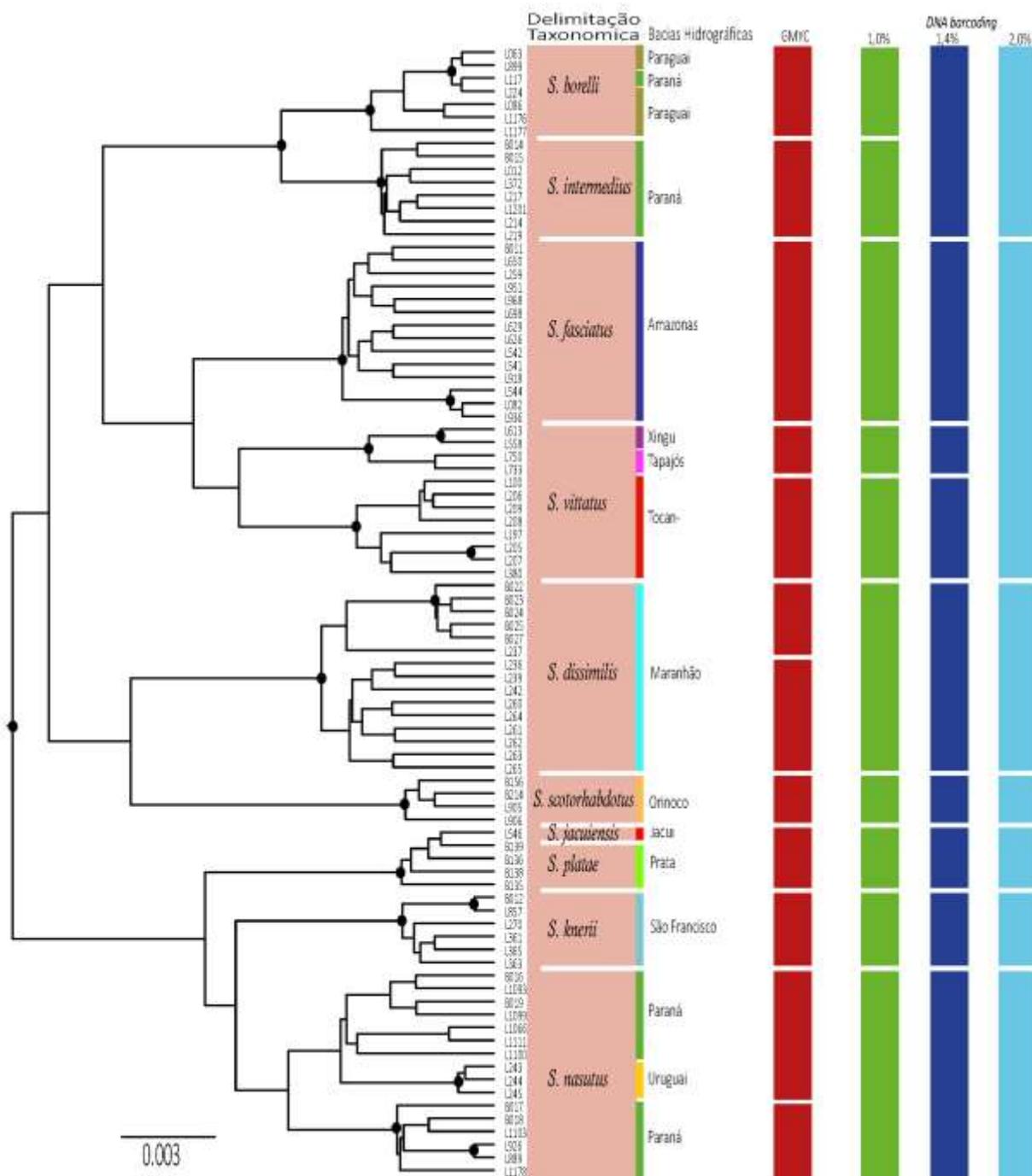
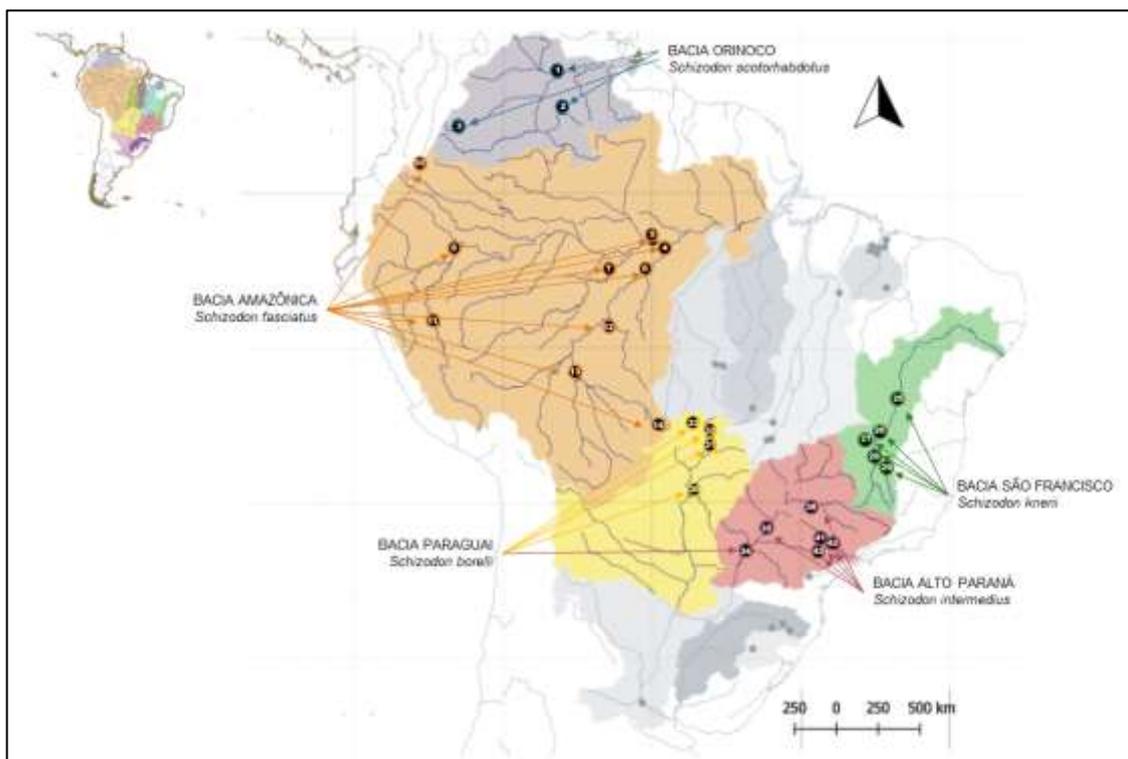
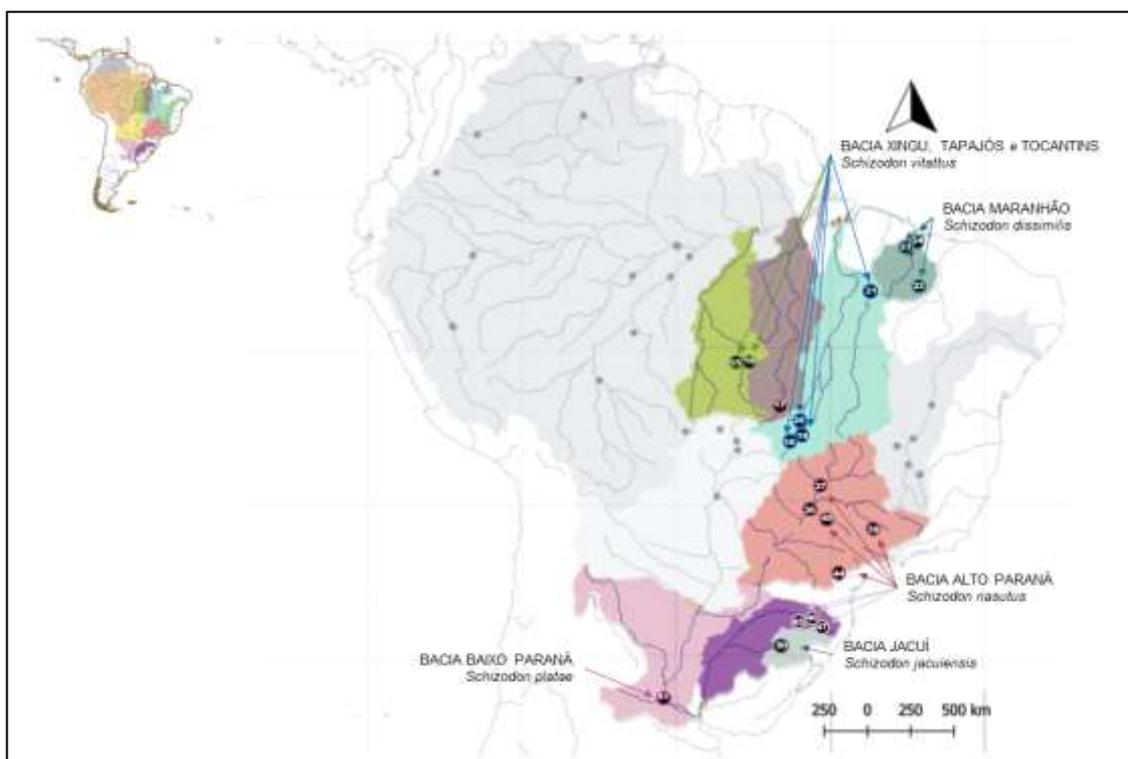


Figura 4. Distribuição de espécies nominais concordante (A) e discordantes (B) com a delimitação de MOTUS estimadas pelo GMYC.

A.



B.



## 6. DISCUSSÃO

A descrição de espécies pela taxonomia tradicional usa informações morfológicas, agrupando os organismos de acordo com os caracteres morfológicos sinapomórficos, isto é, caracteres compartilhados exclusivamente por esse grupo de organismos. O DNA *barcoding* trouxe para o presente estudo informações que mostram divergência entre as espécies nominais e os polimorfismos dentro das sequências de DNA (COI) que as representam. Esse método é consagrado no meio científico (BHATTACHARYA et al., 2015; NAAUM; HANNER, 2015; SHETH; THAKER, 2017), com importância reconhecida para a taxonomia atual (ALVES, 2013; BHATTACHARYA et al., 2015; MACHADO et al., 2017; SHETH; THAKER, 2017). Apesar de já ter recebido algumas críticas (MEYER; PAULAY, 2005; ZHANG et al., 2013), o método do DNA *barcoding* foi previamente visto ser bastante eficaz no grupo de peixes da família Anostomidae (RAMIREZ, 2015).

O principal achado desse trabalho foi a incongruência observada entre as espécies nominais e os grupos moleculares (MOTUs) obtidos a partir da análise molecular do gene COI. Essa discordância é assinalada por meio da avaliação das distâncias genéticas intra e interespecíficas (HEBERT et al., 2004; WARD; HANNER; HEBERT, 2009) e pelo uso de modelo coalescente de limite único dado pelo método GMYC (ZHANG et al., 2013). As duas abordagens mostraram resultados concordantes para o caso de uma provável sinonímia entre *S. jacuiensis* e *S. platae*, e para o caso de uma possível existência de espécies crípticas na denominação de *S. vittatus*.

Usando diferentes valores de *threshold*, o DNA *barcoding* encontrou de sete a dez diferentes MOTUs dentro do gênero. O valor de *threshold* 2% não parece adequado para a distinção de espécies de *Schizodon*, por unir espécies morfológicamente bem distinguíveis em únicas MOTUs, como é o caso de *S. borellii* e *S. intermedius* (MOTU\_2A), como também *S. fasciatus* e *S. vittatus* (MOTU\_4A). Essas espécies, além de distintas, não são consideradas um problema taxonômico pelos especialistas da área. *Schizodon borellii* se sobrepõe em seus caracteres morfométricos com *S. intermedius* podendo ser confundidas, mas diferem no tamanho das proporções do corpo e padrão de colorido (GARAVELLO; BRITSKI, 1990). Já *S.*

*fasciatus*, com suas diferenças taxonômicas bem definidas pelos especialistas (SANTOS, 1980), está biogeograficamente isolada de *S. vittatus* (ABREU, 2013).

Também o valor de *threshold* 1,4% encontrou uma única MOTU para as espécies *S. borellii* e *S. intermedius*, demonstrando que esse valor é igualmente inadequado para delimitar espécies, quando levado em consideração a informação taxonômica aceita pelos especialistas.

Já o *threshold* 1,0 %, evidenciou dez MOTUs e separou *S. borellii* e *S. intermedius* em distintas MOTUs. Este *threshold* de 1,0% possui uma melhor correspondência com a delimitação de espécies dada a taxonomia atual.

*S. borellii* e *S. intermedius* são consideradas duas espécies alopátricas, ocorrendo nas bacias do Paraguai e Alto Paraná, respectivamente. Em nossa amostragem foi encontrado um único indivíduo de *S. borellii* dentro da distribuição do *S. intermedius*. SILVA-SANTOS et al. (2018) retrataram em sua discussão que o encontro de haplótipos do Paraguai no Alto Paraná é possível pela remoção da barreira natural (Cachoeira de Sete Quedas) com a construção da Hidrelétrica do Itaipu. Essa barreira, no passado, possivelmente mantinha haplogrupos bem definidos separados em bacias (MACHADO et al., 2017; RAMIREZ; BIRINDELLI; GALETTI, 2017). Entretanto, devido ao seu hábito migratório, a geodispersão do *S. borellii* pode ter sido possível entre as bacias do Paraguai e Alto Paraná, considerando a construção dos canais de piracema da barragem do Itaipu, bem como pelo fato de cerca de 200 km da parte média do rio Paraná ter sido agregada ao alto Paraná, após a construção da barragem a jusante da antiga Sete Quedas.

Uma subdivisão de *S. vittatus* em duas MOTUs, indicando uma possível ocorrência de espécies crípticas, foi apoiada por todos os métodos empregados, com exceção do valor de *threshold* 2%, e é fortemente sustentada pela condição biogeográfica; uma MOTU foi amostrada na bacia do Tocantins e a segunda MOTU na bacia Xingu-Tapajós, bacias hidrográficas que estão separadas desde o Plio-Pleistoceno (ROSSETTI; VALERIANO, 2007)

Em todos os métodos utilizados *S. jacuienses* e *S. platae* formaram uma única MOTU, devido ao baixo valor de comparação par-a-par de 0,1% entre elas. *S. jacuiensis* coletada na Lagoa dos Patos do rio Jacuí (Rio Grande do Sul – BR) e a *S. platae* no rio de La Plata na Argentina foram obtidas nas distintas análises como possíveis sinônimas, sendo espécies que pertencem a distintas bacias, porém, regiões com conexão histórica (CARVALHO; REIS, 2011). *Schizodon platae* foi descrito

para o rio de La Plata (GARMAN, 1890) e pode ser encontrada nas bacias do Baixo Paraná e Rio Uruguai (BERGMANN, 1988), enquanto que *S. jacuiensis* foi descrita para a bacia do Rio Jacuí (BERGMANN, 1988). Segundo discussão de Garavello e Britski (1990), essas espécies (*S. platae* e *S. jacuiensis*) tem descrições inconclusivas em relação aos caracteres de cores em comparações entre ambas ou com *S. knerii*. Baseados na alta plasticidade característica desse grupo, a distinção entre *S. jacuiensis* e *S. platae* é discutível (GARAVELLO; BRITSKI, 1990), fato que está sendo apoiado pelos resultados moleculares. Alternativamente, ambas seriam espécies muito recentes, apresentando grande similaridade entre elas e ainda não ter havido tempo viável para o acúmulo de polimorfismos no gene COI.

Ressalta-se que a análise de coalescência, realizada pelo GMYC, também manteve *S. platae* e *S. jacuiensis* reunidos em uma única MOTU. Considerando que este método apresenta resultados robustos e independentes de informação taxonômica prévia (ZHANG et al., 2013), é mais provável que de fato representem um caso de sinonímia. Esse método, modela a especiação a partir das ramificações de uma árvore ultramétrica (DRUMMOND; BOUCKAERT, 2013) e é adequado para grupos monofiléticos, com menor tamanho populacional (ESSELSTYN et al., 2012).

Pelo GMYC, a árvore ultramétrica agrupou doze MOTUs, um número maior em comparação com o maior número encontrado pelo método de distância. Em desacordo com o *DNA barcoding* baseado no *threshold* 1%, o GMYC divide as espécies bem delimitadas taxonomicamente *S. nasutus* e *S. dissimilis* em duas MOTUs cada. Esses achados precisam ser melhor avaliados antes de uma decisão mais definitiva sobre o seu significado, incluindo na análise um número maior de genes mitocondriais e nucleares, e genes com taxas mutacionais maiores, que poderão identificar possíveis casos de especiações recentes. De qualquer maneira, considerando a sensibilidade do método de coalescência as MOTUs obtidas precisam ser consideradas, no mínimo, com uma unidade evolutivamente significativa (ESU - *Evolutionary Significant Unit*), para fins de conservação da biodiversidade do grupo.

Os resultados desse trabalho foram decisivos para indicar que são necessárias revisões taxonômicas no gênero *Schizodon*, utilizando ferramentas morfológicas e moleculares que incluam diferentes genes, para a resolução dos problemas apontados. Além disso, mesmo após tomada a decisão taxonômica, poderá restar situações onde linhagens genéticas, definidas como ESUs, deverão ser consideradas em medidas de conservação, dando ainda maior significado a este trabalho.

No presente estudo foram usadas ferramentas amplamente testadas para identificar e apontar casos de espécies crípticas ou de novas espécies. Os nossos resultados sugerem o *DNA barcoding* sob o *threshold* de 1,0% como a metodologia baseada em distância mais adequada quando comparada com a taxonomia atual.

Os caracteres morfológicos sinapomórficos são os que fundamentam a identificação clássica de espécie, mas a plasticidade fenotípica é um problema a ser considerado na determinação taxonômica do gênero *Schizodon* (ABREU, 2013; BERGMANN, 1988; GARAVELLO; BRITSKI, 1990; SANTOS, 1980; SIDLAUSKAS; GARAVELLO; JELLEN, 2007). Nesse caso, a inclusão dos dados moleculares pode ser crucial. Apesar das metodologias utilizadas serem comprovadamente viáveis e amplamente utilizada na identificação de espécies, no gênero *Schizodon* é possível encontrar pares de espécies nominais com sequências distinguíveis por poucos caracteres moleculares que podem ser fruto de especiações recentes, fato este que parece comum em outros gêneros da família Anostomidae (RAMIREZ; BIRINDELLI; GALETTI, 2017; RAMIREZ; GALETTI, 2015).

## 7. CONCLUSÕES

O estudo evidenciou que algumas espécies nominais amostradas do gênero *Schizodon* apresentam distâncias genéticas interespecíficas relativamente baixas e isso pode ser resultado de processos de especiação recente.

Um estudo taxonômico é imperativo para avaliar a potencial ocorrência de uma espécie críptica encontrada dentro de *S. vittatus*.

*S. jacuiensis* e *S. platae* deve representar uma sinonímia e necessitam de revisão que inclua uma avaliação da plasticidade fenotípica existente e outros marcadores moleculares.

O significado taxonômico das MOTUs observadas dentro de *S. nasutus* e *S. dissimilis*, quando analisados pelo método de coalescência, precisa ser melhor investigado. No mínimo, essas MOTUs representam unidades evolutivamente significantes (ESU).

No geral, os resultados demonstram a necessidade de estudos integrados que incluam a morfologia e dados moleculares, para resolver problemas relacionados a delimitação e identificação de espécies, contribuindo para o conhecimento das espécies desse gênero e sua conservação.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU, J. M. DA S. **VARIAÇÃO GEOGRÁFICA EM *Schizodon dissimilis* (Garman, 1890) E DIVERSIDADE GENÉTICA E FILOGEOGRÁFICA DO GRUPO *Schizodon fasciatus sensu lato* (CHARACIFORMES: ANOSTOMIDAE).** [s.l.] UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ MUSEU e MUSEU PARAENSE EMÍLIO GOELDI PROGRAM, 2013.

ALVES, T. L. DA S. **Aplicação de *DNA Barcoding* para identificação de espécies pertencentes às tribos Sisyrrhynchieae e Tigridaeae ( Iridaceae ).** [s.l.] UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL, 2013.

BANDYOPADHYAYA, S. et al. DNA Barcoding and Its Applications - A critical review. **CMRIMS J. RES. AND DEV**, v. 1, n. 1, p. 77–81, 2013.

BENNEMANN, S. T.; CASATTI, L.; OLIVEIRA, D. C. DE. Alimentação de peixes: proposta para análise de itens registrados em conteúdos gástricos. **Biota Neotropica**, v. 6, n. 2, p. 1–8, 2006.

BERGMANN, L. A. C. *Schizodon jacuiensis* sp. n., um novo Anostomídeo do sul do Brasil e redescrição de *S. kneri* (Steindachner, 1875) e *S. platae* (Garman, 1890) (Pisces, Characiformes, Anostomidae). **Comunicações do Museu de Ciências de PUCRS**, v. 1, p. 13–28, 1988.

BHATTACHARYA, M. et al. DNA barcoding to fishes: current status and future directions. **Mitochondrial DNA**, v. 00, n. 00, p. 1–9, 2015.

BLAXTER, M. et al. Defining operational taxonomic units using DNA barcode data. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 360, n. 1462, p. 1935–1943, 2005.

BOUCKAERT, R. et al. BEAST 2: A Software Platform for Bayesian Evolutionary Analysis. **PLoS Computational Biology**, v. 10, n. 4, p. 1–6, 2014.

BRITTO, S. G. DE C. et al. Ecological attributes of fish fauna in the Taquaruçu Reservoir, Paranapanema River (Upper Paraná, Brazil): composition and spatial distribution. **Acta Limnologica Brasiliensia**, v. 18, n. 4, p. 377–388, 2006.

BROWN, S. D. J. et al. Spider: An R package for the analysis of species identity

and evolution, with particular reference to DNA barcoding. **Molecular Ecology Resources**, v. 12, n. 3, p. 562–565, 2012.

CARVALHO, T. P.; REIS, R. E. Taxonomic review of *Hisonotus* Eigenmann & Eigenmann (Siluriformes: Loricariidae: Hypoptopomatinae) from the laguna dos Patos system, southern Brazil. **Neotropical Ichthyology**, v. 9, n. 1, p. 1–48, 2011.

DARRIBA, D. et al. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. **Nature Methods**, v. 9, n. 8, p. 772, 30 jul. 2012.

DRUMMOND, A.; BOUCKAERT, R. Bayesian Evolutionary Analysis with BEAST. **with BEAST 2.0**, p. 1–242, 2013.

ESCHMEYER, W. N.; FONG, J. D. **Catalog of Fishes**. Disponível em: <<http://researcharchive.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/SpeciesByFamily.asp#Anostomidae>>. Acesso em: 7 maio. 2017.

ESSELSTYN, J. A. et al. Single-locus species delimitation: A test of the mixed Yule-coalescent model, with an empirical application to Philippine round-leaf bats. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 279, n. 1743, p. 3678–3686, 2012.

FRANKHAM, R. et al. **FUNDAMENTOS DE GENÉTICA DA CONSERVAÇÃO**. Ribeirão Preto: SBG, 2008.

GALIMBERTI, A. et al. Integrated Operational Taxonomic Units (IOTUs) in Echolocating Bats: A Bridge between Molecular and Traditional Taxonomy. **PLoS ONE**, v. 7, n. 6, 2012.

GARAVELLO, J. .; BRITSKI, H. . Duas novas espécies do gênero *Schizodon* Agassiz da bacia do Alto Paraná, Brasil, America do Sul (Ostariophysi, Anostomidae). In: **Naturalia**. São Paulo: [s.n.]. p. 153–170, 1990.

GARMAN, S. On the species of the genus *Anostomus*. **Bulletin of the Essex Institute.**, v. 22, p. 15–23, 1890.

HEBERT, P. D. N. et al. Biological identifications through DNA barcodes. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 270, n. 1512, p. 313–321, 2003.

HEBERT, P. D. N. et al. Identification of birds through DNA barcodes. **PLoS Biology**, v. 2, n. 10, 2004.

HEBERT, P. D. N.; RATNASINGHAM, S.; DE WAARD, J. R. Barcoding animal life: cytochrome *c* oxidase subunit 1 divergences among closely related species. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 270, n. Suppl\_1, p. S96–S99, 2003.

HENTER, H. J. et al. DNA barcoding in diverse educational settings: five case studies. **PHILOSOPHICAL TRANSACTIONS OF THE ROYAL SOCIETY B-BIOLOGICAL SCIENCES**, v. 371, n. 1702, p. 20150340, 2016.

HUBERT, N.; HANNER, R. DNA Barcoding, species delineation and taxonomy: a historical perspective. **DNA Barcodes**, v. 3, n. 1, 2015.

JONES, M.; GHOORAH, A.; BLAXTER, M. JMOTU and Taxonator: Turning DNA Barcode Sequences into Annotated Operational Taxonomic Units. **PLoS ONE**, v. 6, n. 4, 2011.

KIMURA, M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. **Journal of Molecular Evolution**, v. 16, n. 2, p. 111–120, 1980.

KUMAR, S.; STECHER, G.; TAMURA, K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. **Molecular biology and evolution**, v. 33, n. 7, p. 1870–1874, 2016.

KUSUKAWA, N. et al. Rapid and reliable protocol for direct sequencing of material amplified by the polymerase chain reaction. **BioTechniques**, v. 9, n. 1, p. 66–8, 70, 72, 1990.

LOPES, J. P.; LEAL, A. L. G. DESOVA INDUZIDA EM PIAU-DE-VARA *Schizodon fasciatus* SPIX & AGASSIZ, 1829 PARA PROPAGAÇÃO ARTIFICIAL. **Revista Brasileira de Engenharia de Pesca**, v. 5, n. 1, 2010.

MACHADO, C. D. B. et al. DNA barcoding reveals taxonomic uncertainty in Salminus (Characiformes). **Systematics and Biodiversity**, v. 15, n. 4, p. 372–382, 2017.

MARSHALL, E. TAXONOMY: Will DNA Bar Codes Breathe Life Into

Classification? **Science**, v. 307, n. 5712, p. 1037–1037, 18 fev. 2005.

MARTINS, C.; GALETTI, P. M. Conservative distribution of 5S rDNA loci in *Schizodon* (Pisces, Anostomidae) chromosomes. **Chromosome Research**, v. 8, n. 4, p. 353–355, 2000.

MEYER, C. P.; PAULAY, G. DNA Barcoding: Error Rates Based on Comprehensive Sampling. **PLoS Biology**, v. 3, n. 12, p. e422, 29 nov. 2005.

MOREIRA, L. M. Ciências Genômicas: Fundamentos E Aplicações. In: **Book**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, v. 1p. 303–403, 2015.

NAAUM, A. M. et al. Standards for Conducting a DNA Barcoding Market Survey: Minimum Information and Best Practices. **DNA Barcodes**, v. 3, n. 1, p. 80–84, 1 jan. 2015.

NAAUM, A. M.; HANNER, R. Community engagement in seafood identification using DNA barcoding reveals market substitution in Canadian seafood. **DNA Barcodes**, v. 3, n. 1, p. 74–79, 1 jan. 2015.

NAKATANI, K. et al. **Schizodon fasciatus. Ovo s e larvas de peixes de água doce Ovos e larvas de peixes de água doce: desenvolvimento e manual de identificação**. [s.l: s.n.]. v. 1, 2003.

NETO, D. A. P. **Detecção de adulteração de espécies em pescado e derivados por meio da técnica de DNA Barcoding**. [s.l.] UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS, 2013.

PEREIRA, L. H. G. et al. Can DNA barcoding accurately discriminate megadiverse Neotropical freshwater fish fauna? **BMC Genetics**, v. 14, n. 1, p. 20, 2013.

PONS, J. et al. Sequence-Based Species Delimitation for the DNA Taxonomy of Undescribed Insects. **Systematic Biology**, v. 55, n. 4, p. 595–609, 1 ago. 2006.

RAMIREZ, J. L. **Filogenia molecular dos Anostomidae e filogeografia das espécies com cromossomos sexuais ZZ/ZW do gênero Leporinus**. [s.l.] UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS CENTRO, 2015.

RAMIREZ, J. L.; BIRINDELLI, J. L. O.; GALETTI, P. M. A new genus of

Anostomidae (Ostariophysi: Characiformes): Diversity, phylogeny and biogeography based on cytogenetic, molecular and morphological data. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 107, p. 308–323, fev. 2017.

RAMIREZ, J. L.; GALETTI, P. M. DNA barcode and evolutionary relationship within *Laemolyta* Cope 1872 (Characiformes: Anostomidae) through molecular analyses. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 93, p. 77–82, dez. 2015.

RATNASINGHAM, S.; HEBERT, P. D. N. BARCODING: bold: The Barcode of Life Data System (<http://www.barcodinglife.org>). **Molecular Ecology Notes**, v. 7, n. 3, p. 355–364, 24 jan. 2007.

REIS, R. E.; KULLANDER, S. O.; FERRARIS JR., C. J. (EDS. . **Check List of the Freshwater Fishes of South and Central America**. Porto Alegre: [s.n.].

ROSSETTI, D. F.; VALERIANO, M. M. Evolution of the lowest amazon basin modeled from the integration of geological and SRTM topographic data. **CATENA**, v. 70, n. 2, p. 253–265, jul. 2007.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. [s.l.] Cold spring harbor laboratory press, 2012.

SANTOS, G. M. DOS. Aspectos de sistemática e morfologia de *Schizodon fasciatus* Agassiz 1829, *Rhytiodus microlepis* Kner 1859 e *Rhytiodus argenteofuscus* Kner, 1829 (Osteichthyes, Characoidei, Anostomidae) do lago Janauacá-Amazonas. **Acta Amazonica**, v. 10, n. 3, p. 635–649, 1980.

SHETH, B. P.; THAKER, V. S. DNA barcoding and traditional taxonomy: an integrated approach for biodiversity conservation. **Genome**, v. 60, n. 7, p. 618–628, jul. 2017.

SIDLAUSKAS, B. L.; GARAVELLO, J. C.; JELLEN, J. A new *Schizodon* (Characiformes: Anostomidae) from the Río Orinoco system, with a redescription of *S. isognathus* from the Rio Paraguay system. **Copeia**, v. 3, p. 711–725, 2007.

SIDLAUSKAS, B. L.; VARI, R. P. Phylogenetic relationships within the South American fish family Anostomidae (Teleostei, Ostariophysi, Characiformes). **Zoological Journal of the Linnean Society**, v. 154, n. 1, p. 70–210, set. 2008.

SILVA-SANTOS, R. et al. Molecular Evidences of a Hidden Complex Scenario

in *Leporinus cf. friderici*. **Frontiers in Genetics**, v. 9, n. FEB, p. 1–9, 15 fev. 2018.

SOUZA, F. DAS C. DO A. et al. Estabilidade da carne mecanicamente separada de Aracu ( *Schizodon fasciatum* ), Jaraqui ( *Semaprochilodus spp.* ) e Mapará ( *Hypophthalmus edentatus* ) estocados sob congelamento. **Bioikos**, v. 28, n. 2, p. 87–94, 2014.

SUCHARD, M. A. et al. Bayesian phylogenetic and phylodynamic data integration using BEAST 1.10. **Virus Evolution**, v. 4, n. 1, 1 jan. 2018.

WARD, R. D.; HANNER, R.; HEBERT, P. D. N. The campaign to DNA barcode all fishes, FISH-BOL. **Journal of Fish Biology**, v. 74, n. 2, p. 329–356, fev. 2009.

YABE, R. DE S.; BENNEMANN, S. T. Regime alimentar de *Schizodon intermedius* Garavello & Britski do rio Tibagi, Paraná, e sua relação com algumas características morfológicas do trato digestivo (Osteichthyes, Anostomidae). **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 11, n. 4, p. 777–788, 1994.

ZHANG, J. et al. A general species delimitation method with applications to phylogenetic placements. **Bioinformatics**, v. 29, n. 22, p. 2869–2876, 15 nov. 2013.