

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS - UFAM
INSTITUTO DE SAÚDE E BIOTECNOLOGIA - ISB
CAMPUS MÉDIO SOLIMÕES – COARI
PROGRAMA INSTITUCIONAL DE BOLSAS DE INICIAÇÃO
CIENTÍFICA - PIBIC

**USO DO CÓDIGO DE BARRAS GENÉTICO (DNA BARCODE)
COMO FERRAMENTA NO ESTUDO DE PEIXES DE IGARAPÉS,
DO SISTEMA DE DRENAGEM DO RIO AMAZONAS, DA
RESERVA FLORESTAL ADOLPHO DUCKE.**

Bolsista: Alessandra Silva e Silva, FAPEAM

Coari
2014

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS - UFAM
INSTITUTO DE SAÚDE E BIOTECNOLOGIA - ISB
CAMPUS MÉDIO SOLIMÕES – COARI
PROGRAMA INSTITUCIONAL DE BOLSAS DE INICIAÇÃO
CIENTÍFICA - PIBIC

RELATÓRIO FINAL

PIB-B/0053/2013

**USO DO CÓDIGO DE BARRAS GENÉTICO (DNA BARCODE)
COMO FERRAMENTA NO ESTUDO DE PEIXES DE IGARAPÉS,
DO SISTEMA DE DRENAGEM DO RIO AMAZONAS, DA
RESERVA FLORESTAL ADOLPHO DUCKE.**

Bolsista: Alessandra Silva e Silva, FAPEAM

Orientador: Prof.^a MSc. Natasha Verdasca Meliciano

Coari

2014

Todos os direitos deste relatório são reservados à Universidade Federal do Amazonas à FAPEAM, ao projeto “Uso do código de barras genético (DNA BARCODE) como ferramenta no estudo de peixes de igarapés, do sistema de drenagem do rio Amazonas, da reserva florestal Adolpho Ducke” e “Levantamento genético de peixes de igarapé da reserva experimental Adolpho Ducke (Manaus/AM), por meio do *DNA Barcoding*” e aos seus autores. Parte deste relatório só poderá ser reproduzida para fins acadêmicos ou científicos.

Esta pesquisa, financiada pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Amazonas – FAPEAM por meios dos projetos: “Uso do código de barras genético (DNA BARCODE) como ferramenta no estudo de peixes de igarapés, do sistema de drenagem do rio Amazonas, da reserva florestal Adolpho Ducke” e “Levantamento genético de peixes de igarapé da reserva experimental Adolpho Ducke (Manaus/AM), por meio do *DNA Barcoding*”.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, por me abençoar sempre, por me enviar em uma bela família e por ter amigos inesquecíveis!!!

À minha orientadora, Profa. MSc. Natasha Verdasca Meliciano, pelas correções minuciosas, pelos ensinamentos, pela paciência e pela confiança em mim depositada.

À Universidade Federal do Amazonas e ao Instituto de Saúde e Biotecnologia (Coari-AM), que proporcionaram a oportunidade e as condições para a realização desse estudo.

Aos professores do curso de Biotecnologia pelas experiências e ensinamentos transmitidos nesses anos.

A todos os amigos de graduação, pelos quatro anos de experiências compartilhadas, sendo a turma mais humilde da UFAM (risos). Preferi não citar nomes para não cometer nenhuma injustiça.

Ao meu tio Elizeu Laranjeira e toda sua família, que me acolheram em sua casa e foram minha família durante meu primeiro ano longe de casa.

Aos amigos do Laboratório de Biologia Molecular e Genética.

Às amigas e parceiras de morada com quem convivi durante esses anos: Diana e Hedivane, pela família postiça criada, pelas madrugadas de estudos e pelos momentos de alegria e superação.

Ao meu namorado, W. Júnior, pelo amor, carinho, companheirismo e compreensão.

À minha querida avó, Joana Dias, representante da família como um todo, pelo amor e ajuda financeira em determinados momentos.

A todos que direta ou indiretamente fizeram parte da realização de mais essa etapa da minha vida.

Em especial, à melhor família que alguém poderia ter. Meus pais: Almir Prado e Marinalva Dias, minhas irmãs: Adriana e Ananda, pelo amor, apoio financeiro incondicional, amizade e é claro, a confiança. Essa conquista é nossa! Amo vocês!

MUITO OBRIGADA!

*A sabedoria de um ser humano
não é definida pelo quanto ele
sabe, mas pelo quanto ele tem
consciência de que não sabe...*

Augusto Cury

RESUMO

Abordagens taxonômicas moleculares como a do *DNA barcoding*, vem sendo utilizadas com sucesso nos mais variados níveis e grupos taxonômicos, promovendo: o descobrimento de espécies crípticas, a resolução da variação morfológica e o esclarecimento de ambiguidades dentro de um grupo taxonômico, sendo uma técnica interessante para determinação de faunas pouco estudadas, como a ictiofauna amazônica que tem somente 40% das espécies conhecidas, das quais 2000 espécies encontram-se longe dos grandes rios, como em Igarapés, refletindo a carência de estudos neste tipo de ecossistema. Diante do exposto, o presente trabalho propôs, amostrar a ictiofauna de Igarapés da Reserva Florestal Adolpho Ducke (Manaus/AM), pertencente ao INPA que faz parte do programa PPBio, e fazer uma caracterização genético/molecular dessas amostras. Os espécimes coletados foram triados e identificados morfológicamente e uma amostra de tecido de cada indivíduo foi retirada para extração de DNA, amplificação e sequenciamento do gene da COI (fragmento padrão do BARCODE de peixes). As sequências editadas foram submetidas à identificação molecular, por meio de recursos de bioinformática, como as ferramentas de identificação e busca disponíveis no portal BOLD (www.barcodinglife.org). Como resultado, foram coletados 366 amostras, representando 27 morfotipos diferentes, dentre as quais, onze foram identificadas molecularmente e todos os exemplares já se encontram devidamente tombados na Coleção Ictiológica/INPA e Coleção de Tecidos/UFAM. O fragmento genético gerado possuiu o total de 586 pb, dos quais 329 são conservados, 257 variáveis e 256 foram parcimoniosamente informativos. As identificações moleculares presente no BOLD foram congruentes com a maioria das identificações feitas a priori, mas foi informativa na resolução de ambiguidades morfológicas, apresentando uma alta similaridade (>99%) frente à consulta nos dados *online*. Além disso, dois registros foram considerados inéditos e foram tombados no sistema BOLD, assim como todas as sequências geradas. A diversidade genética intraespecífica máxima foi 0,34%, estando dentro do limite do *barcode gap* de 2%, assim como também o nível de dissimilaridade genética considerada, neste trabalho, para as identificações *online*, sendo menor que (< 1%). Além disso, a distância interespecífica mínima e máxima foi de 16% e 24%, respectivamente, o que, juntamente com baixa divergência intraespecífica obtida, garante a monofilia das espécies, observada nas análises filogenéticas. Embora o fragmento gerado não seja o tamanho padronizado pela técnica (648pb), este se mostrou um comprimento adequado para este trabalho, sendo todos os fragmentos gerados depositados no sistema BOLD.

Palavras-chave: Genética, DNA Barcode, Ictiofauna, Igarapés.

ABSTRACT

Molecular taxonomic studies such as the DNA barcoding, has been successfully used in various levels and taxonomic groups, promoting: the discovery of cryptic species, the resolution of morphological variation and to clarifying ambiguities within a taxonomic group, being an interesting technique for determination of faunas less studied, such as the Amazon fish fauna, that has only 40% of known species, among which over 2,000 unknown species are far from large rivers, such as small stream, reflecting the lack of studies in this type of ecosystem. Thus, this study aimed to sample the fish fauna from small stream in the Adolpho Ducke Forest Reserve (Manaus / AM), belonging to the INPA's PPBio program, and characterize them in genetic and taxonomic manner. The collected specimens were identified morphologically and a tissue sample were taken for DNA extraction, amplification and sequencing of the COI gene (standard BARCODE fragment of fish). The edited sequences were subjected to molecular identification using bioinformatics resources, such as the search and identification tools available on BOLD portal (www.barcodinglife.org). As a result, 366 samples were collected, representing 27 different morphotypes, of which eleven (11) were molecularly identified. The vouchers were deposited in the Ichthyological Collection/INPA and Tissue Collection/UFAM. The genetic fragment generated has a total of 586 bp, of which 329 are conserved, 257 variable and 256 were parsimoniously informative. The present molecular IDs at BOLD were congruent with most identifications made a priori, but it was more informative in resolving the morphological ambiguities, presenting a high molecular similarity (> 99%) compared to the query in the online database. In addition, two records were considered unpublished and were listed in BOLD system, as well as all sequences generated. The maximum intraspecific genetic diversity was 0.34%, being within the limits of the barcode gap of 2%, as well as the level of genetic dissimilarity considered for the IDs online, being less than (<) 1%. In addition, the minimum and maximum interspecific distances were 16% and 24%, respectively. These distances and the low intraspecific divergences obtained also ensures monophyletic groups observed in phylogenetic tree. Although the generated fragment has not the suggested standard size (648pb), this proved to be a suitable length for this proposal, with all the fragments generated were deposited in BOLD system.

Keywords: Genetics, DNA Barcode, Ichthyofauna, Small stream.

LISTA DE FIGURAS

Figura 01: Região Hidrográfica Amazônica Brasileira.....	14
Figura 02: Imagem esquemática do “Código de barras de DNA”.....	19
Figura 03: Localização da Reserva Florestal Adolpho Ducke (RFAD) próxima à cidade de Manaus/AM.....	25
Figura 04: Coleta no igarapé de 1ª ordem do Tinga na RFAD.....	26
Figura 05: Desenvolvimento do processo de avaliação em gel de agarose para confirmar o sucesso da PCR.....	28
Figura 06: Amostragem dos peixes coletados na RFAD.....	32
Figura 07: Frequência das espécies em todos os sete pontos de coleta da RFAD.....	33
Figura 08: Árvore filogenética das onze espécies sequenciadas.....	37
Figura 09: Distância genética intraespecífica obtida das 11 espécies identificadas, sequenciadas e submetidas ao BOLD <i>system</i>	38
Figura 10: Distância genética interespecífica obtida das 11 espécies identificadas, sequenciadas e submetidas ao BOLD <i>system</i>	38
Figura 11: Comparação de variação genética intraespecífica e interespecífica obtida das 11 espécies identificadas, sequenciadas e submetidas ao BOLD <i>system</i>	39

LISTA DE SIGLAS

AM – Amazonas

BOLD – *Barcode of Life Data*

COI – Citocromo C Oxidase subunidade I

DNA – Ácido Desoxirribonucleico

FAPEAM – Fundação de Amparo à Pesquisa do Amazonas

GPS – *Global Positioning System*

INPA – Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia

ISB – Instituto de Saúde e Biotecnologia

LEGAL - Laboratório de Evolução e Genética Animal

NCBI – *National Center for Biotechnology Information*

pb – Pares de Bases

PCR – *Polymerase Chain Reaction*

pH – Potencial Hidrogeniônico

PPBio – Programa de Pesquisa em Biodiversidade

RFAD – Reserva Florestal Adolpho Ducke

UFAM – Universidade Federal do Amazonas

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	11
1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
1.1 BACIA AMAZÔNICA	14
1.2 ICTIOFAUNA AMAZÔNICA	15
1.3 IGARAPÉS E SEUS PEIXES	16
1.4 DNA BARCODE	19
2 JUSTIFICATIVA	21
3 OBJETIVOS	23
3.1 GERAL	23
3.2 ESPECÍFICOS	23
4 MATERIAIS E MÉTODOS	25
4.1 CARACTERIZAÇÃO DA ÁREA DE ESTUDO E OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS	25
4.2 METODOLOGIA LABORATORIAL	27
4.3 ANÁLISE DE DADOS.....	28
5 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	31
5.1 COLETA E AMOSTRAGEM	31
5.2 ANÁLISES MOLECULARES	35
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	41
REFERÊNCIAS	42
APÊNDICE	47

INTRODUÇÃO

A identificação de indivíduos de uma determinada espécie, bem como a delimitação da mesma, é essencial para a compreensão da diversidade da vida (DAYRAT, 2005), pois isso tem sido pré-requisito em estudos científicos, na manutenção da diversidade e no estabelecimento de planos de manejo e conservação mais eficientes, além de auxiliar em projetos de bioprospecção e levantamentos da biodiversidade (DINIZ & FERREIRA, 2000; FRÉZAL & LEBLOIS, 2008).

Nesse contexto, além da identificação das espécies pelo viés tradicional (como o morfológico), abordagens moleculares, como o do *DNA Barcode* (HEBERT, 2003), estão sendo atualmente utilizadas com sucesso nos mais variados grupos e níveis taxonômicos como: mamíferos (CLARE, 2007; BORISENKO et al., 2008), aves (KERR et al., 2007), peixes (Ward et al., 2005), insetos (HEBERT et al., 2004) e nematóides (ELASSER et al., 2009), facilitando o procedimento de identificação e discriminação de grupos e de indivíduos, viabilizando abordagens biotecnológicas e de bioprospecção.

Uma das finalidades da metodologia de identificação molecular (incluindo o *DNA Barcode*) se baseia na criação de um banco de dados com informações genéticas integradas aos dados taxonômicos e ecológicos, afim de que novos espécimes não identificados ou de difícil identificação morfológica possam ser comparados com o banco de dados existente e designados ao nível taxonômico de interesse ou mais inferior possível, podendo promover: 1- o descobrimento de espécies crípticas, 2- a resolução de problemas de variação morfológica, 3- o esclarecimento de ambiguidades dentro de um determinado grupo taxonômico e 4- o descobrimento de espécies de potencial biotecnológico (HEBERT et al., 2003).

O *DNA Barcode* é um sistema desenhado para prover rapidez, acurácia e a identificação automática de espécies usando regiões curtas e padronizadas de genes como marcador interno das espécies (HEBERT & GREGORY, 2005), com a eficiência de um ‘código de barra’, usando como referência um banco público de dados de sequências organizadas. Este método pressupõe a monofilia recíproca das espécies e que a divergência intraespecífica seja sempre menor que a divergência interespecífica (o que configura o *Barcoding gap*), de modo que os indivíduos de uma mesma espécie se

agrupem em um único clado, diferenciado dos demais. O *DNA Barcoding* permite a identificação biológica em nível de família, gênero e espécie com grande exatidão na maioria dos casos (HEBERT, CYWINSKA et al., 2003; HEBERT, RATNASINGHAM et al., 2003).

É uma metodologia idealizada por Hebert e colaboradores no ano de 2003 em que um fragmento do gene mitocondrial do Citocromo C Oxidase subunidade I (COI) pode ser utilizado como marcador molecular padronizado para a identificação de espécies descritas e no auxílio da descoberta de novas espécies, além de gerar um banco de dados que irá ser complementar ao da taxonomia tradicional.

O trecho de COI utilizado como *Barcode* possui 648 nucleotídeos e está localizado na extremidade 5' do gene. Esse gene mitocondrial foi escolhido por estar presente em todos os organismos eucariontes, apresentar fácil manipulação, reprodutibilidade técnica, evolução molecular relativamente rápida e essa é uma propriedade que permite o aparecimento do que se convencionou chamar de *Barcoding gap*, possibilitando a discriminação entre indivíduos da mesma espécie e de espécies distintas, promovendo um “sinal” gênico suficiente para diferenciar táxons relacionados filogeneticamente (HEBERT, CYWINSKA et al., 2003; HEBERT, RATNASINGHAM et al., 2003).

O uso da técnica tem contribuído significativamente em estudos de ecologia e biodiversidade de organismos neotropicais na Costa Rica (e.g. HEBERT, 2004; HAJIBABAEI, 2006) e devido ao seu grande sucesso, vários governos estão adaptando a ferramenta do *barcoding* para as análises da biodiversidade e bios prospecção.

Por outro lado, a funcionalidade deste sistema molecular de identificação depende da qualidade e quantidade da informação molecular depositada em bancos públicos de consulta. Além disso, a taxonomia com base somente na sequência de DNA é fortemente criticada principalmente pelos taxonomistas, pois não se pode resumir toda a unidade evolutiva e delimitação biológica em um fragmento genético molecular (LIPSCOMB, PLATNICK et al., 2003; EBACH & HOLDREGE, 2005; CARVALHO, BOCKMANN et al., 2007).

O *DNA Barcode* não pretende substituir a taxonomia tradicional, porém gera um conjunto de dados novos, adicionais e informativos. Os dados do tipo *DNA Barcode*

também tem um papel muito importante em outros estudos, além dos relacionados à biodiversidade, podendo ser usados em inventários, estudos ecológicos e evolutivos (VALENTINI, 2009) como, também, em programas de monitoramento e de fiscalização da fauna (HAJIBABAEI et al., 2007), pois proporciona um banco de dados padronizado, eficiente e de ampla aplicação.

Esse tipo de abordagem se torna interessante em estudos de ecossistemas tão ricos e diversos como o amazônico, onde se encontra a maior biodiversidade de espécies de peixes continentais existentes, representando 85% de toda biodiversidade de água doce no continente (FALABELLA, 1994). No entanto, acredita-se que somente 40% da fauna de peixes amazônicos seja conhecida (LUNDBERG et al., 2000), necessitando de maiores esforços para sua elucidação.

Existem ainda estudos menos conservadores em que afirmam que a ictiofauna na região amazônica é significativamente pouco estimada e incompreendida (SCHAEFER, 1998). Um dos motivos para se acreditar nesse dado é a presença recorrente de espécies crípticas – espécies morfológicamente iguais, mas geneticamente independentes (FRANKHAM et al., 2002), situação comum em organismos aquáticos (COLATRELLI et al., 2012).

Diante do exposto, a presente proposta se utilizou do recurso genético e biotecnológico do DNA Barcode como auxílio na identificação das espécies de peixes provenientes de igarapés da região da Reserva Experimental Adolpho Ducke/Manaus/AM (unidade INPA/PPBio), com o objetivo de caracterizar geneticamente as espécies coletadas ao acessar as informações do gene mitocondrial do Citocromo C Oxidase subunidade I, comparando os dados obtidos com os dados preexistentes nos bancos e catálogos públicos, contribuindo com dados genéticos inéditos de caracterização molecular e de diversidade críptica, além de auxiliar nos estudos moleculares em desenvolvimento nesta região, possibilitando futuros estudos voltados às espécies, populações, comunidades e diversidade de peixes de igarapés, como os que margeiam a região da cidade de Coari/AM, já que a mesma possui a unidade regional CapMedSol também pertencente ao PPBio.

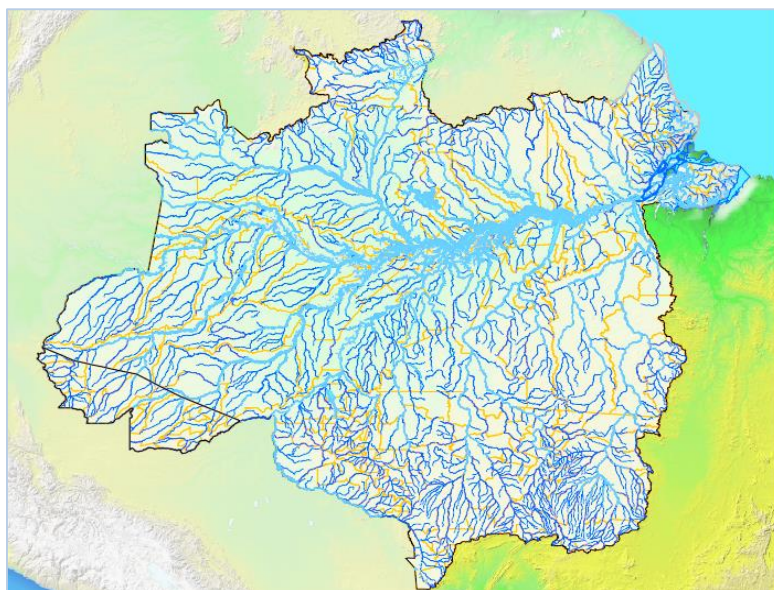
1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 BACIA AMAZÔNICA

As bacias hidrográficas são unidades fundamentais para a gestão da terra e da água, sendo identificadas como unidades de planejamento administrativo para fins de conservação dos recursos naturais (UMETSU et al., 2012).

A bacia Amazônica é o maior compartimento de água doce do planeta com cerca de 15-20 % do total disponível (Figura 01). Apresenta dimensões magníficas drenando oito países latino-americanos ao longo de 6.700.000 Km². Seus afluentes nascem na Cordilheira dos Andes, nas partes baixas do Planalto Central e no Planalto das Guianas, o que proporciona características distintas relativas à qualidade e propriedade das águas. (TRANCOSO, 2006). Apresenta em toda a sua extensão uma complexa e extremamente densa rede de pequenos riachos, denominados regionalmente como igarapés (JUNK, 1983).

Figura 01: Região Hidrográfica Amazônica Brasileira.



Fonte: http://portal2010.ana.gov.br/_img/bacias/mapaAmazonas.jpg

Além disso, seu posicionamento sobre a linha do equador e zona de convergência intertropical confere à bacia uma sensível dinâmica hidroclimática, proporcionado pela variabilidade do clima nos hemisférios sul e norte (SALATI & VOSE, 1984). Essa heterogeneidade nos atributos ambientais foi um dos fatores que

possibilitou a evolução das espécies extintas e atuais amazônicas e a formação de ecossistemas com propriedades distintas e respectiva biodiversidade (SILVA et al., 2005).

O conhecimento acerca da diversidade biológica é o ponto de partida para todos os estudos básicos ou aplicados relacionados às ciências da vida e o reconhecimento de espécies, bem como a habilidade de nomeá-las é fundamental para o estudo da ecologia, comportamento, evolução e todas as outras disciplinas relacionadas aos organismos (SAVAGE, 1995).

1.2 ICTIOFAUNA AMAZÔNICA

Os peixes de água doce estão representados por cerca de 8.500 espécies (mais de 40%) de toda diversidade de peixes do globo, sendo a maioria nos vastos sistemas de rios e lagos tropicais (ANJOS, 2009). A região neotropical, a qual inclui a maior parte da América do Sul e Central é a mais diversificada e rica do planeta, com mais de 4.475 espécies de peixes de água doce descritas (REIS et al., 2003), sendo que a bacia amazônica tem cerca de 1.300 espécies catalogadas (ANJOS, 2009).

Essa vasta diversidade encontrada nos riachos, rios e lagos da bacia amazônica está restrita a poucos grupos taxonômicos. O mais importante deles sem dúvida alguma é representado pelos Ostariophysi, que incluem os Cypriniformes, Characiformes, Siluriformes e Gymnotiformes. Das quatro ordens citadas, com exceção dos Cypriniformes, as outras três ocorrem naturalmente na região Neotropical e também na Bacia Amazônica (ZUANON et al., 2010).

Além desses grupos, o outro grande grupo que dominou a água doce, particularmente na África, foi a família Cichlidae (Percomorpha: Perciformes). Outros grupos taxonômicos menores também ocorrem na região Neotropical, como, por exemplo, os Cyprinodontiformes e os Synbranchiformes (ZUANON et al., 2010). Com base nisso, Junk (1983) relata que várias premissas ecológicas, zoogeográficas e genéticas têm implicação direta na tentativa de explicar a diversidade dessa ictiofauna amazônica.

Já na América do Sul, a bacia amazônica apresenta a maior biodiversidade de espécies de peixes continentais existentes, representando 85% de toda biodiversidade de água doce no continente (FALABELLA, 1994), distribuídos em diferentes habitats e ambientes como seus grandes rios, lagos e um sistema complexo constituído por pequenos cursos de água, conhecidos como igarapés, que drenam as áreas de floresta, constituindo a maior e mais densa rede hídrica do mundo (JUNK, 1983; WALKER, 1991; SANTOS & FERREIRA, 1999).

Estudos sobre distribuição espacial, alimentação e estrutura de comunidades de peixes em pequenos igarapés vêm sendo realizados na região amazônica (ex. RIBEIRO & ZUANON, 2006). No entanto, o estado atual do conhecimento da diversidade de peixes de água doce na região Neotropical ainda é bastante incipiente, e, de acordo com alguns pesquisadores, cerca de metade ou mais da ictiofauna ainda não foi descrita (ZUANON et al., 2010).

Considerados ambientes relativamente pobres em números de espécies, estima-se que num único igarapé podem ocorrer de 20 a 50 espécies de peixes (LOWE-MCCONNELL, 1999), sendo na média de 15 espécies (ZUANON et al., 2010). Todas estas observações indicam que a biodiversidade da ictiofauna amazônica ainda está pouco compreendida e subestimada. Isso é marcante nas áreas de igarapés, que são representados por incontáveis canais de água (JUNK, 1983; WALKER, 1991; SANTOS & FERREIRA, 1999).

1.3 IGARAPÉS E SEUS PEIXES

Os igarapés, denominação regional dada aos riachos amazônicos, são cursos d'água de pequeno porte, caracterizados pelo leito delimitado, correnteza relativamente acentuada e baixa temperatura da água. Sua porção média e superior é quase totalmente encobertas pelo dossel da floresta ripária e seu leito tipicamente contém acúmulo de troncos e galhos caídos (SANTOS & FERREIRA, 1999).

Uma característica física dos igarapés é a subida abrupta do nível da água durante a ocorrência de fortes chuvas em suas bacias de drenagem. Nesses eventos meteorológicos extremos o nível da água alcança ou ultrapassa os limites das margens, disponibilizando aos peixes novos recursos alimentares. Em decorrência da redução da

luz incidente produzido pela sombra das espécies florestais e a correnteza relativamente acentuada, os igarapés são sistemas aquáticos com baixa produtividade biológica e bastante dependentes da floresta. Esta atua como fonte de recursos alimentares para o sistema lótico, os quais são à base da cadeia trófica nestes ecossistemas (SANTOS & FERREIRA, 1999).

Dezenas de espécies de peixes habitam os diferentes ambientes aquáticos disponíveis nos igarapés, desde as águas abertas dos canais, até os pequenos espaços entre as folhas mortas da floresta que se depositam no fundo. De forma geral, a característica ecológica mais marcante dessa ictiofauna é a sua grande dependência da floresta, tanto para obtenção de alimentos, como insetos e plantas que caem na água, quanto para obtenção de abrigo, fornecido pelas folhas, galhos e troncos provenientes da floresta (ZUANON et al., 2010).

Os peixes apresentam grande diversidade morfológica, ocupam uma ampla diversidade de habitats e apresentam uma história evolutiva bastante peculiar. Essas características fazem com que a compreensão da sua sistemática e história evolutiva seja um tema ainda sujeito a muita discussão tornando-os um excelente material básico nos estudos voltados a questões adaptativas, taxonômicas e evolutivas (RIBEIRO, 2007).

Três diferentes ambientes podem caracterizar os igarapés que influenciam a fauna de peixes: corredeiras, água corrente e poços ou remansos (ZUANON et al., 2010). Além disso, os igarapés podem ser classificados em distintas ordens sendo a união de dois igarapés de 1ª ordem, isto é, que não tem contribuição de outros cursos d'água, formando um igarapé de 2ª ordem, por sua vez, a união de dois igarapés de 2ª ordem resulta em um igarapé de 3ª ordem e assim sucessivamente (COLATRELI, 2012).

Características estruturais e físico-químicas dos ambientes de igarapés são consideradas importantes para determinação da abundância, da distribuição e da composição de espécies de peixes, tais como, tamanho do rio (BUSSING & LÓPEZ, 1977; ANGERMEIER & KARR, 1984), velocidade da água (BUSSING & LÓPEZ, 1977; HARDING et al., 1998) e profundidade (ANGERMEIER & KARR, 1984; MARTIN-SMITH, 1998) variam em função da ordem do igarapé. Tributários de 1ª ordem têm vazão, profundidade, largura, área e heterogeneidade espacial, relativamente,

pequenas quando comparadas com igarapés de 2ª ordem e o mesmo acontece quando se compara estes com igarapés de 3ª ordem (JUNK, 1993; SIOLI, 1984).

A possibilidade de evidenciar padrões de riqueza, diversidade, abundância e densidade de peixes em igarapés depende da existência de um acúmulo de informações comparáveis sobre igarapés de diferentes ordens, com características estruturais variadas e ligadas a diferentes bacias hidrográficas. Entretanto, um dos problemas mais evidentes quando se pretende realizar estudos comparativos em igarapés de terra firme da Amazônia Central é exatamente a carência de tais informações. A inexistência de uma metodologia comum aos estudos até então realizados, não permite que se façam considerações seguras sobre eventuais semelhanças ou diferenças observadas na riqueza, diversidade e abundância das espécies (ANJOS, 2005).

Neste contexto, uma das áreas mais estudadas da Amazônia brasileira é a Reserva Florestal Adolpho Ducke (Reserva Ducke), esta foi criada em 1963 por meio da Lei Estadual nº 41, de 16 de fevereiro de 1963, que legalizou o ato de cessão da área da Reserva do Governo do Amazonas ao INPA. Em seu eixo Norte-Sul a reserva é cortada por um platô central, que é o divisor de águas entre duas bacias hidrográficas. No lado oeste estão os igarapés que deságuam no rio Negro e a leste drenam os igarapés que são afluentes do rio Amazonas. Quase todas nascentes desses corpos de água estão dentro da reserva, o que preserva a integridade desse sistema (BACCARO et al., 2008).

Certamente a bacia amazônica abriga grande parte dessa fauna “desconhecida” pela ciência, e como salientado por Menezes (1969), uma das principais lacunas é justamente o escasso conhecimento acerca da fauna de peixes de igarapés nas regiões de cabeceiras dos rios amazônicos e áreas pouco exploradas, principalmente as mais distantes dos centros urbanos regionais (ZUANON et al., 2010).

Sabe-se que alguns estudos têm sido feitos quanto à caracterização físico-química, à ocupação dos nichos pelas espécies e as mudanças nas diversidades e abundância destas ao longo das estações climáticas da Amazônia (PAZIN, 2006), no entanto nenhum estudo ao nível genético tem sido feito.

1.4 DNA BARCODE

A necessidade de se identificar espécies de uma forma mais rápida e eficiente está vinculada a uma série de situações relacionadas à biologia, desde a questão de saúde, de pragas da agricultura, de identificação de espécies exóticas, de monitoramento ambiental, de manejo de fauna, no turismo, no controle de comércio de produtos biológicos e/ou organismos protegidos e de manejo de estoques (HEBERT et al., 2003).

Assim, diante deste cenário, de grande biodiversidade e eminente perigo de sua perda, um método rápido e padronizado que auxilie na caracterização dessa biodiversidade é essencial. Foi então com esse intuito que o “código de barras de DNA” (Figura 02) ou *DNA Barcoding* foi proposto (HEBERT et al., 2003).

Figura 02: Imagem esquemática do “Código de barras de DNA”.



Fonte: portal20140211_2 www5.usp.br

O *DNA Barcode*, promete acelerar o ritmo das descobertas de espécies, permitindo aos taxonomistas uma rápida identificação de tipo de espécimes, além de destacar táxons divergentes que possam vir a ser novas espécies (HEBERT & GREGORY, 2005). Essa identificação rápida e precisa de espécies é um componente crítico de programas de monitoramento da biodiversidade em grande escala. Isso faz com que o código de barras de DNA, que é uma abordagem molecular, receba muita atenção atualmente (HAJIBABAEI et al., 2007).

Esse método pressupõe que um pequeno fragmento de DNA pode ser utilizado como um identificador padronizado e único, tal como, um código de barras para

identificação de espécies, servindo tanto na identificação de espécies já descritas, como auxiliando na descoberta de novas espécies, em resoluções e ambiguidades taxonômicas e inacessibilidade morfológica. Para animais, o fragmento em questão é uma região de 648 pares de bases, a partir da extremidade 5', do gene mitocondrial do Citocromo C Oxidase subunidade I (COI) (HEBERT et al., 2003).

O gene mitocondrial do Citocromo C Oxidase subunidade I codifica parte de uma enzima terminal da cadeia respiratória da mitocôndria em organismos aquáticos. Recentemente, para outros organismos, melhores segmentos e genes a serem usados como *DNA Barcoding* estão sendo estabelecidos, como por exemplo, em aves (KERR et al., 2005). Os primeiros estudos realizados com essa metodologia foram extremamente satisfatórios com um grau de resolução taxonômica maior que 95% (HEBERT et al., 2003).

Segundo Hajibabaei et al., (2007) a metodologia de *DNA Barcoding* pode contribuir, como vem sendo demonstrado, com a Taxonomia, Sistemática e Genética de Populações.

Na Taxonomia o *DNA Barcoding* pode ser utilizado para identificar espécimes atípicos e contribuir para revisão da nomenclatura de vários grupos.

Na Sistemática o *DNA Barcoding* pode servir como ponto de partida para a seleção de táxons e as sequências de DNA obtidas nos projetos de *DNA barcoding* podem ser adicionadas ao conjunto de sequências utilizadas para elaboração de filogenias.

Na Genética de Populações o *DNA Barcoding* pode fornecer um primeiro sinal sobre a extensão e natureza das divergências populacionais o que facilitará os estudos comparativos da diversidade de várias espécies.

A metodologia do *DNA Barcode*, é um sistema bom, porém depende do que é depositado no banco de dados do *Bold of Life Data System* (BOLD), tanto na quantidade, quanto na qualidade. Uma vez que nenhum banco de dados é imune a erros, essa técnica pode resultar em alguns problemas como a ausência de informações ou também estar propensa a sofrer nas identificações, fazendo-as de maneira incorreta, necessitando desta forma de algumas ampliações e melhoramento em seus dados (COLLINS et al., 2012).

2 JUSTIFICATIVA

O Brasil é um dos 17 países megadiversos, contendo mais de 80% de todas as espécies em área menor que 30% do planeta terra. Desse total, grande parte está representada por peixes amazônicos, o que constitui 85% de toda a biodiversidade de água doce no continente sul-americano (FALABELLA, 1994).

No entanto, menos da metade (40%) deste grupo de vertebrado amazônico é conhecida (LUNDBERG et al., 2000), necessitando de maiores esforços para sua elucidação, uma vez que conhecer toda sua biodiversidade é um fator crucial para que o Brasil se torne líder na área biotecnológica e de bioprospecção em seu território, permitindo a utilização consciente de seus recursos naturais (DINIZ & FERREIRA, 2000), como é caso da bacia amazônica.

Até hoje, a maioria dos estudos relacionados à ictiofauna de igarapés, tiveram foco em detalhes ambientais e ecológicos, tais como; densidade de espécies, diversidade, abundância e variáveis ambientais, como; pH, vazão de água, profundidade entre outros (ex. SABINO & ZUANON, 1998; MENDONÇA et al., 2005; ANJOS & ZUANON, 2007; DIAS et al., 2010), havendo pouca informação sobre a genética da maioria das espécies que compõem estes ambientes.

Sendo assim, em virtude do pouco conhecimento de sua complexidade, biodiversidade e importância, os igarapés da Amazônia necessitam de estudos mais complementados que os levem em consideração, não somente como grupos ecológicos ou parâmetros geoambientais, mas que os vejam como um sistema de comunidade de espécies interligadas entre si e diretamente inter-relacionadas ao lugar onde se encontram, possuindo uma história evolutiva característica e biodiversidade genética, única, que pode estar oculta por cripsia.

Por meio de abordagens genéticas, como a identificação molecular de espécies (Código de Barras Genético – *DNA Barcode*) e o relacionamento filogenético das espécies componentes, conectado às variáveis ambientais, pode-se obter resultados importantes para o descobrimento da diversidade biológica e para esclarecimento de processos ambientais e evolutivos atuantes, sobre diversos grupos taxonômicos, de maneira que estas abordagens, se corretamente aplicadas, também podem auxiliar na

elucidação de questões mais complexas de um ambiente tão singular quanto a bacia amazônica (MORITZ, 1994).

Esta proposta, visa auxiliar o estudo molecular genético em desenvolvimento nessa reserva (Reserva Florestal Adolpho Ducke), possibilitando desdobramentos futuros de estudos voltados às espécies, comunidades e diversidade de peixes compartilhados entre ambientes de estrutura similar a esses igarapés.

3 OBJETIVOS

3.1 GERAL

Caracterizar por taxonomia molecular a diversidade das espécies de peixes dos igarapés coletados da reserva do PPBio/INPA - Adolpho Ducke (Manaus/AM) de maneira padronizada, seguindo a metodologia do *DNA Barcoding* e disponibilizar os dados obtidos, num portal público de referência para que estas possam ser usadas para identificação molecular de espécies de peixes provenientes da região em questão e de outras áreas correlatas, fornecendo, ainda, informações importantes que possibilitem estudos científicos sob aspectos variados de biodiversidade e biotecnológicos.

3.2 ESPECÍFICOS

- Coletar amostras provenientes dos igarapés da Reserva Florestal Adolpho Ducke (PPBio/INPA) – Manaus/AM;
- Identificar as amostras coletadas da Reserva Florestal Adolpho Ducke, por meio de chaves de identificação e catálogos;
- Obter o DNA purificado das amostras coletadas, através da extração de DNA, contando com a parceria entre: Laboratório de Biologia Molecular - UFAM/Coari e Laboratório de Evolução e Genética Animal (LEGAL) - UFAM/Manaus;
- Obter os dados de sequência molecular do gene mitocondrial do Citocromo C Oxidase subunidade I dos peixes previamente coletados, contando com a parceria entre: Laboratório de Biologia Molecular - UFAM/Coari e Laboratório de Evolução e Genética Animal (LEGAL) - UFAM/Manaus;
- Identificar molecularmente os indivíduos sequenciados, comparando os dados obtidos com bancos moleculares e genéticos de domínio público *online* como o BOLD *system*;
- Comparar a identificação molecular com a taxonômica clássica a fim de confirmar a identificação, encontrar espécies crípticas e ambiguidades morfológicas;
- Analisar os dados moleculares de maneira filogenética;
- Determinar distâncias intraespecífica e interespecífica, relacionando ao *barcode gap*;

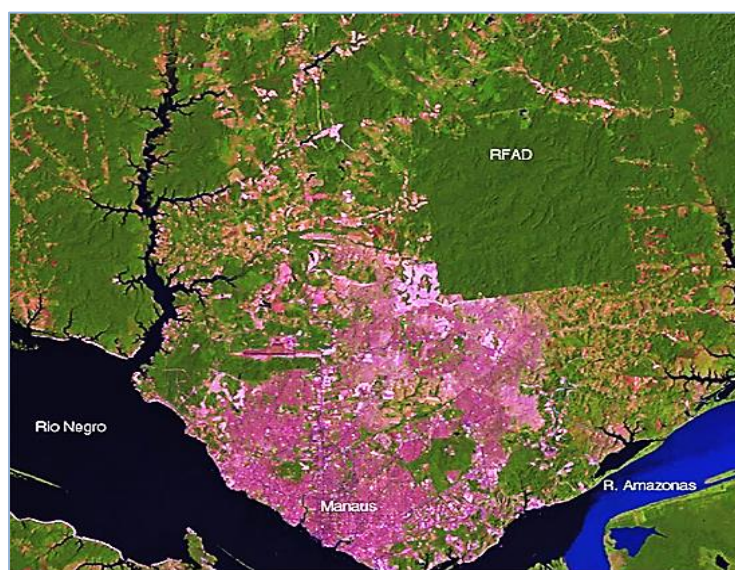
- Criar um banco das sequências do código de barras genético (*DNA barcode*) para os indivíduos/espécies estudados da Reserva Experimental Adolpho Ducke e disponibilizá-lo nos bancos *online*, para futuras pesquisas, consultas públicas e comparações.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 CARACTERIZAÇÃO DA ÁREA DE ESTUDO E OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS

O trabalho já continha 83 amostras prévias coletadas, com isso, foi feita uma coleta de amostras adicionais, provenientes de igarapés da Reserva Florestal Adolpho Ducke (Manaus/AM) que pertence ao INPA (Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia) e assim, como a unidade CapMedSol da cidade de Coari/AM, faz parte do programa de monitoramento PPBio. Essa área está localizada a noroeste da cidade de Manaus, estando situada na região central da Amazônia em uma área de platô, compreendendo um sistema de cinco sub-bacias de igarapés e 100 Km² de floresta tropical úmida de terra firme, recortados por um *grid* composto por subunidades de 1 Km² (Figura 03). O sistema de trilhas dá acesso a 38 pontos permanentes de amostragens em igarapés e poças associadas. Dentre esses pontos, a coleta foi efetuada nos igarapés do Ipiranga (1^a, 2^a e 3^a ordens), Tinga (1^a, 2^a e 3^a ordens) e Uberê (1^a ordem), totalizando sete pontos de coleta. Os peixes foram coletados apenas no período diurno, aproximadamente 6 horas de coleta diária, com duas pessoas por ponto amostral.

Figura 03: Localização da Reserva Florestal Adolpho Ducke (RFAD) próxima à cidade de Manaus/AM.



Fonte: ppbio.inpa.gov.br/sitios/ducke

As amostras coletadas para este estudo foram obtidas no mês de outubro de 2013 por meio da metodologia desenvolvida e aprimorada desde 2001, a partir de estudos realizados pelo Projeto Igarapés na Reserva Florestal Adolpho Ducke, Manaus/AM, utilizando-se de forma ativa redes de cerco, puçás, peneiras e armadilhas (cf. ANJOS & ZUANON, 2007), tentando coletar o número amostral (N) mínimo de 05 espécimes por espécie/morfotipo (Figura 04).

Figura 04: Coleta no igarapé de 1ª ordem do Tinga na Reserva Florestal Adolpho Ducke (RFAD).



Fonte: Silva, A. S. 2013.

Da cada espécime, uma amostra de tecido muscular da região dorsal foi retirada, tentando conservar ao máximo as características externas de cada indivíduo, sendo estes tecidos armazenados individualmente em microtubos de 1,5mL contendo álcool 95% e colocados em *freezer* de -10°C à -80°C . O restante dos exemplares foi fixado em formaldeído 10% que depois foi substituído por álcool 70%. Todos os pontos amostrados foram georeferenciados por GPS e pelo menos 1 indivíduo de cada espécie foi fotografado vivo e posteriormente fixado. Todas as espécies coletadas foram identificadas com o uso de chaves dicotômicas, literatura especializada, e comparação com exemplares depositados em museus e coleções científicas.

4.2 METODOLOGIA LABORATORIAL

As etapas laboratoriais seguintes foram concentradas no Laboratório Temático de Genética da Universidade Federal do Amazonas (Laboratório de Biologia Molecular e Genética – ISB/UFAM/Coari).

Os tecidos acondicionados em álcool 95% foram submetidos ao procedimento para obtenção do DNA total, seguindo o protocolo de extração por fenol-clorofórmio, conforme descrito por Sambrook e colaboradores (1989), com modificações, onde a amostra de tecido passou por uma série de fases de exposição a reagentes químicos com a finalidade de eliminar todas as estruturas e moléculas não desejadas, restando somente o DNA (ácido desoxiribonucleico) isolado e purificado.

Com o material genético extraído foi realizada a quantificação dessas amostras para verificar a integridade e quantidade do DNA, com isso, foi desenvolvida a reação em cadeia da polimerase, do inglês *Polymerase Chain Reaction* (PCR), que consiste na amplificação, ou no aumento de número de cópias, do segmento do DNA referente à região de interesse, que, neste caso, é um fragmento do gene mitocondrial do Citocromo C Oxidase subunidade I.

Para isso, foi utilizado um par de iniciadores (*primers* - modificados por Tomas Hrbek a partir de dados publicados por Ward e colaboradores em 2005) específicos para a região gênica de interesse (gene mitocondrial do Citocromo C Oxidase subunidade I). Para facilitar a etapa de sequenciamento, foram incorporadas caudas moleculares M13 e T7 as extremidades 5' dos *primers forward* e *reverse*, respectivamente.

Para confirmar o sucesso da PCR, o produto amplificado passou pelo processo de avaliação em gel de agarose (1%) corado com o intercalante de DNA *GelRed* (*Biotum*) (Figura 05). Após a verificação do sucesso de amplificação, o produto da PCR foi purificado e utilizado na reação de sequenciamento nucleotídico, que é uma reação de PCR modificada, com a utilização do Kit de sequenciamento *BigDye*, seguindo as especificações do fabricante, sendo todas estas etapas desenvolvidas na unidade da UFAM de Coari (Laboratório de Biologia Molecular e Genética).

Figura 05: Desenvolvimento do processo de avaliação em gel de agarose para confirmar o sucesso da PCR.



Fonte: Silva, A. S. 2014.

Para a obtenção da sequência nucleotídica final, o DNA amplificado, purificado e submetido à reação de sequenciamento, foi então levado ao sequenciador automático ABI 3130xl (*Applied Biosystems*), seguindo a metodologia padronizada pelo fabricante, sendo esta etapa executada no sequenciador automático da unidade UFAM de Manaus, contando com a parceria do Laboratório de Evolução e Genética Animal – LEGAL.

Após o sequenciador automático ter gerado as sequências nucleotídicas para cada indivíduo coletado, estas foram enviadas por *email* para Coari/AM, onde puderam ser conferidas, alinhadas e editadas manualmente através do programa *BioEdit* (HALL, 1999). Com estas sequências, alinhadas e editadas foi originada uma matriz de dados contendo as sequências dos indivíduos de cada espécie amostrada, sendo estes, os dados utilizados nos processos analíticos seguintes.

4.3 ANÁLISE DE DADOS

Inicialmente, as análises foram feitas observando a composição e estrutura das sequências. Em seguida, com as sequências obtidas alinhadas e editadas, foi montado um banco de dados molecular dos indivíduos das espécies coletadas, para a aplicação da

metodologia de identificação do *DNA barcode* e, assim, identificar geneticamente as espécies de peixes coletados. Para isso, utilizamos recursos de bioinformática como as ferramentas de identificação molecular e de busca disponíveis no portal *Barcode of Life Data Systems* (www.barcodinglife.org) (RATNASINGHAM & HEBERT, 2007) – que faz uma análise de identificação por similaridade genética entre; o fragmento do gene mitocondrial do Citocromo C Oxidase subunidade I sequenciado e o banco de dados desta mesma região disponível *online* neste portal.

A identificação obtida pelo *DNA barcode* foi comparada com a identificação tradicional feita previamente, com o objetivo de validar tanto a identificação molecular quanto a morfológica e, também, encontrar possíveis espécies crípticas ou acessos moleculares indisponíveis no sistema BOLD e, portanto são sequências inéditas candidatas a serem depositadas neste banco *online*.

Com as sequências geradas, também foi feita uma reconstrução filogenética, por meio do método de Agrupamento de Vizinhos (*Neighbour-joining*, NJ) (SAITOU E NEI, 1987), usando o modelo de distância Kimura-2-Parâmetros (K2P) (KIMURA, 1980), utilizando o aplicativo disponível no próprio portal BOLD *Systems* (www.barcodinglife.org).

As análises filogenéticas foram aplicadas com o objetivo de relacionar filogeneticamente os morfotipos encontrados, buscando testar a monofilia de indivíduos morfológicamente semelhantes e polimórficos, verificando a qualidade do fragmento sequenciado, a existência de diversidade críptica e a variação morfológica intraespecífica.

Ainda com o programa de análise do BOLD, foram tabeladas matrizes de distância genética intra e interespecífica, utilizando a medida de distância gênica *p* (TAMURA et al., 2011), com a confiabilidade estimada pelo modelo Kimura-2-Parâmetros (K2P) (KIMURA, 1980) para avaliar a relação da distância genética intra e interespecífica e o *barcode gap* (limite molecular de identificação).

Estes métodos filogenéticos e de distância, foram aplicados para validar a identificação taxonômica clássica, os resultados obtidos das ferramentas de busca do *DNA barcoding* e melhor visualizar os relacionamentos entre os grupos de peixes encontrados, além de visualizar sua distribuição gênica em relação à área coletada, a

diversidade crípica e identificar sequências inéditas e candidatas a serem depositadas no banco *online* BOLD.

Os resultados obtidos também podem ser utilizados para complementar e comparar os resultados até então obtidos desde 2011 nos demais pontos de coleta: 12 pontos coletados, sendo 9 com 267 amostras já estudadas e analisadas.

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 COLETA E AMOSTRAGEM

Foram coletadas 378 amostras adicionais ao trabalho, sendo 173 provenientes dos igarapés do Ipiranga (1ª, 2ª e 3ª ordens), 127 dos igarapés do Tinga (1ª, 2ª e 3ª ordens) e 78 dos igarapés do Uberê (1ª ordem). Entre elas, foram identificados 31 morfotipos diferentes (Figura 06). Foram eles: *Aequidens pallidus*, *Ancistrus* sp, *Apistograma agassizi*, *Apistograma cf erythrura*, *Apistograma cf guaporé erythrura*, *Apistogramma regani*, *Bryconops cf caudomaculatus*, *Bryconops giacopini*, *Bryconops* sp, *Copella nigrofasciata*, *Crenicichla* sp, *Crenuchus spirulus*, *Erythrinus erythrinus*, *Gymnotus coropinae*, *Gymnotus pedanopterus*, *Helogenes marmoratus*, *Hemigramus cf pretoensis*, *Hoplias malabaricus*, *Hypessobrycon aff melazonatus*, *Hypopygus lepturus*, *Mesonauta insignis*, *Microcharacidium ekotrioides*, *Microsternarchus bilineatus*, *Pyrrhulina cf brevis*, *Rineloricaria lanceolata*, *Rivulus micropus*, *Rivulus kirovskyi*, *Rivulus micropus compressus*, *Satanoperca lilith*, *Steatogenys duidae* e *Synbranchus* sp "reticulata". Tais identificações foram realizadas através do auxílio de chaves dicotômicas, literatura especializada e comparação com exemplares depositados em museus e coleções científicas.

Dentre os 31 morfotipos amostrados, dez são pertencentes à ordem dos Characiformes (*Bryconops cf caudomaculatus*, *Bryconops giacopini*, *Bryconops* sp, *Copella nigrofasciata*, *Hemigramus cf pretoensis*, *Crenuchus spirulus*, *Hypessobrycon aff melazonatus*, *Erythrinus erythrinus*, *Microcharacidium ekotrioides* e *Pyrrhulina cf brevis*), três pertencem a ordem dos Siluriformes (*Helogenes marmoratus*, *Ancistrus* sp e *Rineloricaria lanceolata*), seis estão na ordem dos Gymnotiformes (*Gymnotus coropinae*, *Gymnotus pedanopterus*, *Hoplias malabaricus*, *Microsternarchus bilineatus*, *Hypopygus lepturus* e *Steatogenys duidae*), oito fazem parte dos Perciformes (*Aequidens pallidus*, *Apistograma agassizi*, *Apistograma cf erythrura*, *Apistograma cf guaporé erythrura*, *Apistogramma regani*, *Crenicichla* sp, *Satanoperca lilith* e *Mesonauta insignis*), três pertencem aos Cyprinodontiformes (*Rivulus kirovskyi*, *Rivulus micropus* e *Rivulus micropus compressus*) e uma está na ordem dos Synbranchiformes (*Synbranchus* sp).

Segundo Zuanon e colaboradores (2010), 71 espécies já são descritas no livro da reserva Ducke, assim, neste estudo foram identificados 31 destas espécies, distribuídas nas seis ordens principais, o que nos leva a considerar uma amostragem abrangente no que diz respeito a nossa área de coleta.

Figura 06: Amostragem dos peixes coletados na Reserva Florestal Adolpho Ducke (RFAD).

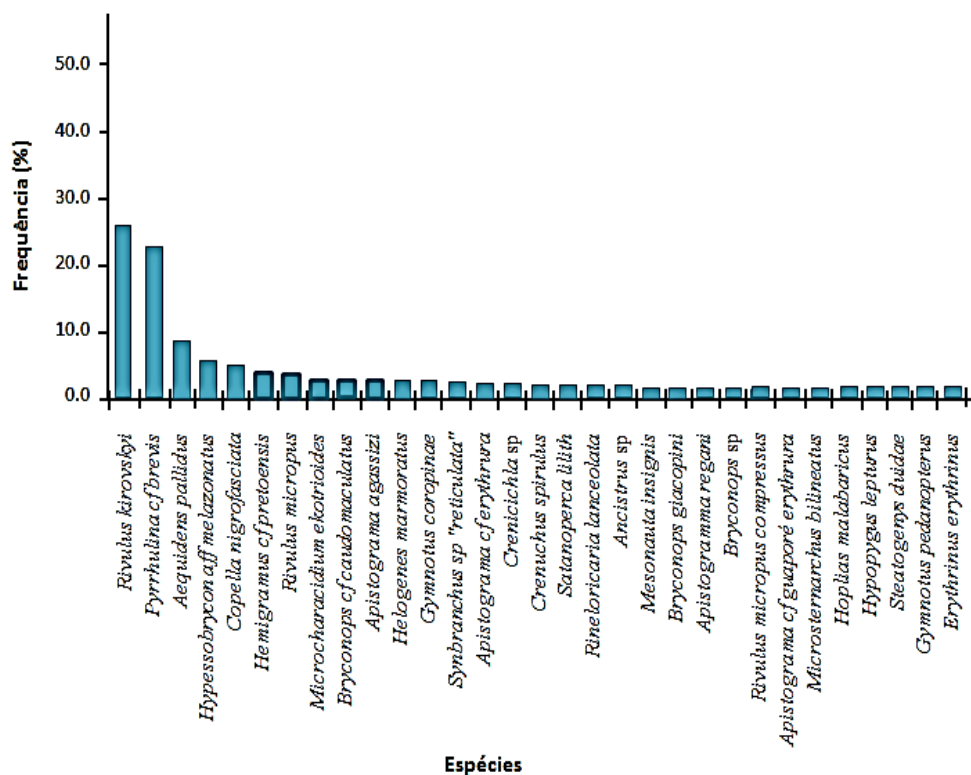


Fonte: Silva, A. S. 2013.

Levando em consideração todas as 378 amostras, a espécie *Rivulus kirovskyi* ocorreu em maior frequência, com 91 indivíduos coletados (25,2 %), seguido da espécie *Pyrrhulina cf brevis*, com 86 indivíduos (23,8 %), sendo essa a espécie mais amplamente distribuída nos pontos de coleta, e da espécie *Aequidens pallidus*, com 29 indivíduos coletados (8,0 %), como indicado na figura 07.

Esses dados podem ser constatados por Mendonça e colaboradores (2008), onde afirmam que os Characiformes formam o grupo mais rico, com quatro famílias e 10 espécies. Os Cyprinodontiformes (espécies de *Rivulus*) são as maiores em abundância nas poças (sendo também abundante em nossas coletas em igarapés), com 52% dos exemplares coletados em seu relato de trabalho. Mendonça et al., (2008) e Zuanon et al., (2010), também evidenciaram que a espécie *Pyrrhulina cf. Brevis* figura entre os peixes mais comuns e abundantes em pequenos igarapés de floresta, onde frequentemente compõem a maior parte da ictiofauna presente em áreas de nascentes/cabeceiras.

Figura 07: Frequência das espécies em todos os sete pontos de coleta nos igarapés da Reserva Florestal Adolpho Ducke (RFAD).



Fonte: Silva, S. A. 2014.

Em contraste, as espécies em menor ocorrência foram as *Hoplias malabaricus*, *Hypopygus lepturus*, *Steatogenys duidae*, *Gymnotus pedanopterus* e *Erythrinus erythrinus*, cada uma com apenas um indivíduo coletado (0,2%), como mostrado na figura 07.

Notou-se que os igarapés com maior número de indivíduos coletados e maior diversidade de espécies foram igualmente os igarapés de 1ª ordem da bacia do Ipiranga

com 112 amostras obtidas e 14 espécies diferentes, seguida dos igarapés de 3ª ordem da bacia do Tinga com 55 indivíduos coletados e 14 diferentes espécies. Esses dados podem ser legitimados por Mendonça et al., (2008), onde garantem que em média, ocorrem 15 espécies em cada riacho. Em contraste, os igarapés que resultaram no menor número de indivíduos obtidos e diversidade dos mesmos, foram os de 2ª ordem da bacia do Ipiranga com 21 amostras coletadas e 3 espécies diferentes.

Foi observado que a maior frequência e diversidade de espécies coletadas foram nos igarapés de 1ª (Tabela 01), havendo ampla distribuição da maioria das espécies obtidas, devido à estrutura dos mesmos, não possuindo muitos espaços para o refúgio, facilitando a amostragem. Não houve coleta em poças associadas devido ao difícil acesso e até mesmo a inexistências destas, uma vez que o período em que se realizaram as coletas estava mais seco.

Tabela 01

Distribuição dos morfotipos coletados por ordem de igarapé na Reserva Florestal Adolpho Ducke (RFAD).

ESPÉCIE	I G A R A P É S		
	1ª ORDEM	2ª ORDEM	3ª ORDEM
<i>Aequidens pallidus</i>	X	X	X
<i>Ancistrus</i> sp	X		X
<i>Apistograma agassizi</i>	X		
<i>Apistograma cf erythrura</i>	X		
<i>Apistograma cf guaporé erythrura</i>	X		X
<i>Apistogramma regani</i>			X
<i>Bryconops cf caudomaculatus</i>		X	X
<i>Bryconops giacopini</i>			X
<i>Bryconops</i> sp			X
<i>Copella nigrofasciata</i>	X		X
<i>Crenicichla</i> sp	X		
<i>Crenuchus spirulus</i>	X		
<i>Erythrinus erythrinus</i>	X		
<i>Gymnotus coropinae</i>	X	X	X
<i>Gymnotus pedanopterus</i>	X		
<i>Helogenes marmoratus</i>	X	X	X
<i>Hemigramus cf pretoensis</i>	X	X	X
<i>Hoplias malabaricus</i>			X
<i>Hypsobrycon aff melazonatus</i>	X	X	X
<i>Hypopygus lepturus</i>	X		
<i>Mesonauta insignis</i>			X
<i>Microcharacidium ekotrioides</i>	X	X	X

<i>Microsternarchus bilineatus</i>		X	X
<i>Pyrrhulina cf brevis</i>	X	X	X
<i>Rineloricaria lanceolata</i>	X		
<i>Rivulus micropus</i>	X	X	X
<i>Rivulus kirovskyi</i>	X	X	
<i>Rivulus micropus compressus</i>	X		X
<i>Satanoperca lilith</i>	X		
<i>Steatogenys duidae</i>		X	
<i>Synbranchus</i> sp “reticulata”	X	X	
TOTAL	23	13	19

Como discorrido por Corrêa et al., (2012), é importante ressaltar que a distribuição e constância de captura em diferentes habitats podem estar relacionadas com características hidrodinâmicas (vazão e corrente), aparato e horário de captura, características ambientais (vegetação aquática e disponibilidade de alimento), entre outros fatores.

5.2 ANÁLISES MOLECULARES

Dos 31 morfotipos identificados, onze espécies foram sequenciadas, identificadas molecularmente e submetidas à identificação molecular no sistema de dados de BARCODE – BOLD *system* e também ao NCBI, resultando nas seguintes identificações moleculares: *Aequidens* sp.; *Bryconops giacopinii*; *Crenicichla* sp.; *Crenuchus spirulus*; *Erythrinus erythrinus*; *Helogenes marmoratus*; *Hoplias malabaricus*; *Mesonauta* sp.; *Pyrrhulina brevis*; *Rineloricaria lanceolata* e *Satanoperca lilith*, todos os exemplares encontram-se identificados e estão em processo de tombamento na Coleção Ictiológica/INPA e Coleção de Tecidos de Genética Animal/UFAM.

Dessas onze espécies submetidas ao sistema de dados de BARCODE – BOLD *system*, quatro foram resgatadas, em relação à identificação morfológica (*Crenuchus spirulus*; *Erythrinus erythrinus*; *Helogenes marmoratus* e *Hoplias malabaricus*), três só chegaram ao nível de gênero (*Crenicichla* sp.; *Mesonauta* sp. e *Aequidens* sp.). Destes três gêneros, dois são candidatos a registros inéditos moleculares e já conhecidos e catalogados no livro da Reversa Ducke, porém inexistentes no BOLD (*Aequidens*

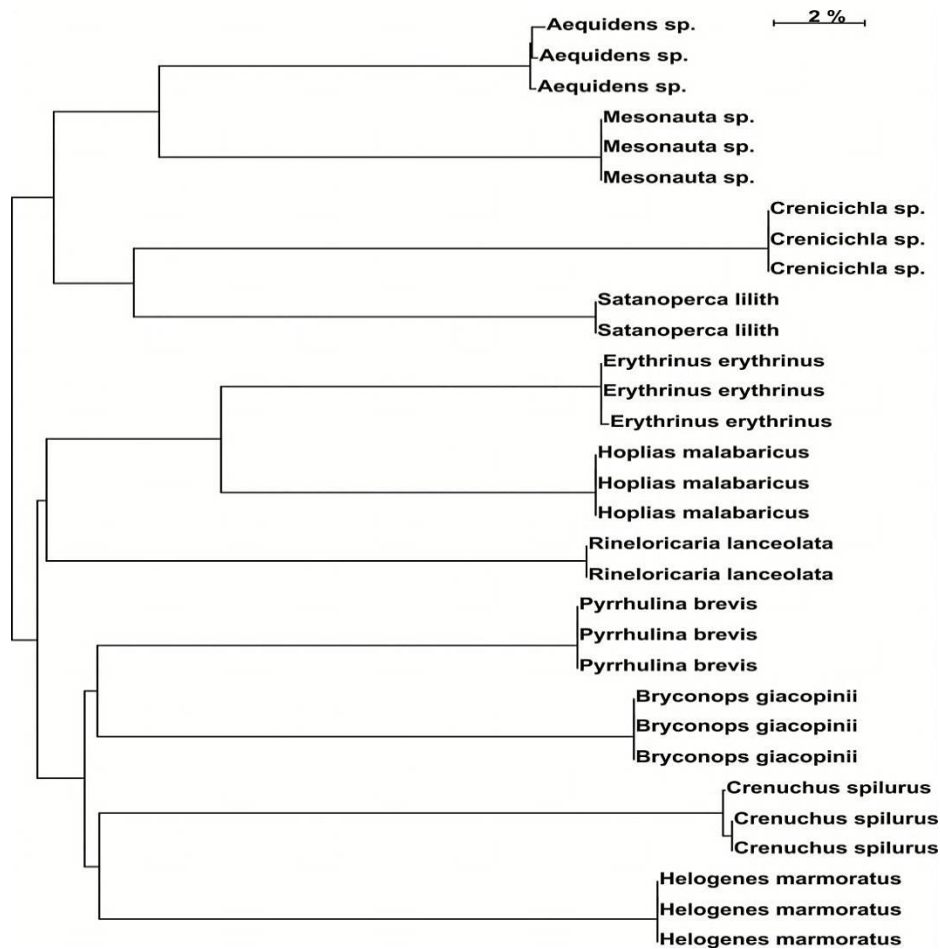
pallidus e *Mesonauta insignis*). O terceiro teve sua identificação morfológica equivocada sendo identificada primeiramente como *Aequidens* sp., que depois da identificação genético molecular, teve sua morfologia revista como *S. lilith* e coincidente com a molecular, sendo um caso clássico de identificação morfológica inadequada, em que *Barcode* foi uma ferramenta útil para sua resolução (HEBERT et al., 2003; COLLINS, 2012).

Ao todo cinco morfotipos irão compor como novos registros para o banco dados molecular: *Bryconops giacopini*; *Pyrrhulina cf. brevis*; *Aequidens pallidus*; *Mesonauta insignis* e *Rineloricaria lanceolata*.

Com as identificações alcançadas pelo *DNA Barcode* comparadas com as identificações tradicionais feitas a priori, foi possível validar tanto a identificação molecular quanto a morfológica de quatro espécies e, também, foram obtidos cinco possíveis acessos moleculares indisponíveis no sistema BOLD que são, portanto, sequências candidatas a serem depositadas neste banco *online*, além de inéditas no mesmo. Esses registros inéditos melhoram o banco de dados relacionados a faunas pouco exploradas, como os igarapés, uma vez que esse tipo de ferramenta é totalmente dependente dessas informações e da extensão e qualidade de seu banco de dados, sendo de extremo interesse esse acréscimo de informações, ajudando para outros acessos de trabalhos futuros, como observado por COLLINS em 2012 ao trabalhar com a ictiofauna comercializada em aquários.

Do alinhamento e edição de sequências também foi gerada uma árvore filogenética, onde monofilia de todas as espécies/morfotipos foram resgatadas, seguindo o critério de *Neighbour Joining* (NJ) e o modelo evolutivo de Kimura 2 Parâmetros (K2P), de acordo com a figura 08.

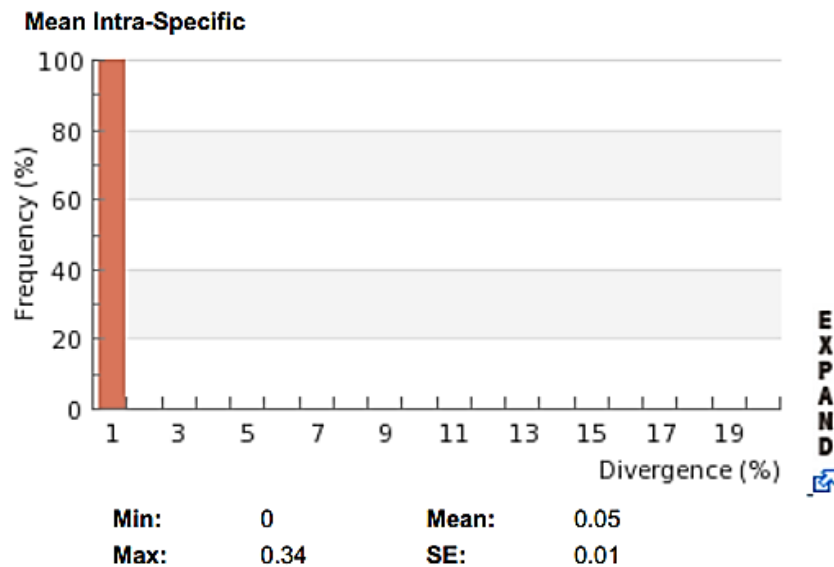
Figura 08: Árvore filogenética das onze espécies sequenciadas. A construção utilizou a metodologia de Agrupamento de Vizinhos seguindo o modelo de distância de Kimura-2-parâmetros.



Do banco de dados presente no BOLD, 6 foram congruentes com a maioria das identificações morfológicas feitas a priori, porém foi mais informativa na resolução de ambiguidades morfológicas, apresentando uma alta similaridade (>99%) entre os fragmentos submetidos à consulta e os disponíveis nos dados *online*, estando este valor de similaridade genética bem abaixo do *Barcode gap* convencional máximo de 2% de diferença genética específica (HEBERT et al., 2003), sendo a distância intraespecífica mínima e máxima estimada de 0,00% e 0,51% (SE = 0,01), respectivamente, com a média de 0,05% (SE=0,01), como mostrado na figura 09.

É esperada que distância intraespecífica seja baixa, mas a mesma é dependente do tamanho amostral, ou seja, quanto maior a amostragem, menor será essa distância.

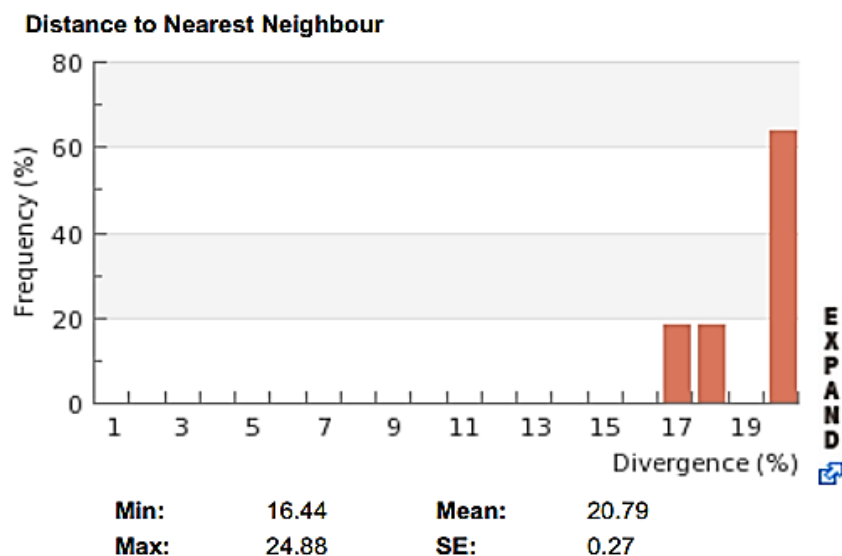
Figura 09: Distância genética intraespecífica obtida das 11 espécies identificadas, sequenciadas e submetidas ao BOLD *system* (note que 100% das espécies sequenciadas tiveram na distância máxima aproximada de 0,5%).



Fonte: http://www.boldsystems.org/index.php/MAS_Analysis_NearestNeighbour/process

Já como distância interespecífica, em relação à espécie geneticamente vizinha ou mais próxima, foi observado a mínima e a máxima de 16,44% (*Hoplias malabaricus* X *Erythrinus erythrinus*) e 24,88% (*Crenuchus spirilus* X *Pyrrhulina brevis*), com a média de 20,79% (SE = 0,27), como na figura 10.

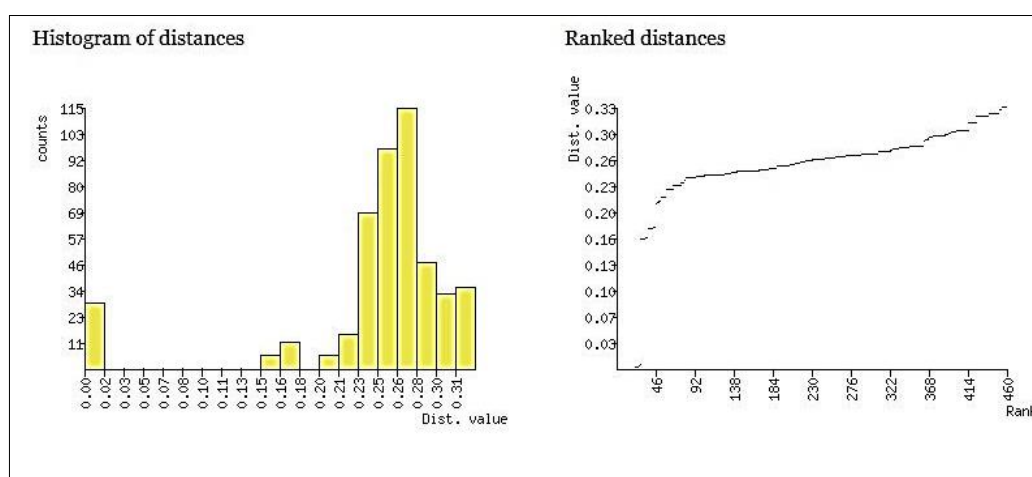
Figura 10: Distância genética interespecífica obtida das 11 espécies identificadas, sequenciadas e submetidas ao BOLD *system* (note que a distância entre espécies variou entre 16% e 20%).



Fonte: http://www.boldsystems.org/index.php/MAS_Analysis_NearestNeighbour/process

A grande diferença entre a distância intraespecífica e interespecífica observada confere uma grande amplitude no *Barcoding gap* (intervalo entre a distância intraespecífica e a interespecífica) e maior definição e segurança no limite de definição de variação genética estipulada de 2% (HEBERT et al., 2003), o que possibilita a determinação e garante a segurança para identificação molecular de espécies com o objetivo de inventariar a diversidade, como é o caso deste trabalho (Figura 11). Tal fato ocorreu devido a grande diversidade sistemática e taxonômica das espécies aqui trabalhadas, pois o mesmo fenômeno não será observado, quando trabalhamos com espécies sistematicamente mais próximas (ex. espécies congêneras de *Astronotus* sp. COLATRELI et al., 2012).

Figura 11: Comparação de variação genética intraespecífica e interespecífica obtida das 11 espécies identificadas, sequenciadas e submetidas ao BOLD system.



Fonte: <http://www.abi.snv.jussieu.fr/public/abgd/abgdweb.html>

As características gerais do fragmento de COI gerado apresentaram o total de 586 pb com a composição nucleotídica de: G=17,7%; C=23,04%; A=22,53%; T=29,86%. Do total deste fragmento sequenciado e editado, foram observadas 329 bp conservados e 257 bp variáveis, dentre estes 256 foram parcimoniosamente informativo. Todas as amostras tiveram seu DNA quantificado para as análises (quantificação do DNA em apêndice – A).

Embora o fragmento gerado não seja o tamanho padronizado pela técnica (648pb) (HEBERT et al., 2003), este se mostrou um comprimento adequado para este trabalho e boa qualidade de sequenciamento. Além disto, este fragmento possibilitou a

identificação molecular acima de 98% de similaridade em comparação com os dados *on line* e um intervalo de variação intra e interespecífica seguro para definição de grupos específicos.

Assim, todos os fragmentos gerados foram depositados no sistema BOLD *system*. Dessa forma, das 31 sequências geradas dessas 11 espécies (média de 03 sequências por espécie), já foram tombadas no portal de BARCODE *online*, denominado BOLD *system* sob os números de acessos seguintes: BINs: BOLD: ACM 7401, 7622, 7989, 7954, 7879, 7790 e 8276/AAJ 6034/ ACK 2785/ ACI 8540/ ARR 4012).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os dados observados neste trabalho puderam validar a maioria das informações feitas morfológicamente a priori, auxiliando na resolução de incongruências de identificação taxonômica morfológica e evidenciando novas espécies candidatas e inéditas no portal BOLD. Isso mostra que esta abordagem molecular mais moderna de identificação pode ser utilizada com segurança por não especialistas, no entanto, não descarta a importância de métodos mais tradicionais, tendo um caráter complementar. As espécies de peixes coletados na Reserva Florestal Adolpho Ducke, quando sequenciadas e analisadas apresentaram um padrão similar de diversidade genética intraespecífica, estando dentro do limite do *barcode gap*, o que, também, garante a monofilia observada. O marcador genético utilizado neste estudo, mesmo não tendo o tamanho padronizado pela técnica, apresentou um tamanho satisfatório, nos dando uma boa qualidade de sequenciamento, cobertura e resolução. Com isso, os dados gerados deste tipo de abordagem podem ser utilizados para outras aplicações e finalidades, sendo essa a proposta futura do projeto, se mostrando uma metodologia bem versátil. Portanto, conclui-se que o *DNA Barcode* é uma ferramenta muito útil na identificação rápida e mais independente de uma mão de obra especializada, provando sua eficácia em peixes para identificação taxonômica através de dados moleculares, contribuindo para elucidação da biodiversidade da ictiofauna de ambientes pouco explorados como os igarapés. Com isso, através dos avanços tecnológicos em poder de processamento e armazenamento computacional, capacidade de sequenciamento de genomas e a velocidade e disponibilidade de informações, novos frutos e descobertas surgirão a partir dessa metodologia.

REFERÊNCIAS

- ANGERMEIER, P. L.; KARR, J. R. **Fish communities along environmental gradients in a system of tropical streams**. In: Zaret, T.M. (Ed.). *Evolutionary Ecology of Neotropical Freshwater Fishes*. Dr. W. Junk Publishers, The Hague, Netherlands. p. 39-58. 1984.
- ANJOS, M. B. **Estrutura de comunidades de peixes de igarapés de terra firme na Amazônia Central: composição, distribuição e características tróficas**. Dissertação de Mestrado. INPA/UFAM – Manaus, 2005.
- ANJOS, M. B.; ZUANON, J. **Sampling effort and fish species richness in small terra-firme forest streams of central Amazonia, Brazil**. *Neotropical Ichthyology*, v. 5, p. 45-52, 2007.
- ANJOS, M. R. **Distribuição e Diversidade da Fauna de Peixes nas Sub - Bacias do Maici e Ipixuna Médio Madeira – AM/Brasil**. Núcleo de Ciências e Tecnologia, Programa de Mestrado em Desenvolvimento Regional e Meio Ambiente. Porto Velho/RO, 2009.
- BORISENKO, A. V. et al. **DNA barcoding in surveys of small mammal communities: a field study in Suriname**. *Molecular Ecology Resources*, v. 8, n. 3, p. 471-479, 2008.
- BUSSING, W.A.; LÓPEZ, M.I. **Distribución y aspectos ecológicos de los peces de las cuencas hidrográficas de Arenal, Bebedero y Tempisque, Costa Rica**. *Rev. Biol. Trop.*, 25: 13-37. 1977.
- CARVALHO, M. R. D. et al. **Taxonomic impediment or impediment to taxonomy? A commentary on systematics and the cybertaxonomic automation paradigm**. *Evolutionary Biology*, v. 31, n. 1, p. 140-143, 2007.
- COLATRELI, O. C. **Deep Phylogenetic Divergence and Lack of Taxonomic Concordance in Species of *Astronotus* (Cichlidae)**. *International Journal of Evolutionary Biology*. Article ID 915265, 8 pages. 2012.
- COLATRELI, O. C. **Novas abordagens de comunidades utilizando dados genéticos de peixes de igarapés da bacia do rio Negro**. Dissertação (Mestrado em Genética, Conservação e Biologia Evolutiva). Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA) e Universidade Federal do Amazonas (UFAM), Manaus, AM, Brasil, 2012.
- COLLINS, R. A. et al. **Barcoding and Border Biosecurity: Identifying Cyprinid Fishes in the Aquarium Trade**. *PLoS ONE* 7(1): e28381.

doi:10.1371/journal.pone.0028381, Dirk Steinke, Biodiversity Institute of Ontario - University of Guelph, Canada, 2012.

CORRÊA, J. M. et al. **Ictiofauna de igarapés de pequenas bacias de drenagem em área agrícola do Nordeste Paraense, Amazônia Oriental.** Instituto de Geociências, Universidade Federal do Pará, Belém. *Revista Ambiente & Água - An Interdisciplinary Journal of Applied Science*: v. 7, n.2, 2012.

CLARE, E. L. **DNA barcoding of Neotropical bats: species identification and discovery within Guyana.** *Molecular Ecology Notes*, v. 7, n.2, p. 184-190, 2007.

DAYRAT, B. **Towards integrative taxonomy.** *Biol. J. Linn. Soc.*, v. 85, p. 407-415, 2005.

DIAS, M. S.; MAGNUSSON, W. E.; ZUANON, J. **Effects of Reduced-Impact Logging on Fish Assemblages in Central Amazonia.** *Conservation Biology*, v. 24, p. 278-289, 2010.

DINIZ, M. F.; FERREIRA, L. M. **Bancos Genéticos de Plantas, Animais e Microrganismos.** *Biotechnology Ciência e Desenvolvimento*, v.13, 2000.

EBACH, M. C.; HOLDREGE, C. **More taxonomy, not DNA barcoding.** *Bioscience*, v. 55, n. 10, p. 822-823, 2005.

ELSASSER, S. C. et al. **Species identification of North American guinea worms (Nematoda: Dracunculus) with DNA barcoding.** *Molecular Ecology Resources*, v. 9, n. 3, p. 707-712, 2009.

FALABELLA, P. G. R. **A Pesca no Amazonas: Problemas e Soluções.** *Imprensa Oficial do Estado Amazonas*, Manaus. 1994.

FRANKHAM, R.; BALLOU, J. R.; BRISCOE, D. **Introduction to Conservation Genetics.** Cambridge, England: Cambridge University Press, 2002.

FRÉZAL, L.; LEBLOIS, R. **Four years of DNA barcoding: Current advances and prospects.** *Infection. Genetics and Evolution*, v. 8, p. 727-736, 2008.

HAJIBABAEI, M. **DNA barcodes distinguish species of tropical Lepidoptera.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 103, n. 4, p. 968-971, 2006.

HAJIBABAEI, M. SINGER, G.A.C., CLARE, E.L., HEBERT, P.D.N. **Design and applicability of DNA arrays and DNA barcodes in biodiversity monitoring.** *BMC Biol.*v. 5, e. 24, 2007.

HALL, T., BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp. Ser.* 41, p. 95-98. 1999.

HARDING, J. M.; BURKY, A. J.; WAY, C.M. **Habitat preferences of the rainbow darter, *Etheostoma coeruleum*, with regard to microhabitat velocity shelters.** *Copeia*, 1998: 988-997. 1998.

HEBERT, P. D. N.; CYWINSKA, A.; BALL, S.L.; DEWAARD, J.R. **Biological identifications through DNA barcodes**. *Proc. R. Soc. London B*. v. 270, p. 313-321, 2003.

HEBERT, P. D. N.; GREGORY, T. R. **The promise of DNA barcoding for taxonomy**. *Systematic Biology*, v. 54, p. 852-859, 2005.

HEBERT, P. D. N.; RATNASINGHAM, S.; DEWAARD, J. R. **Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species**. *Proceedings of the Royal Society of London, B (Supplement), Biology Letters*, v. 270, p. S96-S99, 2003.

HEBERT, P. D. N. **Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astraptes fulgerator***. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 101, v. 41, p. 14812-14817, 2004.

JUNK, W. J. **As águas da região amazônica**. In: Salati, E.; Shubart, H.O.R.; Junk, W.J.; Oliveira, A.E. (Eds.). *Amazônia: Desenvolvimento, integração e ecologia*. CNPq/Ed. Brasiliense, Brasília. 327p. 1983.

JUNK, W. J. **Wetlands of tropical South-America**. In: Whigham, D.F. (Ed.) *Wetlands of world*. Kluwer. Hague. p. 679-739. 1993.

KERR, K. C. R. et al. **Comprehensive DNA barcode coverage of North American birds**. *Molecular Ecology Notes*, v. 7, n. 4, p. 535-543, 2007.

KIMURA, M. **A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences**. *J. Mol. Evol.*, 16: 111-120. 1980.

LIPSCOMB, D.; PLATNICK, N.; WHEELER, Q. **The intellectual content of taxonomy: a comment on DNA taxonomy**. *Trends in Ecology and Evolution*, v. 18, p. 65-66, 2003.

LOWE-MCCONNEL, R. H. **Estudos ecológicos de comunidades de peixes tropicais**. Edusp, São Paulo. 535pp. 1999.

LUNDBERG, J. G.; KOTTELAT, M.; SMITH, G. R.; STIASSNY, M. L. J.; GILL, A. C. **So many fishes, so little time: An overview of recent ichthyological discovery in continental waters**. *Annals of the Missouri botanical garden*, v. 87, p. 26-62, 2000.

MARTIN-SMITH, K.M. **Relationships between fishes and habitat in rainforest streams in Sabah, Malaysia**. *J. Fish. Biol.*, 52: 458-482. 1998.

MENDONÇA, F. P.; MAGNUSSON, W. E.; ZUANON, J. **Relationships between habitat characteristics and fish assemblages in small streams of Central Amazonia**. *Copeia*, v. 4, p. 750-763, 2005.

MENEZES, N. A. **Systematics and evolution of the tribe Acestrorhynchini (Pisces, Characidae)**. *Arq. Zool.* 18 (1-2): 1-150. 1969.

MORITZ, C. **Defining 'Evolutionarily Significant Units' for conservation**. Trends in Ecology and Evolution, v. 9, p. 373-375, 1994.

N. Puillandre, A. Lambert, S. Brouillet, and G. Achaz, “**ABGD, Automatic Barcode Gap Discovery for primary species delimitation**”, Molecular Ecology, vol. 21. 2012.

OLIVEIRA et al. **Reserva Ducke: A biodiversidade amazônica através de uma grade**. In BACCARO, Fabrício et al. **A Reserva Ducke**. Áttema Design Editorial, Manaus, 2008.

OLIVEIRA et al. **Reserva Ducke: A biodiversidade amazônica através de uma grade**. In MENDONÇA, Fernando et al. **Peixes**. Áttema Design Editorial, Manaus, 2008.

PAZIN, V. F. V.; MAGNUSSON, W. E.; ZUANON, J.; MENDONÇA, F. **Fish assemblages in temporary ponds adjacent to 'terra-firme' streams in Central Amazonia**. Freshwater Biology, 51: 1025–1037. 2006.

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

REIS, R. E.; KULLANDER, S. O.; FERRARIS, C. J. **The check list of the freshwater fishes of South and Central America**. Porto Alegre: EDIPUCRS, 944 p. 2003.

RIBEIRO, B. H. **Estrutura e Evolução Cariotípica de Peixes Ciclídeos Sul Americanos**. Dissertação do Instituto de Biociências, Campus de Botucatu, UNESP. Botucatu – São Paulo, 2007.

RIBEIRO, O.; ZUANON, J. **Comparação da eficiência de dois métodos de coleta de peixes em igarapés de terra firme da Amazônia Central**. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia-INPA/CPBA. Manaus-AM, 2006.

SABINO, J. L.; ZUANON, J. **A stream fish assemblage in Central Amazônia: distribution, activity patterns and feeding behavior**. Ichthyological Exploration of Freshwaters, v. 8, p. 201–210, 1998.

SAITOU, N.; NEI, M. **The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees**. Mol. Biol. Evol. v. 4, p. 406-425, 1987.

SALATI, E., VOSE, P. B. **Amazon basin: A system in equilibrium**. Science, v.225, p.129-138, 1984.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: A laboratory manual**. Cold Spring Harbor, New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press, v. 2^a ed, 1989.

SANTOS, G. M.; FERREIRA, E. J. G. **Peixes da Bacia Amazônica**. In: Lowe-McConnell, R. H. (Eds). **Estudos ecológicos de comunidades de peixes tropicais**. Vol. EDUSP, São Paulo, São Paulo, Brasil. 1999.

SAVAGE, J. M. - **Systematics and the biodiversity crisis**. *BioScience*, 45: 673-679. 1995.

SCHAEFER, S. A. **Conflict and resolution: impact of new taxa on phylogenetic studies of the neotropical cascudinos (Siluroidei: Loricariidae)**. In: MALABARBA, L. R.; REIS, R. E., et al (Ed.). *Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes*. Porto Alegre, Brazil: Edipucrs, 1998.

SIOLI, H. **The Amazon and its main affluents: hydrography, morphology of the river courses and river types**. *Ecology of a Mighty Tropical River and its Basin*, p. 127-165. In: Sioli, H. *The Amazon. Limnology and Landscape*. Dr. W. Junk Publishers, Dordrecht, The Netherlands. 1984.

SILVA, J.M.C.; RYLANDS, A.B.; FONSECA, G.A.B. **The fate of Amazonian areas of endemism**. *Conservation Biology*, v.19, p.689-694, 2005.

SCHAEFER, S. A. **Conflict and resolution: impact of new taxa on phylogenetic studies of the neotropical cascudinos (Siluroidei: Loricariidae)**. In: MALABARBA, L. R.; REIS, R. E., et al (Ed.). *Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes*. Porto Alegre, Brazil: Edipucrs, 1998.

TAMURA, K.; PETERSON, D.; PETERSON, N.; STECHER, G.; NEI, M.; KUMAR, S. *Mega 5.04*. 2011. Disponível em: <http://www.megasoftware.net/>

TRANCOSO, Ralph. **Mudanças na cobertura da terra e alterações na resposta hidrológica de bacias hidrográficas na Amazônia**. 132 p. Dissertação (mestrado) - INPA, Manaus, 2006.

UMETSU, R. K. et al. **Análise morfométrica e socioambiental de uma bacia hidrográfica Amazônica, Carlinda, MT**. *Revista Árvore*, vol. 36, núm. 1, febrero, pp. 83-92. 2012.

VALENTINI, A.; POMPANON, F.; TABERLET, P. **DNA barcoding for ecologists**. *Trends in Ecology & Evolution*, v. 24, n. 2, p. 110-117, 2009.

WARD, R. D.; ZEMLAK, T. S.; INNES, B. H.; LAST, P. R.; HEBERT, P. D. N. **DNA barcoding Australia's fish species**. *Phil. Trans. R. Soc. B*, v. 360, p. 1847-1857, 2005.

WALKER, I. **Algumas considerações sobre um programa de zoneamento da Amazônia**. In: Val, L.; Figliuolo, R.; Feldberg, E. (Eds). *Bases Científicas para Estratégias de Preservação e Desenvolvimento da Amazônia*. Vol. 1. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus - AM, Brasil, 1991.

ZUANON, Jansen. **Guia de Peixes da Reserva Adolpho Ducke, Amazônia Central**. Áttema Design Editorial. Manaus, 2010.

APÊNDICE

APÊNDICE A – Quantificação das amostras provenientes da Reserva Florestal Adolpho Ducke/AM-BR.

Amostras	Concentração ng/ μ	A260/280	A260/230
OPC 17	77	1.974	1.100
OPC 18	152	1.974	1.109
OPC 19	85.5	1.94	0.57
OPC 53	54.0	1.89	0.39
OPC 54	68	1.94	0.32
OPC 470	66	1.65	0.58
OPC 471	56.5	1.91	1.31
OPC 70	268.5	1.85	0.81
OPC 131	23.0	1.83	0.73
OPC 133	109.0	1.92	1.65
OPC 134	129.0	1.88	1.27
OPC 135	74.0	1.89	1.08
OPC 214	23.0	1.81	1.04
OPC 215	48.5	1.79	0.69
OPC 216	26.5	1.87	1.17
OPC 217	34.0	1.83	1.21
OPC 218	79.5	1.87	1.12
OPC 222	44.0	1.87	1.31
OPC 223	84.5	1.87	1.15
OPC 224	9.3	1.67	0.33
OPC 225	20.0	1.86	0.74
OPC 235	80.5	1.87	0.70
OPC 326	4.0	1.81	0.56
OPC 359	175.5	1.87	1.36
OPC 456	46.5	1.97	1.50
OPC 472	59.5	2.01	1.29
OPC 469	160	1.97	1.86
OPC 301	226.5	1.90	1.92
OPC 424	51.5	1.94	1.35
OPC 290	229.5	1.99	1.64
OPC 283	119.0	1.96	1.78
OPC 266	68.0	1.91	1.47
OPC 265	86.5	1.88	1.54
OPC 69	260.0	1.89	1.09
OPC 118	137.5	1.93	1.34
OPC 114	63.0	2.17	3.80
OPC 132	90.0	1.91	1.00
OPC 360	65.5	1.95	1.08
OPC 264	30.0	1.85	1.11
OPC 22	308.5	1.94	1.78
OPC 362	81.0	1.92	1.39
OPC 363	42.5	1.97	1.32

OPC 361	95.0	1.93	1.25
DCK001	6.9	1.28	0.211
DCK002	6.4	1.641	0,233
DCK003	3.5	1.97	0.173
DCK004	12.3	1.447	0.188
DCK005	84.0	1.2	0.493
DCK006	88.5	1.670	0.507
DCK007	9.5	1.919	0.302
DCK008	10.3	1.898	0.325
DCK057	10.8	1.870	0.247
DCK058	6.1	2.017	0.189
DCK059	9.8	1.9	0.255
DCK060	5.0	1.818	0.227
DCK061	25.5	1.875	0.607
DCK062	9.8	1.912	0.336
DCK063	15.2	1.826	0.449
DCK064	90.5	1.631	0.554
DCK065	4.8	1.667	0.210
DCK066	8.8	1.944	0.350
DCK067	26.0	1.926	0.712
DCK068	9.1	2.068	0.243
DCK069	5.5	1.279	0.134
DCK070	6.0	1.818	0.197
DCK071	8.7	1.673	0.335
DCK183	3.4	2.030	0.146
DCK184	2.8	3.235	0.120
DCK185	11.0	1.849	0.338
DCK186	6.5	2.115	0.253
DCK187	14.10	2.007	0.426
DCK188	13.3	2.00	0.403
DCK189	76.0	1.60	0.472
DCK190	13.0	1.640	0.416
DCK191	94.0	1.741	0.299
DCK192	12.2	2.085	0.414
DCK193	4.9	2.3	0.192
DCK194	7.3	1.802	0.256
DCK157	3.4	2.267	0.166
DCK158	3.9	2.053	0.177
DCK159	11.4	1.500	0.400
DCK160	3.10	2.103	0.149
DCK161	6.20	1.736	0.347
DCK265	5.4	2.23	0.233
DCK266	4.4	3.82	0.23
DCK267	4.1	2.48	0.19
DCK268	7.0	2.39	0.30
DCK269	13.1	1.77	0.54
DCK270	23.5	1.73	0.825
DCK308	12.5	1.55	0.56
DCK309	11.2	1.82	0.46
DCK310	12.5	1.50	0.729

DCK311	18.0	1.682	0.632
DCK312	10.1	1.933	0.402
DCK313	6.0	2.164	0.264