

UNIVERSIDADE DO ESTADO DO AMAZONAS - UEA

ESCOLA NORMAL SUPERIOR – ENS

CURSO DE LICENCIATURA EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS – TURMA BLV_2013

AMANDA PANTOJA COELHO

**FILOGEOGRAFIA DE *Scoloplax baskini* ROCHA, OLIVEIRA, RAPP PY-DANIEL,
2008 (SILURIFORMES, LORICARIOIDEA, SCOLOPLACIDAE)**

MANAUS - AMAZONAS

2017

AMANDA PANTOJA COELHO

Trabalho de Conclusão de Curso para
obtenção do grau de Licenciado em Ciências
Biológicas pela Universidade do Estado do
Amazonas

Orientador: Marcelo Salles Rocha

MANAUS - AMAZONAS

2017



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>Amancha Pantoya Coelho</i>
TÍTULO DO TCC: <i>Filogeografia de <u>Scolopax baskini</u> Rocha, Oliveira, Rapp Py-Daniel, 2008 (Scolopacidae).</i>

AVALIAÇÃO DA BANCA AVALIADORA

BANCA EXAMINADORA	NOTAS ATRIBUÍDAS
a) Professor orientador: <i>Marcelo Salles Rocha</i>	<i>9,0</i>
b) 1º avaliador(a): <i>Rafaela Pires da Costa</i>	<i>9,0</i>
c) 2º avaliador(a): <i>Luiz Carlos Bührnheim</i>	<i>9,4</i>
MÉDIA DA NOTA (a+b+c)/3	<i>9,1</i>

MÉDIA DA NOTA: *9,1*

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

ASSINATURA DOS MEMBROS DA BANCA AVALIADORA



Orientador(a)



1º Avaliador(a)



2º Avaliador(a)

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo (a) autor (a).

Coelho, Amanda Pantoja

C672f FILOGEOGRAFIA DE *Scoloplax baskini* ROCHA, OLIVEIRA, RAPP PY-DANIEL, 2008 (SILURIFORMES, LORICARIOIDEA, SCOLOPLACIDAE) / Amanda Pantoja Coelho. 2017

IV f.: il.; 31 cm.

Orientador: Marcelo Salles Rocha

TCC de Graduação (Licenciatura Plena em Ciências Biológicas)

Universidade do Estado do Amazonas.

1. Amazônia. 2. Rio Negro. 3. Siluriformes. 4. DNA barcode. I. Rocha, Marcelo Salles II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Professor Dr. Marcelo Salles Rocha por acreditar no meu potencial científico, me orientar e me ensinar sempre com muita dedicação e sabedoria.

Aos amigos do Laboratório Temático de Biologia Molecular (LTBM): Joyce Galvão, Welton Luiz Gato pelas contribuições, ensinamento e companheirismo.

A Dra. Jaqueline da Silva Batista pela oportunidade de estágio em seu Laboratório Temático de Biologia Molecular (LTBM) e Kiara Formiga por toda colaboração e particularmente a Giselle Moura pelo amparo, todo o apoio, hospitalidade além de ocasionalmente o socorro prestado e pelas sugestões e ideias.

As minhas grandes amigas Gabriela Maciel, Karina Kethelen Aquino, e a todas as outras não citadas aqui, por compartilharem todos os bons e maus momentos. Em especial a Waleska Barbosa por todo suporte e auxílio nos momentos de incertezas.

Ao meu amor Marcel Victor Farias, pelo carinho e por fazer todos esses anos juntos muito mais felizes e completos. Durante esse período foi meu porto seguro, minha garantia de sorrir e minha inspiração para sonhar. E a toda sua família pelo carinho.

Aos meus tios de coração Gleyse Santos, Raimundo Monteiro e Gerson Almeida e aos demais membros da minha família pelo incentivo e afeto, mesmo não entendendo muito bem minha profissão.

Em especial, à melhor família que alguém poderia ter. Ao meu maravilhoso pai Wladilson Coelho, a minha admirável mãe Norma Pantoja Coelho, a minha irmã Caroline Coelho e minha sobrinha Ariella Coelho Costa por não só me receberem com imensa alegria, tornando meus dias mais felizes, como também por sempre acreditarem mais em mim mais do que eu mesma, pelo grande apoio e amor incondicional.

E a Deus, por permitir que tudo isso seja possível! Obrigada!

RESUMO

Scoloplax baskini pertencente à família Scoloplacidae, endêmica da região Neotropical e compreende apenas um gênero, *Scoloplax* com seis espécies válidas. Os representantes da família são conhecidos por serem considerados peixes miniatura, devido ao seu comprimento padrão diminuto, sendo que, o maior exemplar conhecido mede 1,99 centímetros de comprimento padrão. Os representantes dessa família possuem como principal característica uma placa com pequenos odontoides na região superior do focinho e uma série bilateral de placas ósseas na linha dorsal entre as nadadeiras dorsal e outra na parte caudal. Espécies de *Scoloplax* possuem ampla distribuição pela região Neotropical, ocorrendo nas bacias dos rios Amazonas e Paraná-Paraguai. Na bacia Amazônica ocorre a maior diversidade, 6 espécies conhecidas. Em especial no rio Negro, ocorrem 4 das 6 espécies amazônicas. Algumas populações de *Scoloplax*, baseadas em uma variação morfológica, necessitam uma análise detalhada. Logo, este trabalho teve como objetivo avaliar a variabilidade genética de três populações isoladas (Negro, Purus e Aripuanã) de *Scoloplax baskini* e sua relação com a distribuição geográfica. Para isso foi realizada a verificação da existência de fluxo gênico entre as populações, estimativa do tempo de divergência entre as populações além de inferir a respeito dos processos demográfico e evolutivos que contribuíram para a atual distribuição das populações. Para a amostragem foram utilizados dois marcadores moleculares, a subunidade do RNA ribossômico (16S) e a subunidade I do citocromo oxidase (DNA barcode), foi feita a amplificação, purificação e sequenciamento e a partir dessas foi realizado a análise de variância molecular (AMOVA), foi gerada uma árvore filogenética, assim como a distância genética para os dois fragmentos. A espécie *Scoloplax baskini*, apresentou uma ampla variabilidade genética, sem fluxo genico além de ser verificado o tempo de divergência dessas populações, a qual pode ser inferida possíveis invasões marinhas e retenções de água salobra em grande parte da planície central da Amazônia, como potencial razão de diferenciação dessas populações, atuando com um processo de vicariância nas populações de *Scoloplax baskini*.

Palavras-chave: Amazônia. Rio Negro. Siluriformes. DNA código de barras

ABSTRACT

Scoloplax baskini belongs to the family Scoloplacidae, endemic to the Neotropical region and comprises only one genus, *Scoloplax* with six valid species. The family is characterized by being considered miniature fish because of their diminutive standard length. The representatives of this family have as main characteristic a plate with small odontoids in the superior region of the muzzle and a bilateral series of bony plates in the dorsal line between the dorsal fins. *Scoloplax* species are widely distributed throughout the Neotropical region, occurring in the Amazon and Paraná-Paraguay basins. In the Amazon Basin there is the greatest diversity, with the 6 known species. In particular in the Negro River, 4 of the 6 Amazonian species occur. The Scoloplacidae family was the most recent family of modern Siluriformes to be discovered (1976), specimens of *Scoloplax* were hitherto identified as juveniles of Aspredinidae or Loricariidae in many collections. Some populations of *Scoloplax*, based on a morphological variation, need a detailed analysis. For that reason, this main goal of this work is to evaluate the genetic variability of three isolated populations (Negro, Purus and Aripuanã) of *Scoloplax baskini* and its relation with the geographic distribution. In order to do this, we verified the existence of gene flow among populations, estimating the time of divergence among populations, as well as inferring about the demographic and evolutionary processes that contributed to the current distribution of populations. For this purpose, we verified the existence of gene flow among populations, estimating the time of divergence among populations, as well as inferring about the demographic and evolutionary processes that contributed to the current distribution of populations. Two molecular macromers, the subunit of ribosomal RNA (16S) and the subunit I of cytochrome oxidase (DNA barcode) were used for the sampling, amplification, purification and sequencing were done and from these the analysis of molecular variance (AMOVA), a phylogenetic tree was generated, as well as the genetic distance for the two fragments. The species *Scoloplax baskini*, presented a wide genetic variability, without genetic flow besides to verify the time of divergence of these populations, which can be inferred possible marine invasions and retention of brackish water in great part of the central plain of the Amazon, as a potential reason of differentiation of these populations, acting with a process of vicariance in the populations of *Scoloplax baskini*.

Keywords: Amazon. Black river. Siluriformes. DNA bar code

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. *Scoloplax baskini*, em visões, lateral, dorsal e ventral. 12

Figura 2: Bacia Amazônica, identificada de amarelo a população rio Negro, de vermelho a população rio Aripuanã e de verde a população rio Purus..... 17

Figura 3: Imagem com tempo de diversificação estimado da análise filogeográfica molecular usando o método 'Maximum Likelihood' .: 26

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Tabela com as sequencias dos que foram utilizados na amplificação dos fragmentos.....	18
Tabela 2: Tabela com os primers utilizados em COI	18
Tabela 3: Tabela entre as distancias genéticas de <i>Scoloplax baskini</i> das populações Negro, Purus e Aripuanã	22
Tabela 4: Relação entre as distâncias genéticas de <i>Scoloplax baskini</i> das populações rio Negro, rio Purus e rio Aripuanã.....	23
Tabela 5: Relação de distância genética entre o grupo interno de <i>Scoloplax</i>	24
Tabela 6: Relação de distância genética entre o grupo externo. Onde o número 1 corresponde a <i>Astroblepus sp</i> , 2 corresponde a <i>Callichthys callichthys</i> , 3 corresponde a <i>Corydoras aeneus</i> , 4 corresponde a <i>Corydoras ourastigma</i> , 5 corresponde a <i>Diplomystes mesembrinus</i> , 6 corresponde a <i>Hemipsilichthys gobio</i> , 7 corresponde a <i>Hemipsilichthys papillatus</i> , 8 corresponde a <i>Hoplosternum littorale</i> , 9 corresponde a <i>Isbrueckerichthys epakmos</i> , 10 corresponde a <i>Nematogenys inermis</i> , 11 corresponde a <i>Neoplecostomus paranensis</i>	24

SUMÁRIO

1. Introdução	11
2. Material e métodos	17
2.1 Amostragem	17
2.2 Extração de DNA e amplificação via PCR	17
2.3 Análises biogeográficas.....	19
Resultados	22
2.4 Variação da distância genética em <i>Scoloplax baskini</i>	22
2.4.1 Gene 16S rRNA	22
2.4.2 Gene Citocromo Oxidase I.....	23
2.5 Análise da estrutura genética populacional e fluxo gênico	25
4. Conclusão	29
5. Referências bibliográficas	30

1. Introdução

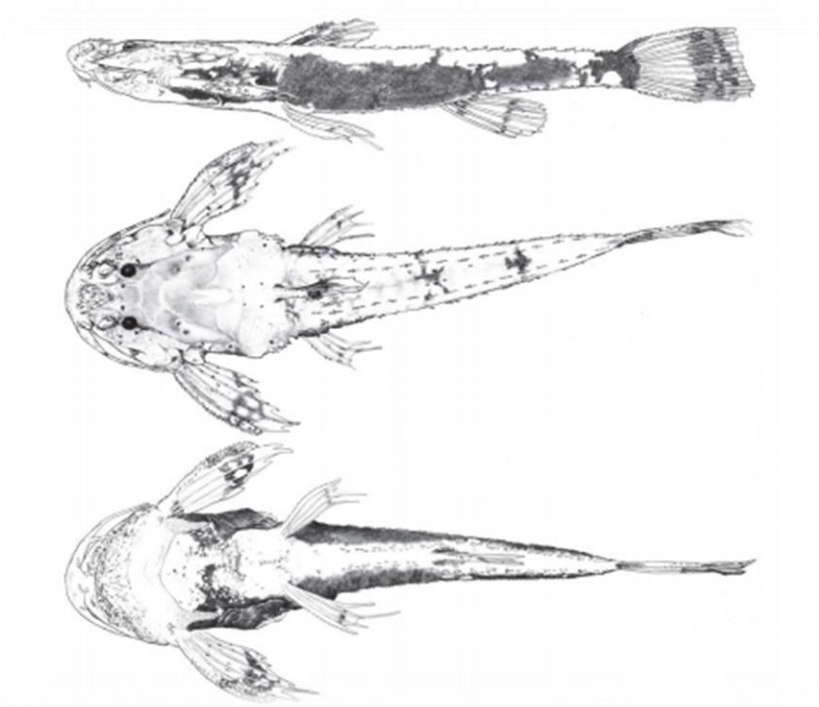
Scoloplax baskini (figura 1) pertence a família Scoloplacidae, endêmica da região Neotropical e compreende apenas um gênero, *Scoloplax* (Bailey & Baskin, 1976) com seis espécies válidas (SCHAEFER, 2003; ROCHA *et al.*, 2008; ROCHA *et al.*, 2012; ROCHA, 2013).

A família Scoloplacidae foi a mais recente família de Siluriformes modernos a ser descoberta. Outras famílias, como Austroglanididae, foi posteriormente descrita, porém baseada em espécimes já conhecidos (DE PINNA, 1998). Exemplos de *Scoloplax* eram até então, identificados como juvenis de Aspredinidae ou Loricariidae em muitas coleções. O primeiro exemplar coletado que se tem registro foi em 1866 pela equipe de Louis Agassiz no Brasil pela Expedição Thayer e identificado como *S. dicra* por Schaefer *et al.* (1989).

Posteriormente, baseado em exemplares coletados na região da Bolívia, Bailey & Baskin (1976) propuseram um novo gênero, *Scoloplax*, e descreveram a primeira espécie, *S. dicra*. Baseada na presença de características compartilhadas entre *Scoloplax* e Loricariidae, os autores propuseram uma nova subfamília, Scoloplacinae, uma vez que essa espécie nova não poderia ser alocada nas outras subfamílias conhecidas e pela presença de muitas autapomorfias. Mais tarde, Isbrücker (1980) elevou Scoloplacinae ao *status* de família.

Os representantes da família são conhecidos por serem considerados peixes miniatura, devido ao seu comprimento padrão diminuto, sendo que, o maior exemplar conhecido mede 1,99 centímetros de comprimento padrão (CP) (SCHAEFER, 2003). Os representantes dessa família possuem como principal característica uma placa com pequenos odontoides na região superior do focinho e uma série bilateral de placas ósseas na linha dorsal entre as nadadeiras dorsal e caudal, e outra linha ventral entre as nadadeiras anal e caudal. Odontoides também estão presentes na cabeça, nadadeiras peitoral e pélvica, assim como também nas placas ósseas conforme visto na imagem 1. (ROCHA,2008).

Figura 1. *Scoloplax baskini*, em visões, lateral, dorsal e ventral.



Fonte: Deyse Silva.

Estes são encontrados em cursos d'água de pequeno a médio porte, em profundidades com detritos, folhas e areia (SAZIMA *et al.*, 2000; SCHAEFER, 2003; ROCHA *et al.*, 2008a; OLIVEIRA *et al.*, 2009; ROCHA *et al.*, 2012).

Espécies de *Scoloplax* possuem ampla distribuição pela região Neotropical, ocorrendo nas bacias dos rios Amazonas e Paraná-Paraguai (SCHAEFER, 2003; ROCHA *et al.* 2008; ROCHA *et al.* 2012). Na Bacia Amazônica ocorre a maior diversidade, 6 das 6 espécies conhecidas. Em especial no rio Negro, ocorrem 4 das 6 espécies amazônicas, (ROCHA *et al.* 2008; ROCHA *et al.* 2012).

Schaefer *et al.* (1989) revisaram a família e descreveram três espécies novas e propuseram uma hipótese preliminar das relações filogenéticas dentro da família. *Scoloplax dolicholophia* por Schaefer, Weitzman & Britski (1989) o qual foi descrita do Igarapé Tarumãzinho, um tributário do baixo Rio Negro (SCHAEFER *et al.*, 1989).

Rocha *et al.* (2008) publicaram a quinta espécie, *Scoloplax baskini*, com distribuição em pequenos igarapés tributários da parte baixa do rio Aripuanã, bacia do rio Madeira. Mais recentemente, a sexta espécie foi descrita, *Scoloplax baileyi*, de um tributário do rio Negro (ROCHA *et al.* 2012).

Scolopax é um gênero recente, o qual possui poucos trabalhos a seu respeito. O único trabalho de abordagem filogenética foi o de Schaefer (1990), o qual publicou um estudo anatômico mais detalhado e estabeleceu oito sinapomorfias para a família, corroborando a posição de Scoloplacidae dentro de Loricarioidea, como grupo irmão de Astroblepidae mais Loricariidae. Nessa análise, foram incluídas somente as quatro espécies então conhecidas.

Há poucos trabalhos ou informações sobre ecologia da família e o único trabalho focando essa família é o de Sazima *et al.* (2000), sobre história natural de *S. empousa*. Nesse trabalho os autores sugerem que *S. empousa* é uma espécie anual, hipótese também sugerida por Bailey & Baskin (1976) para *S. dicra*. Sazima *et al.* (2000) presumiram que *S. empousa* possua respiração aérea, utilizando o estômago como órgão acessório, fato também sugerido por Armbruster (1998).

Pouco se conhece sobre a reprodução das espécies de *Scolopax*. Burns & Weitzman (2005) sugeriram a ocorrência de inseminação interna em *S. dicra* baseado na presença de espermatozóide no ovário. Spadella *et al.* (2006) descreveram a estrutura dos espermatozoides de *S. distolothrix* e mais tarde, Spadella *et al.* (2008) descrevendo os aparelhos reprodutores da mesma espécie, documentaram a presença de espermatozoides dentro do ovário de fêmeas. Ambos os trabalhos indicaram a ocorrência de inseminação interna em *S. distolothrix*, reforçando a hipótese de Burns & Weitzman (2005) para *Scolopax*.

Algumas populações de *Scolopax* necessitam uma análise detalhada pois apresentam variações morfológicas. Recentemente *S. baskini* foi descrita de pequenos afluentes da bacia do Aripuanã (ROCHA *et al.*, 2008a). Na época, foi pensado que a espécie teria uma distribuição restrita na Amazônia, ocorrendo apenas em pequenos afluentes da bacia do Aripuanã. Apesar de um grande esforço amostral nos rios Madeira e Aripuanã durante duas grandes excursões (projeto PROBIO, 2004; 2005) e baseado em uma extensa coleta feita na bacia do Aripuanã em 2007 (ROCHA *et al.*, 2008a, b), nenhum espécime foi encontrado, exceto para as localidades da descrição. No rio Aripuanã a montante da Cachoeira das Pombas, o limite da distribuição da espécie, começam a aparecer quedas e corredeiras e toda a fauna de peixes é diferente neste ambiente. Assim, esta espécie seria restrita a parte inferior

do Aripuanã, onde ocorrem áreas alagáveis, com uma influência sazonal do rio principal (ROCHA, 2008).

Outras populações foram registradas no rio Negro, incluindo o Rio Branco, seu principal afluente. Análises morfológicas prévias relatam diferentes morfotipos em diferentes bacias de sua distribuição, como por exemplo, uma fenda na extremidade anterior do mesetmóide e diferença no número de raios das nadadeiras (ROCHA, 2008b). Variações morfológicas somente foram encontradas nas populações dos rios Purus e Negro, e não foram vistas nos exemplares do Aripuanã, o que indica uma possível diferenciação, tendo em vista o longo tempo de isolamento. Acreditam-se que esses morfotipos diferentes sejam potencialmente diferentes espécies.

O rio Negro até agora apresenta a maior diversidade de Scoloplacidae, 4 espécies ocorrendo sintopicamente. Apesar de atualmente não apresentar barreiras geográficas conspícuas ou não ter tido uma história de soerguimento de serras conhecida, o conhecimento sobre a evolução do rio Negro ainda é pouco compreendida. Apesar disso, alguns trabalhos tem mostrado a planície amazônica central como um ambiente complexo e dinâmico. Almeida-Filho *et. al.* (2007) demonstraram que o curso atual do baixo rio Negro foi resultado de captura fluvial devido a eventos tectônicos. Esses e outros eventos podem ter atuado na diversificação da fauna amazônica e com um ambiente lântico favorável, no qual o grupo tenha se diversificado naquela região.

Análises biogeográficas e históricas de peixes de água doce, fornecem uma conexão provável entre o biológico e a biota, pois a evolução de uma região pode ser explicada pela dispersão de peixes, uma vez que estas dependem de conexões diretas entre bacias hidrográficas e a história das interconexões da bacia. (LUNDBERG *et. al.*, 1998). Bem como, Avise (2000) diz que os processos micro e macroevolutivos, apesar de serem trados de forma distinta, são intimamente ligados, cada um somando nas informações do outro.

Não só eventos, como também diversificação de espécies podem ser estipulados a partir de dados de distância genética e comparados com datas conhecidas de eventos geológicos (AVISE *et. al.*, 1987). Nesse contexto, John Avise foi pioneiro em reconhecer que as divergências nas seqüências no DNAm_t fornecem um registro da história evolutiva dentro das espécies. (AVISE *et. al.*, 1987).

Em cordados, o DNAmtocondrial (DNAm_t) é uma molécula circular pequena, covalentemente fechada, com cerca de 16-20 kilobases. Está bem dotado com genes para 13 RNA's mensageiros, 2 RNA's ribossômicos e 22 RNA de transferência. Além desses 37 genes, uma área conhecida como "D-loop" (em vertebrados e quinodermos) com aproximadamente 0,8 kilobases e apresenta o controle de exercícios sobre a replicação de DNAm_t e transcrição de RNA (AVISE *et. al.*, 1987).

A distinção do DNAm_t é que a herança animal é estritamente maternal, assim, ao contrário da situação do DNA nuclear, o DNAm_t as mutações que surgem em indivíduos diferentes não são recombinadas durante a reprodução. Nenhum sistema molecular provavelmente será tão indicado para análises filogenéticas, como este é. (AVISE *et. al.*, 1987) considerando isso, Hebert (2004) diz que o DNA mitocondrial tem sido amplamente utilizado em estudos filogenéticos de animais.

Hebert *et. al.* (2004), propuseram que uma única sequência de genes seria suficiente para diferenciar todas, ou pelo menos a grande maioria das espécies de animais, e propuseram o uso da subunidade I do citocromo oxidase (COI) do gene mitocondrial como um sistema global de bioidentificação para animais (HEBERT *et. al.*, 2003). Esse marcador foi denominado DNA barcode, pois sequências desse gene funcionariam como um código de barras (HEBERT *et. al.*, 2003).

O uso do DNA barcode tem apresentado alta taxa de sucesso na identificação rápida de espécies de diversos grupos de artrópodes, aves, peixes e anfíbios (HEBERT *et. al.*, 2003, WARD *et. al.*, 2005). A taxa de evolução molecular do gene COI permite distinguir espécies próximas e também grupos filogeográficos dentro de uma mesma espécie (HEBERT *et. al.*, 2003, 2004; WARD *et. al.*, 2005). Ainda segundo Hebert et al (2003), a identificação de espécies crípticas, o descobrimento de novas espécies, a identificação de formas juvenis e adultas de uma mesma espécie e a identificação de espécies a partir de fragmentos de material biológico também poderiam ser descobertos com a utilização do *DNA barcoding*.

Entre os trabalhos desenvolvidos para a identificação de espécies empregando a sequências do gene COI, está o de Ward *et. al.* (2005), onde pesquisas com espécies de peixes teleósteos e cartilagosos provenientes dos mares australianos foram realizada. A partir disso se conclui que o DNA barcode pode ser usado com confiança nesses peixes e o uso desse método também resultou em sucesso na identificação inicial de espécies crípticas. O estudo realizado por Hebert *et. al.* (2003)

na Costa Rica onde foram utilizados dados comportamentais, morfológicos concomitante com o DNA barcoding indicou que a espécie de borboleta *Astrartes fulgurator* pode ser, na verdade, um complexo de aproximadamente dez espécies crípticas.

Frézal e Leblois (2008) questionam se o marcador teria capacidade de reconhecer grupos de indivíduos que ainda trocam material genético e grupos cujo fluxo gênico foi interrompido por um período de tempo suficiente para que uma nova espécie seja estabelecida, ou seja, capaz de identificar indivíduos de uma mesma espécie pertencentes a populações geograficamente isoladas e geneticamente estruturadas,

Avise *et. al.* (1987) reconheceram que as divergências entre as sequências no DNAm_t fornecem um registro da história evolutiva dentro das espécies, unindo assim a genética populacional e a sistemática e introduzindo o termo 'Filogeografia', afim de investigar as relações entre os processos micro e macro evolutivos e compreender como os eventos históricos ajudaram a formar a distribuição geográfica atual de populações, espécies e genes.

Uma análise molecular e populacional envolvendo uma espécie amplamente distribuída, com algumas diferenças morfológicas, poderia responder questões importantes sobre sua distribuição e revelar possíveis espécies crípticas, incrementando o conhecimento da rica ictiofauna amazônica. O estudo de tais populações pode evidenciar padrões biogeográficos que possam servir de modelos e serem testados com outros táxons.

A distribuição das espécies de Scoloplacidae revela padrões biogeográficos importantes para o entendimento da evolução da paisagem e biota neotropical, uma vez que, há espécies consideradas próximas, em bacias hoje isoladas.

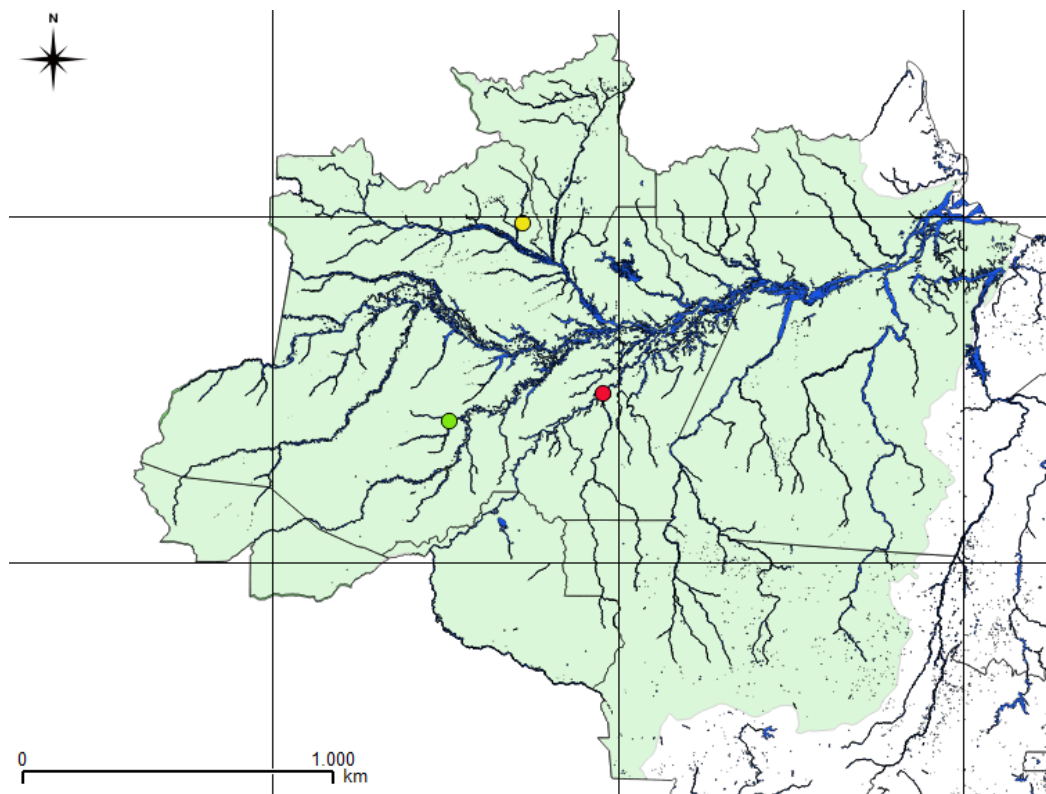
Logo, este trabalho teve como objetivo avaliar a variabilidade genética de três populações isoladas (Negro, Purus e Aripuanã) de *Scoloplax baskini* e sua relação com a distribuição geográfica. Para isso foi realizada a verificação da existência de fluxo gênico entre as populações, estimação do tempo de divergência entre as populações além de inferir a respeito dos processos demográfico e evolutivos que contribuíram para a atual distribuição das populações.

2. Material e métodos

2.1 Amostragem

Para a amostragem da subunidade do RNA ribossômico (16S) foram usados 2 exemplares da população rio Purus, 9 exemplares da população rio Negro e 6 exemplares da população rio Aripuanã. Já foram usados 2 exemplares da população rio Purus, 2 exemplares da população rio Negro e 2 exemplares da população rio Aripuanã. A figura 2 ilustra respectivas populações.

Figura 2: Bacia Amazônica reconhecido de verde e identificada pela círculo amarelo a população rio Negro, de vermelho a população rio Aripuanã e de verde a população rio Purus.



2.2 Extração de DNA e amplificação via PCR

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

Os fragmentos de DNA mitocondrial das três populações foram amplificados utilizando a técnica Reação da Polimerase em Cadeia (PCR) com *primers* universais para os genes Região Controle, CO I e 16s, conforme visto na figura 2.1.

Tabela 1: Tabela com as sequencias dos que foram utilizados na amplificação dos fragmentos.

Fragmento	Primers	Sequência do Primers	Referência
COI	L1490 (F)	5' - GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG - 3'	Vrijenhoek et. al. (1994)
	H2198 (R)	3' - TAAACTTCAGGGTGACCAAAAATCA -5'	
16s	TTF (F)	5'- GCCTAAGAGCATCGGTCTTGTA - 3'	Sivasundar et. al. (2001)
	TTF (R)	3' - TGGTAGCATGCGGGAAGAATGTCA - 5'	

A falta de êxito com os primers anteriores, motivou a mudança no primers para LCO1490 e HC02198, citados em Folmer 1985, conforme visto na tabela 2.

Tabela 2: Tabela com os primers utilizados em COI

Fragmento	Primers	Sequência do primers	Referencia
COI	LCO1490	5'-GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG-3'	Folmer <i>et.al.</i> (1985)
	HC02198	5'-TAAACTTCAGGGTGACCAAAAATCA-3'	

Cada PCR teve um volume final de 25 µL contendo: DNA genômico (50 ng), *Primer* forward (5mM) e *Primer* reverso (5mM), dNTP (1mM), MgCl₂ (25mM), Tampão 10X,

Taq DNA polimerase (5U/ µl). A PCR foi processada em termociclador com condições de perfis de temperatura específicos para a amplificação do fragmento desejado.

O produto amplificado foi analisado por eletroforese em gel de agarose 1%, corado com *GelRed (Biotium)* e visualizado em fotodocumentador UV e posteriormente purificado foi utilizando Polietilenoglicol 20% (PEG 8000).

O produto foi sequenciado utilizando o primer (5µM), juntamente com o *Kit Big Dye terminator v3.1*, Tampão 5X e água ultra-pura, seguindo as indicações do fabricante. Essa reação será levada ao termociclador seguida de precipitação em etanol 100%. A placa contendo as amostras foi injetada em analisador automático de DNA ABI 3130xl (AppliedBiosystems).

2.3 Análises biogeográficas

As sequências foram alinhadas automaticamente pelos programas CLUSTAL X 1.83 (THOMPSON *et. al.* 1997), e conferidas manualmente com o programa BioEdit. O modelo evolutivo foi testado no programa MEGA 6.06, assim como a distância genética para os dois fragmentos. (TAMURA *et. al.* 2013).

A análise de variância molecular (AMOVA, Excoffier *et. al.* 1992) implementada no programa ARLEQUIN 3.0 (Excoffier *et. al.* 2005), foi utilizada para se detectar a presença e o nível de diferenciação entre indivíduos de diferentes localidades. Os indivíduos são agrupados hierarquicamente em populações e as populações são incluídas em grupos definidos *a priori*, com base em critérios não genéticos como geográficos, ecológicos, ambientais, etc. A AMOVA estima os componentes de índice de Fixação (*F_{ST}*) (Weir & Cockerham 1984).

Usando o programa MEGA 4.0 (TAMURA *et. al.* 2007) foi gerada uma árvore filogenética enraizada em *Diplomystes mesembrinus* (RINGUELET 1982), seguindo o modelo de evolução Kimura 2 parâmetros.

Para determinação da Filogenia, foram utilizadas amostras do grupo interno e externo para estimar o relacionamento filogenético de *S. Baskini* com as demias congêneses.

Grupo interno

Scoloplacidae

Scoloplax baskini Rocha, Oliveira & Rapp Py-Daniel, 2008

Scoloplax empousa Schaefer, Weitzman & Britski, 1989

Scoloplax distolothrix Schaefer, Weitzman & Britski, 1989

Scoloplax dolicholophia Schaefer, Weitzman & Britski, 1989

Scoloplax dicra Bailey & Baskin, 1976

Scoloplax baileyi Rocha, Lazzarotto & Rapp Py-Daniel, 2012.

Grupo externo

Astroblepidae

Astroblepus sp.;

Callichthyidae

Callichthyinae

Callichthys callichthys (Linnaeus, 1758);

Hoplosternum littorale (Hancock, 1828)

Corydoradinae

Corydoras aeneus (Gill, 1858)

Corydoras ourastigma (Nijssen, 1972)

Diplomystidae

Diplomystes mesembrinus (Ringuelet, 1982)

Loricariidae

Delturinae

Hemipsilichthys gobio (Lütken, 1874)

Hemipsilichthys papillatus (Pereira, Oliveira & Oyakawa, 2000)

Neoplecostominae

Isbrueckerichthys epakmos (Pereira & Oyakawa, 2003)

Neoplecostomus paranensis (Langeani, 1990)

Nematogenyidae

Nematogenys inermis (Guichenot, 1848)

Resultados

2.4 Variação da distância genética em *Scoloplax baskini*

Foram sequenciados segmentos dos genes, mitocondriais de uma subunidade do RNA ribossômico (16S) e o gene codificador da citocromo oxidase I (COI), totalizando dois segmentos. O alinhamento final das amostras sequenciadas resultou em uma matriz com variação entre 456pb para o segmento 16S e 436pb do segmento COI de *Scoloplax baskini*, de cada população Negro, Purus e Aripuanã.

2.4.1 Gene 16S rRNA

Foram obtidas sequências do gene mitocondrial 16S rRNA de 2 exemplares da população rio Purus, 9 exemplares da população rio Negro e 6 exemplares da população rio Aripuanã de *Scoloplax Baskini* e doze exemplares da Ordem Siluriformes utilizada como grupo externo. O tamanho das sequências do gene 16S rRNA variou em torno de 456pb.

A distância genética das sequências foi de 6% a 7%, segundo o modelo de Tamura-Nei (Tamura e Nei, 1993) conforme visto na Tabela 3. Sendo assim, a distância genética de *Scoloplax baskini* da população do Rio Negro em relação à Purus de 7%, já a distância genética da população do Rio Negro em relação a Aripuanã foi de 6%, e a distância genética da população do rio Aripuanã em relação a população do rio Purus de 6%.

Tabela 3: Tabela entre as distancias genéticas de *Scoloplax baskini* das populações Negro, Purus e Aripuanã

Distância Genética entre as sequencias (Kimura-2-p)		
<i>Scoloplax baskini</i>	Negro	Aripuanã
Aripuanã	6%	-
Purus	7%	6%

2.4.2 Gene Citocromo Oxidase I

Foram obtidas sequências do gene mitocondrial citocromo oxidase I de 2 exemplares da população rio Purus, 2 exemplares da população rio Negro e 2 exemplares da população rio Aripuanã e doze exemplares de espécies do Ordem Siluriformes utilizada como grupo externo. O tamanho das sequências do gene citocromo oxidase I variou de 436 pb em *Scoloplax baskini*.

A distância genética das sequências variou de 9% a 16%, segundo o modelo de Tamura-Nei (Tamura e Nei, 1993), conforme visto na figura 4.2, sendo a distância genética de *Scoloplax baskini* da população do rio Negro em relação à Purus de 16% e a distância genética da população rio Negro em relação a população rio Aripuanã 16%, e da população rio Aripuanã em relação à população rio Purus de 9%.

Tabela 4: Relação entre as distâncias genéticas de *Scoloplax Baskini* das populações rio Negro, rio Purus e rio Aripuanã.

Distancia Genética Entre as sequencias (Kimura-2-p)

<i>Scoloplax baskini</i>	Rio Negro	Rio Aripuanã
Rio Aripuanã	16%	-
Rio Purus	16%	9%

As distâncias genéticas das sequências obtidas entre o grupo interno variam entre 10% até 21%, segundo o modelo de Tamura-Nei (Tamura e Nei, 1993), conforme visto na tabela 5, em evidência a distância genética de *Scoloplax empousa* em relação a *S. distolothrix* igual a 10%.

Tabela 5: Relação de distância genética entre o grupo interno de *Scoloplax*.

Distancia Genética Entre as sequencias (Kimura-2-p)				
	<i>Scoloplax baskini</i>	<i>Scoloplax dicra</i>	<i>Scoloplax distolothrix</i>	<i>Scoloplax dolicholophia</i>
<i>Scoloplax dicra</i>	18%	-	-	-
<i>Scoloplax distolothrix</i>	19%	19%	-	-
<i>Scoloplax dolicholophia</i>	17%	21%	19%	-
<i>Scoloplax empousa</i>	18%	17%	10%	18

Já nas distâncias genéticas das sequências obtidas entre o grupo externo variam entre 7% até 30%, segundo o modelo de Tamura-Nei (Tamura e Nei, 1993), conforme visto na tabela 6, em evidência a distância genética de *Hemipsilichthys gobio* em relação a *Hemipsilichthys papillatus* igual a 7% e *Isbrueckerichthys epakmos* em relação a *Neoplecostomus paranensis*. Na qual as distâncias genéticas encontradas para as populações em questão nesse trabalho (9%;16%) se apresentam superiores a distâncias genéticas para espécies reconhecidamente distintas.

Tabela 6: Relação de distância genética entre o grupo externo. Onde o número 1 corresponde a *Astroblepus sp*, 2 corresponde a *Callichthys callichthys*, 3 corresponde a *Corydoras aeneus*, 4 corresponde a *Corydoras ourastigma*, 5 corresponde a *Diplomystes mesembrinus*, 6 corresponde a *Hemipsilichthys gobio*, 7 corresponde a *Hemipsilichthys papillatus*, 8 corresponde a *Hoplosternum littorale*, 9 corresponde a *Isbrueckerichthys epakmos*, 10 corresponde a *Nematogenys inermis*, 11 corresponde a *Neoplecostomus paranensis*.

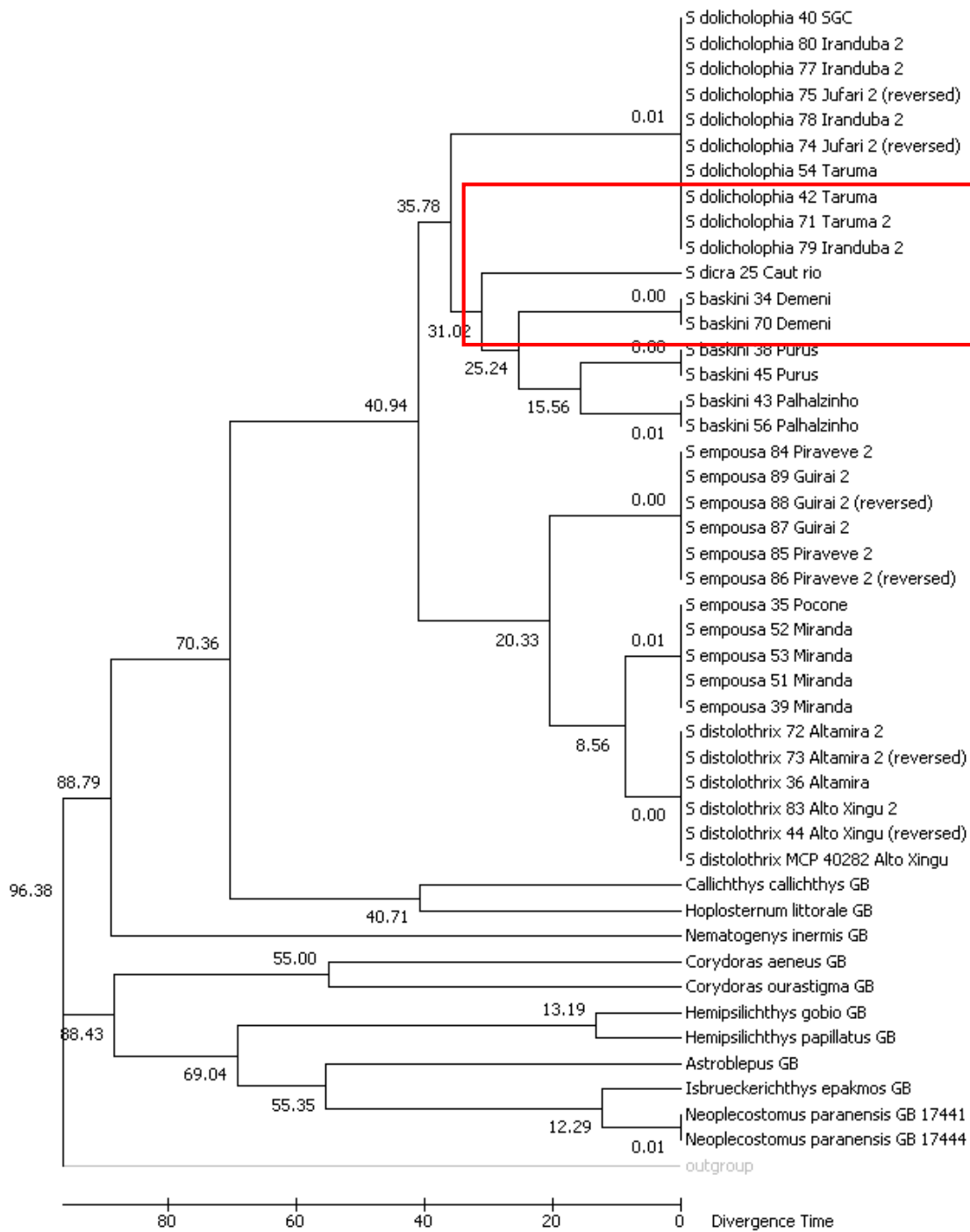
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	29%	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3	25%	30%	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4	27%	31%	22%	-	-	-	-	-	-	-	-
5	25%	26%	24%	27%	-	-	-	-	-	-	-
6	18%	29%	24%	28%	23%	-	-	-	-	-	-
7	21%	32%	26%	30%	24%	7%	-	-	-	-	-
8	31%	23%	24%	26%	29%	30%	32%	-	-	-	-
9	21%	31%	31%	30%	26%	25%	29%	36%	-	-	-
10	22%	27%	30%	30%	29%	27%	28%	28%	27%	-	-
11	20%	30%	30%	28%	24%	23%	26%	37%	9%	27%	-

2.5 Análise da estrutura genética populacional e fluxo gênico

O teste de AMOVA revelou que o índice de fixação é igual 0,98765. Os resultados desta análise ainda apontam que a maior parte da variação genética (98.77%) está distribuída entre as populações e que uma menor parte (1.23%) dessa variação ocorre dentro das populações.

Através do programa MEGA 7.0.26 (TAMURA *et. al.* 2013), foi obtida uma *timetree*, conforme pode ser observado na figura 5. Os tempos de divergência para todos os pontos de ramificação na topologia foram calculados utilizando o método da máxima probabilidade, com base no modelo Tamura-Nei. A árvore é desenhada para escala, com comprimentos de ramo medidos no número relativo de substituições por site. A análise envolveu 18 sequências de nucleotídeos. Há um total de 436 pares de bases no conjunto de dados final. A *timetree* (figura 3) mostra o tempo de divergência para divisão entre *Scoloplax* e o grupo interno (*Scoloplax Dicra*) ocorreu aproximadamente 31.02 ma, a divisão da população Negro (Demeni) em relação a população Purus, ocorreu há 25.24 ma, já a população Purus se direnciou da população população Aripuanã (Palhalzinho) há 15.56 ma.

Figura 3: Imagem timetree da análise filogeográfica molecular usando o método 'Maximum Likelihood', destacado de vermelho a espécie *Scoloplax baskini*.



3. Discussão

Os resultados obtidos na variação da distância genética média entre as sequências mostraram 7% no gene 16s, já os resultados obtidos na variação na distância genética média entre as sequências mostraram 16% no gene COI, os quais são considerados significativos segundo Nei e Kumar (2001) indicando que os dados devem conter informação filogenética suficiente.

Em geral, essa distância genética encontrada nas sequências das populações do rio Negro, rio Aripuanã e rio Purus variou de 9% a 16%, as quais se apresentam maiores do que as relatadas para diferentes espécies no meio marinho, que variam de 0,3% e 8,4% (Ward *et. al.*, 2009).

No trabalho de Carvalho *et. al.* (2010), foram observados vários casos de possíveis especiações crípticas, à distância genética do COI de forma intra-específica relevante, variando de 2,2 a 10% para várias espécies, como por exemplo, *Imparfinis minutus* (9%), *Pamphorichthys vittata* (10%)

Considerando que em Rubinoff (2006), a identificação de espécies só pode ser aceita se houver uma similaridade de 97% e 98%, ou seja, uma diferença genética de 3% e 2%, os valores encontrados para as populações do rio Negro, rio Purus e rio Aripuanã de *Scoloplax baskini* se mostram significativos.

Os trabalhos de Carvalho *et. al.* (2011), Rubinoff *et.al.* (2006), Ward *et. al.*, (2009), adotaram que as distâncias genéticas, dentro dos parâmetros de Kimura, para espécies crípticas, variam entre 2% e 9%, considerando que os valores encontrados neste trabalho variaram entre 7% e 16%, se admite que tais trabalhos citados corroboram com a hipótese de que as populações *Scoloplax baskini* sejam espécies crípticas.

A análise de variância molecular (AMOVA) revelou que a maior porção da variação genética encontrada, 98.77%, está distribuída entre as populações. As populações de *S. baskini* que nessa análise foram delimitadas pelas localidades amostradas, estão estruturadas, o que pode ser evidenciado pelo índice de fixação que é igual a 0,98765 com elevada significância. Os resultados ainda apontam que a maior parte da variação genética (98.77%) está distribuída entre as populações e que

uma menor parte (1.23%) dessa variação ocorre dentro das populações. Essa análise nos informa que há algum nível de estruturação nas populações amostradas.

A *timetree* (figura 3) gerado pelo programa MEGA (TAMURA et. al. 2007) mostra o tempo de divergência para divisão entre *Scoloplax* e o grupo interno (*Scoloplax Dicra*) ocorreu aproximadamente 31.02 ma, a divisão da população Negro (Demeni) em relação a população Purus ocorreu há 25.24 ma, já a população Purus se direnciou da população população Aripuanã (Palhalzinho) há 15.56 ma. Nesse mesmo periodo alguns trabalhos (NOGUEIRA, 2008; FIGUEIREDO 2009; HOORN et. al., 2010a), apontam que o cenário da bacia Amazônica neste período era muito diferente do atual.

Hoorn et. al. (2010b) diz que o cenário da Amazônia Ocidental já foi constituído por um complexo alagado que se originaram no Craton Amazônico e foram direcionados para a região sub-andina e para o Caribe. Este foi substituído pelas zonas úmidas, o qual teve sua historia subdividida em na fase precursora ou fluvio-lacustre, entre aproximadamente 24 a 16 milhões de anos (Ma) durante o Mioceno Antigo, na fase Pebas ou mega-zona úmida, entre aproximadamente 16 a 11,3 Ma no Mioceno Medio, e na fase Acre ou zona úmida, entre 11,3 a 7 Ma no Mioceno Tardio. (HOORN et. al. 2010b)

A primeira fase do desenvolvimento da zona úmida é marcada por uma abertura nas bacias do *Foreland* sub-andino do Peru e Colômbia, e na bacia intracratônica de Solimões no oeste do Brasil, no decorrer do Mioceno Antigo. Os antigos sistemas fluviais foram em grande parte substituídos por lagos, pântanos, canais de maré e invaginações marinhas. (FIGUEIREDO et. al. 2009; HOORN et. al. 2010). Fase esta, que se aproxima da data de diferenciação de *S. baskini* da população rio Negro e população rio Purus. A mudança do meio fluvial para meio alagado desse periodo pode ter contribuído para o processo de vicariância entre essas populações.

Um processo semelhante a esse pode ter ocorrido no processo de separação entre a população rio Purus e população rio Aripuanã, em razão da data de diferenciação destes (15.56 ma) se aproximar da data da segunda fase do desenvolvimento da zona-mega úmida durante o Mioceno Médio (~ 16 a 11,3 Ma, fase de Pebas) (HOORN et. al. 2010b). Esta foi marcada com as condições lacustres expandidas ainda mais). Durante este período, a mega-zona úmida atingiu a sua

extensão máxima. Esta zona úmida ficou sujeita a incursões marinhas, as quais são intercaladas como leitos finos no estrato fluvial do Mioceno Médio. Durante a sua extensão máxima, a área úmida cobriu uma área que compreende grande parte da planalto amazônico ocidental atual, onde estes ambientes aquáticos hospedaram uma fauna diversificada (HOORN et. al. 2010; FIGUEREIDO et . al. 2009). Essas invasões marinhas e retenção de água salobra em grande parte da planície central da Amazônia, poderia ter atuado com um processo de vicariância de *S. baskini* na população Purus e população Aripuanã.

Hoorn et. al. (2010b) ainda diz que terceira fase foi marcada por mares de zonas que hospedavam uma fauna de vertebrados ricos em espécies, porém menor do que a fase anterior, a fauna de moluscos era uma espécie pobre e já se parecia fortemente com a fauna fluvial amazônica moderna e este representa o início do rio Amazonas transcontinental.

4. Conclusão

A espécie *Scoloplax baskini*, apresenta uma ampla variabilidade genética entre a populações dos rio Negro, Purus e Aripunã, sendo relativamente superior as distâncias genéticas registradas para indivíduos de mesmas espécies.

Foi possível ainda mensurar a variância molecular, a qual revelou que a maior parte da variabilidade genética é encontrada entre as populações, e em oposição, dentro das populações, a menor parte da variabilidade genética, a qual indica que as populações estão estruturadas. Também foi verificado o tempo de divergência dessas populações, a qual pode ser inferida possíveis invasões marinhas e retenções de água salobra em grande parte da planície central da Amazônia, como potencial razão de diferenciação dessas populações, atuando com um processo de vicariância nas populações de *Scoloplax baskini*.

Novos estudos genéticos com outros marcadores moleculares poderão ajudar a explicar melhor quais eventos atuaram na variabilidade genética dentro da espécie em questão, e assim fornecer informações mais precisas sobre a história evolutiva desta espécie.

5. Referências bibliográficas

- ALMEIDA-FILHO, R. & MIRANDA, F.P. **Mega capture of the Rio Negro and formation of the Anavilhanas Archipelago, Central Amazônia, Brazil: evidences in a SRTM digital elevation model**. *Remote Sensing of Environment*, 110: 387-392. 2007.
- ARMBRUSTER, J.W. **Modifications of the digestive tract for holding air in loricariid and scoloplacid catfishes**. *Copeia*, 1998: 663–675. 1998.
- AVISE, J. C. **Phylogeography: The History and Formation of Species**. Harvard University Press. ISBN 0-674-66638-0. 2000.
- AVISE, J. C.; ARNOLD, R. M.; BALL, Jr.; BERMINGHAM, T.; LAMB J. E.; NEIGEL, C. A.; REED, A.; SAUNDERS., N. C. **Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics". *Annual Review of Ecology and Systematics***. 489–522. 1987.
- BAILEY, R.M. & BASKIN, J.N. ***Scoloplax dicra*, a new armored catfish from the Bolivian Amazon**. *Occasional Papers of the Museum of Zoology University of Michigan*, 674: 1–14. 1976.
- BURNS, J.R. & WEITZMAN, S.H. **Insemination in ostariophysan fishes**. In: Grier, H.J. & Uribe, M.C. (Eds.). **Viviparous fishes**. Homestead: New Life Publications, Florida. P. 107–134. 2005.
- CARVALHO D. C.; OLIVEIRA D. A. A. **Deep barcode divergence in Brazilian freshwater fishes: the case of the São Francisco River basin, Mitochondrial DNA**, 22:sup1, 80-86, DOI:.2010.
- DE PINNA, M.C.C. **Phylogenetic relationships of Neotropical Siluriformes (Teleostei: Ostariophysi): historical overview and synthesis of hypotheses**. *Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes*. (Malabarba, L.R., Reis, R.E., Vari, R.P., Lucena, Z.M.S., Lucena, C.A.S., eds). EDIPUCRS, Porto Alegre, Brasil, 279-330 pp. 1998.

- EXCOFFIER, L. & LISCHER, H.E. L. **Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows.** Molecular Ecology Resources. 10: 564-567. 2010.
- FRÉZZAL, L.; LEBLOIS R. **Four years of DNA barcoding: current advances and prospects.** Inf.Genet. Evol.,8, 727-736. 2008.
- HEBERT, P. D. N.; STOECKE M. Y.; ZEMLAK T. S.; FRANCIS, C. M. **Identification of birds through DNA barcodes.** Plos Biol., 2, 01-06. 2004.
- HEBERT, P. D. N.; CYWINSKA A., BAAL S. L. e WAARD J. R. **Biological identifications through DNA barcodes.** Proc. R. Soc. London B., 270, 313–321. 2003.
- HOORN, C; FRANK, P.; GUERREIRO J. **The development of the Amazonian mega-wetland (Miocene; Brazil, Colombia, Peru, Bolivia).** Amazonia, Landscape and Species Evolution: A Look into the Past, 1st edition. Edited by C. Hoorn and F.P. Wesselingh. 2010a.
- HOORN, C.; RODDAZ M.; DINO, R.; SOARES, E.; UBAS, C. OCHOA-LOZANO, D. MAPES, R. **The Amazonian Craton and its influence on past fluvial systems (Mesozoic-Cenozoic, Amazonia).** Amazonia, Landscape and Species Evolution: A Look into the Past, 1st edition. Edited by C. Hoorn and F.P. Wesselingh. 2010b.
- ISBRUCKER, I.J.H. **Classification and catalogue of the mailed Loricariidae (Pisces, Siluriformes).** Verslagen en Technische Gegevens, 22: 1–181. 1980.
- LUNDBERG, J.G; SULLIVAN, J.P.; RODILES-HERNANDEZ, R.; HENDRICKSON, D.A. **Discovery of African roots for the Mesoamerican Chiapas catfish, *Lacantunia enigmatica*, requires an ancient intercontinental passage.** Proc Acad Nat Sci Phil 156: 39–53. 1998 .
- NOGUEIRA, A.C.R. **Guinada para o Atlântico.** Sci Am Brasil 1: 22-27. 2008.
- ROCHA, M.S. **Scoloplacidae.** In: Queiroz, L.J.; Torrente-Vilara, G.; Ohara, W.M.; Silva, T.H.P.; Zuanon, J.; Doria, C.R.C. (Org.). **Peixes do Rio Madeira.** 1ed. São Paulo: Dialeto Latin American Documentary, v. 2, p. 196-203. 2013.

- ROCHA, M.S.; DE OLIVEIRA, R.R. & RAPP PY-DANIEL, L. **A new species of *Gladioglanis* Ferraris & Mago-Leccia from Rio Aripuanã, Amazonas, Brazil (Siluriformes: Heptapteridae).** Neotropical Ichthyology, 6(3): 433-438. 2008b.
- ROCHA, M.S.; DE OLIVEIRA, R.R. & RAPP PY-DANIEL, L. ***Scoloplax baskini*: a new spiny dwarf catfish from rio Aripuanã, Amazonas, Brazil (Loricarioidei: Scoloplacidae).** Neotropical Ichthyology, 6 (3): 323–328. 2008a.
- ROCHA, M.S.; LAZZAROTTO, H. & RAPP PY-DANIEL, L. **A new species of *Scoloplax* with a remarkable new tooth morphology within Loricarioidea (Siluriformes: Scoloplacidae).** Copeia, no prelo. 2012.
- RUBINOFF, D. **Utility of mitochondrial DNA barcodes in species conservation.** Conserv. Biol., 4, 1026-1033. 2006.
- SAZIMA, I.; MACHADO, F.A. & ZUANON, J.A. **Natural history of *Scoloplax empousa* (Scoloplacidae), a minute spiny catfish from the Pantanal wetlands in western Brazil.** Ichthyological Exploration of Freshwaters, 11: 89–95. 2000.
- SCHAEFER, S.A. **Anatomy and relationships of the scoloplacid catfishes.** Proceedings of the Academy of Natural Sciences of Philadelphia, 142: 167–210. 1990.
- SCHAEFER, S.A. **Scoloplacidae.** In: Reis, R.E.; Kullander, S.O., & Ferraris, Jr., C.J. (Eds.). **Checklist of the freshwater fishes of South and Central America.** Edipucrs, Porto Alegre. p. 310–311. 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, 141: 181–211. 1989.
- TAMURA, K. et al. **MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0.** Molecular biology and evolution, p. mst197, 2013.
- THOMPSON, J.D.; Gibson, T.J.; Plewniak, F.J.; & Higgins, D.G. **The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools.** Nucleic Acids Research 24: 4876– 4882. 1997.

WARD, R.D.; HANNER R.; HERBERT P.D.N.; **The campaign to DNA barcode all fishes, FISH-BOL. J Fish Biol** 74:329–356. 2009.

WARD. R. D., ZEMLAK T. S., INNES B. H., LAST P. R. e HERBERT P. D. N. **DNA barcoding Australia's fish species.** Phil.Trans. R. Soc. B, 360, 1847– 1857. 2005.