

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

**Caracterização genética das espécies do gênero *Pyrrhulina*
(Characiformes: lebiasinidae) em igarapés e poças na reserva florestal
Adolpho Ducke – perspectivas da distribuição genética e dinâmica de
igarapés.**

Bolsista: Kácia Araújo do Carmo, FAPEAM

COARI
2014

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

RELATÓRIO FINAL

PIB-B/0124/2013

**Caracterização genética das espécies do gênero *Pyrrhulina*
(Characiformes: lebiasinidae) em igarapés e poças na reserva florestal
Adolpho Ducke – perspectivas da distribuição genética e dinâmica de
igarapés.**

Bolsista: Kácia Araújo do Carmo, FAPEAM

Orientador: Prof.^a Natasha Verdasca Meliciano

COARI

2014

Todos os direitos deste relatório são reservados à Universidade Federal do Amazonas, ao projeto **“Caracterização genética das espécies do gênero *Pyrrhulina* (Characiformes: lebiasinidae) em igarapés e poças na reserva florestal Adolpho Ducke – perspectivas da distribuição genética e dinâmica de igarapés”**, que é subprojeto do projeto/FAPEAM-021/2011 de título: **“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 aos seus autores. Parte deste relatório só poderá ser reproduzida para fins acadêmicos ou científicos.

Esta pesquisa, financiada pela Fundação de Amparo à Pesquisa – FAPEAM, através do Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica da Universidade Federal do Amazonas com o projeto de título: **“Caracterização genética das espécies do gênero *Pyrrhulina* (Characiformes: lebiasinidae) em igarapés e poças na reserva florestal Adolpho Ducke – perspectivas da distribuição genética e dinâmica de igarapés”** e projeto Universal/FAPEAM (021/2011) de título: **“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”**

RESUMO

No intuito de avaliar a distribuição da variabilidade genética existente nas populações das espécies de *Pyrrhulina* sp. (Characiformes: Lebiasinidae), grupo de organismos de pequeno porte e ampla distribuição entre ambientes relacionados aos igarapés, optou-se por utilizar marcadores tipo RAPD, pois são marcadores arbitrários, polimórficos, inespecíficos e abrangem todo o genoma sem a necessidade de equipamentos e tecnologias moleculares muito sofisticadas e conhecimento prévio de genoma alvo, podendo-se encontrar altos níveis de polimorfismos, possibilitando análises populacionais abrangentes de maneira rápida, simples, confiável e relativamente barata, quando comparados com outros métodos marcadores de DNA. A caracterização destas espécies se faz importante porque auxiliam nas pesquisas que pretendem acessar a variabilidade genética e estrutura populacional de organismos habitantes de ambientes tão pouco estudados sobre este aspecto, como os igarapés, servindo na elucidação da dinâmica e comportamento biológico de espécies associados às condições inerentes destes ambientes. Com o intuito de caracterizar a variabilidade genética dessas espécies foram realizadas coletas (com N=10-15) nos igarapés de 1º, 2º e 3º ordens das espécies de *Pyrrhulina* sp., através de instrumentos de coleta ativa e passiva na Reserva Adolpho Ducke/INPA-Manaus-AM e identificados morfologicamente. Posteriormente, houve a extração, purificação e quantificação dos DNA para análise laboratorial, que se deu pelo teste de otimização e seleção de *primers/loci* para realização do marcador RAPD. Uma vez obtido a padronização, os *loci* selecionados, seriam utilizados nas análises genético/populacionais. Foram coletadas 361 amostras, sendo 27 espécies diferentes, sendo 88 espécies de *Pyrrhulina brevis* apenas, não encontrando *Pyrrhulina laeta*, mesmo existindo relatos de sua ocorrência na região amostrada. Os indivíduos da espécie *Pyrrhulina brevis*, coletados ocorreu principalmente em igarapés de 1º ordem com 70 indivíduos. Dos três *primers* testados o único que apresentou características adequadas como marcador de RAPD foi o OPK04, porém este estava contaminado, em relação ao controle negativo. Em certos casos, para se trabalhar em análises genético/moleculares são necessários testes de padronização do marcador molecular selecionado, para a obtenção de uma ferramenta analítica confiável em relação aos resultados almejados.

Palavras-chave: Genética de populações; *Pyrrhulina* sp; Igarapés; RAPD.

ABSTRACT

In order to evaluate the distribution of genetic variability in populations of *Pyrrhulina* sp. species (Characiformes: Lebiasinidae), a group of organisms of small size and wide distribution across small streams and related environments, the RAPD marker was chosen because they are arbitrary, polymorphic and nonspecific markers, covering the entire genome without the need of sophisticated equipment and prior knowledge of the target genome, presenting high levels of polymorphisms, allowing a rapid, simple, reliable and inexpensive population analysis, compared to other methods of DNA markers. The characterization of these species is important because it may help further researches that intend to assess the genetic variability and population structure of organisms living in environments as small streams, which have just a few studies in this sense, serving to aid the elucidation of the dynamics and biological behavior of associated species to the conditions inherent to these environments. In order to characterize the genetic variability of these species, active and passive sampling were made (with N = 10-15) in streams of 1st, 2nd and 3rd orders of *Pyrrhulina* sp. in Adolpho Ducke Forest Reserve / INPA-Manaus-AM and, then, morphologically identified. Afterwards, there was the extraction, purification and quantification of DNA for laboratory analysis, which was given by optimization and selection of primers/loci to perform the RAPD marker. Once obtained the standardization, the selected loci would be used in populations genetics analysis. As result, 361 specimens were collected, from 27 species, being 88 specimens were exclusively *Pyrrhulina brevis*, not having any *Pyrrhulina laeta*, even though are reports of its occurrence in the surveyed area. Individuals of *Pyrrhulina brevis* were collected mainly in streams of 1st order, representing 70 individuals. Of the three tested primers, the only one that showed appropriate characteristics as RAPD marker was OPK04, however this was contaminated, revealed by the negative control. In some cases, the work with genetic/molecular analyzes, standardization tests of the selected molecular marker are required to obtain a reliable analytical tool in regard to desired outcomes.

Keywords: Populations Genetics; *Pyrrhulina* sp; Small stream; RAPD.

Sumário

| | |
|--|-----------|
| INTRODUÇÃO | 7 |
| 1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA..... | 9 |
| 1.1 ICTIOFAUNA DOS IGARAPÉS DA AMAZÔNIA..... | 9 |
| 1.2 MARCADOR MOLECULAR (RAPD) | 11 |
| 2. JUSTIFICATIVA | 13 |
| 3. OBJETIVOS | 14 |
| 3.1 GERAL | |
| 3.2 ESPECÍFICOS | 14 |
| 4. METODOLOGIA..... | 15 |
| 4.1 ORGANISMO MODELO | 15 |
| 4.2 ÁREA DE ESTUDO | 15 |
| 4.3 MÉTODO DA COLETA..... | 16 |
| 4.4 METODOLOGIA LABORATORIAL..... | 18 |
| 4.5 ANÁLISES POPULACIONAIS..... | 19 |
| 5. RESULTADOS E DISCUSSÕES | 20 |
| 5.1 AMOSTRAGEM | 20 |
| 5.2 DIAGNÓSTICO MOLECULAR | 22 |
| CONCLUSÃO..... | 25 |
| REFERÊNCIAS | 27 |

INTRODUÇÃO

Os pequenos cursos d'água amazônicos, chamados de igarapés, são pequenos corpos nascentes de água que drenam as áreas de floresta. A junção de numerosos igarapés é a principal responsável pela formação dos grandes rios amazônicos e configuram a maior e mais densa rede hídrica do mundo (JUNK, 1983; WALKER, 1991).

De maneira geral, os igarapés podem ser classificados com base na estrutura e contribuição de cursos d'água, de maneira que a união de dois igarapés de 1ª ordem, isto é, que não tem contribuição de qualquer outra drenagem, sendo nascentes, forma um igarapé de 2ª ordem e a união de dois igarapés de 2ª ordem resulta em igarapés de 3ª ordem e assim sucessivamente (PETTS, 1994).

Suas águas ácidas são consequência da decomposição de folhas no solo das florestas, que resultam na produção de ácidos húmico e fúlvico que são transportados aos cursos d'água por chuvas locais (JUNK & FURCH, 1985; WALKER, 1991; MENDONÇA et al., 2007).

Além de ácidas, a água dos igarapés de terra-firme geralmente são bem oxigenadas, com baixa condutividade e temperatura relativamente estável, não apresentando variações significativas de profundidade, largura, velocidade e vazão ao longo do ano (ESPÍRITO-SANTO et al., 2009) e apesar de considerados ambientes relativamente pobres em diversidade biológica, estima-se que em um único igarapé possam ocorrer de 20 a 50 espécies de peixes, principalmente de pequeno porte (LOWE-MCCONNELL, 1999; SABINO, 1999).

A riqueza, abundância, diversidade e aumento de espécies de peixes, observadas nestes locais, estão muito relacionadas às características ambientais que compõem cada igarapé (ZUANON, 2010). Já as características físico-químicas dos igarapés estão intimamente relacionadas ao meio que os circundam e isso acaba estruturando a comunidade e populações de organismos habitantes (BUSSING & LÓPEZ, 1977; ANGERMEIER & KARR, 1984).

Ao longo das ordens, que compõe cada igarapé, as características de produtividade ambiental que circundam as diferentes ordens influenciam a riqueza e distribuição de espécies (VANNOTE et al., 1980). E isso não somente pode influenciar

a distribuição de diversidade de espécies como, também, estruturar a distribuição de uma espécie.

Nas regiões próximas das cabeceiras (como nos igarapés de 1ª ordem), o dossel alto das árvores impede a entrada de raios solares e dificulta a produção primária, região onde os cursos d'água ainda são relativamente lentos e de pequeno porte (SANTOS & FERREIRA, 1999; DIAS et al., 2010). Nestes locais, a base das cadeias alimentares é composta principalmente por elementos florestais, como pólenes, flores, frutas, folhas e artrópodes (WALKER, 1991; SANTOS & FERREIRA, 1999). Com a contribuição de outros riachos (o que caracteriza igarapés de 2ª e 3ª ordens) e consequente aumento do volume de água, distância entre as margens, o que acarreta na abertura no dossel, há um aumento na produção primária, possibilitando a criação e ocupação de diferentes nichos (VANNOTE et al., 1980).

Apesar dos igarapés não possuírem ciclos de cheia e vazante como os grandes rios amazônicos, há um aumento considerável em seus níveis de água, em decorrência da alta precipitação durante a estação chuvosa, ocorrendo inundações nas depressões adjacentes e consequente formação de um sistema de poças e lagos laterais complexo, que, dependendo dos níveis de pluviosidade, podem ser sustentados por dias ou meses, podendo-se subsidiar uma diversa coleção de espécies de peixes que buscam alimento, abrigo e local de procriação (PAZIN et al., 2006).

Uma das principais causas da ictiofauna em pequenos riachos, além da alimentação generalista, é que estes estão distribuídos em áreas submetidas a diferentes condições geológicas, hidrológicas e ambientais, criando uma grande variedade de microhabitats (JACKSON, PERES-NETO & OLDEN, 2001; MEYER et al., 2007).

Desta forma verifica-se que os igarapés são vitais para o ciclo reprodutivo e manutenção das espécies, pois disponibilizam uma variabilidade de habitats e nichos potenciais que servem como fonte energética primária ou de base, berçário e refúgio durante as épocas de cheia e vazante, funcionando, também, como o principal sistema de manutenção biológica, drenagem e irrigação dos grandes rios, auxiliando na qualidade dos estoques pesqueiros, cuja comunidade ribeirinha e comerciantes regionais são dependentes para a sobrevivência e trabalho.

Sendo assim, comprometendo este tipo de ecossistema, resultará em problemas para a fauna e a estrutura dos maiores rios, o que influenciará a comunidade e o mercado pesqueiro. Além disso, muitas espécies de peixes são restritas à esses habitats o

que configura uma estruturação de comunidade ecológica única e diferenciada de outros cursos de água, fazendo com que estas comunidades possam, também, ser utilizadas como bioindicadoras de filtro ambiental.

Contudo, por serem pequenos e numerosos estes ambientes ainda são negligenciados e continuam tendo sua dinâmica pouco conhecida, tendo os dados de origem genética quase que inexistentes (COLATRELI, 2012), como, por exemplo, em relação ao perfil e distribuição de variabilidade genética entre os indivíduos de uma espécie presente em diferentes ambientes como as poças e cursos de rios e igarapés, o que permite avaliar a estrutura populacional, a capacidade de locomoção e transposição de supostas barreiras biológicas de espécies de peixe com pequeno porte, que é o biótipo da maioria das espécies de peixes de igarapés e que facilmente podem ser influenciadas pela estrutura a composição ambiental.

Desta forma, pretendeu-se através de marcadores moleculares de RAPD analisar e comparar a variabilidade genética e estrutura populacional das espécies de peixes de distribuição ampla do gênero de *Pyrrhulina* sp entre os ambientes de igarapés localizados na Reserva Florestal Adolpho Ducke/Manaus/AM, utilizando como modelo na elucidação sobre hábitos e capacidades biológicas dessa espécie de igarapés, uma vez que este gênero apresenta pequeno porte e ampla distribuição entre habitats distintos.

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 ICTIOFAUNA DOS IGARAPÉS DA AMAZÔNIA

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).

Além de seus grandes rios e lagos, a bacia amazônica é constituída por incontáveis canais de água e, com exceção de alguns rios que tem sua nascente na cadeia andina, quase todos os rios da bacia amazônica são resultantes da junção de um complexo sistema de rios e pequenos cursos d'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 E FERREIRA, 1999).

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. Possuem águas cristalinas, ácidas e com temperatura baixa e pouco variável ao longo do ano (GOULDING et al., 1988).

Os igarapés possuem como uma das características físicas a subida do nível da água devido as fortes chuvas em suas bacias de drenagem. Desta forma, o nível da água alcança ou até mesmo ultrapassa os limites das margens, disponibilizando a sua fauna novos recursos alimentares, favorecendo populações de peixes em grande escala.

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 dependente 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). Entretanto, pequenos peixes são frequentemente abundantes, podendo ser encontradas de vinte a cinquenta espécies em um único riacho (LOWE-MCCONNELL, 1999; SABINO, 1999).

As características físicas e químicas dos igarapés estão relacionadas com a ictiofauna presente nestes, seja por parte de fatores internos ou externos aos igarapés. Como afirma Jackson et al (2001) “as características físico-químicas dos riachos exercem influência sobre a ictiofauna”.

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). Estima-se que cerca de 2.000 novas espécies de peixes dulcícolas sul-americanos estão por ser descritas, sendo a grande maioria externa às áreas da calha principal de grandes rios e lagos, em ambientes como os igarapés (CASTRO, 1999). Ainda estudos realizados em igarapés têm mostrado que há uma alta riqueza de pequenos peixes ocupando esses ambientes, podendo estar relacionado com a heterogeneidade de microhabitats decorrente da maior interface com ambientes terrestres (Castro & Casatti 1997; Uieda *et al.* 1997; Sabino & Zuanon 1998).

Todas estas observações indicam que a biodiversidade da ictiofauna amazônica ainda está pouco compreendida e significativamente subestimada. Isso é marcante nas áreas de igarapés. 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 MARCADOR MOLECULAR (RAPD)

Muitos estudos vêm comprovando a importância da variabilidade genética na elucidação dos mecanismos evolutivos, de estrutura populacional e no manejo e conservação de espécies. Como consequência, marcadores moleculares têm sido empregados de forma bastante eficiente na avaliação da variabilidade genética de vários organismos (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998; SOLÉ-CAVA, 2001). Devido à sua grande aplicabilidade, desenvolveram-se dezenas de estratégias de marcação molecular, inclusive no estudo de organismos aquáticos, permitindo um maior delineamento das pesquisas desenvolvidas com tipo de grupo (MEYER, 1993).

A utilização de marcadores moleculares em peixes vem sendo realizada com os mais variados propósitos que passam desde a determinação da variabilidade genética entre e dentro populações, manejo, conservação de estoques pesqueiros (NORMAN et al., 1994) e, até, no estudo das relações filogenéticas, que antes eram estritamente desenvolvidas com base em caracteres de natureza morfológica (FARIAS et al., 1998; 1999; 2001).

Atualmente em estudo genético populacional, marcadores de microssatélites têm sido amplamente utilizados por apresentarem resultados confiáveis, permitindo estimativas precisas quanto ao nível de parentesco entre indivíduos e identificação de estruturas populacionais. No entanto, esse marcador molecular, baseado na PCR, exige iniciadores (*primers*) específicos para o estudo de uma dada espécie, sendo necessário do conhecimento genômico prévio do organismo alvo, tornando o procedimento de desenvolvimento de *primers* de *loci* de microssatélite laborioso e dispendioso financeiramente, quando não se tem um *loco* previamente caracterizado e disponível (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998).

Uma boa alternativa de marcação genético molecular para estudos populacionais, onde não se tem informação genômica a priori, é o RAPD (*Random Amplification of Polymorphic DNA* – Amplificação Randômica de DNA polimórfico), uma vez que os *primers* de RAPD são generalistas e arbitrários, o que não demanda o conhecimento prévio do conjunto genômico, fazendo que estes iniciadores arbitrários se anelem aleatoriamente em diversas regiões do genoma em questão e gerando fragmentos de DNA de diferentes tamanhos e pesos moleculares, garantindo polimorfismo, podendo ser visualizado em um perfil eletroforético, sendo um método mais rápido e barato. Indivíduos com divergências em seus genomas produzem fragmentos de tamanho e peso molecular diferentes, podendo ser comparados e posteriormente calculados os níveis de relacionamento genético entre os indivíduos, de maneira similar ao que é feito com os marcadores microsatélites.

O RAPD (Polimorfismos de DNA amplificados ao Acaso) é um marcador molecular amplamente utilizado em análise populacional porque possui algumas vantagens como: fácil aplicação, baixo custo, produção resultados de maneira rápida, requer poucas quantidades de DNA molde, dispensa qualquer conhecimento prévio sobre o genoma do organismo de estudo, polimorfismo, além de facilitar o acesso de muitos loci gênicos (FERREIRA & GRATAPAGLIA, 1998).

O princípio da técnica é muito simples: o *primer* (arbitrários de sequências curtas) se ligam às sequências complementares em fitas opostas do DNA alvo e ocorre a amplificação *in vitro* do segmento de DNA entre dois *primers* adjacentes com o auxílio da enzima *Taq* polimerase (DNA polimerase). Os sítios de ligação dos *primers* devem estar separados por no máximo 3 a 4 mil pares de bases, uma vez que a DNA polimerase não é capaz de percorrer segmentos maiores nas condições normalmente usadas durante a amplificação (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1995; FRITSCH & RIESEBERG, 1996).

Por utilizar *primers* de sequência arbitrária, pequenos e de fácil amplificação, a técnica de RAPD permite a realização de análises genéticas diretamente ao nível de DNA sem a necessidade de nenhum conhecimento prévio sobre a genética da espécie a ser estudada (NASON et al., 1997).

2. JUSTIFICATIVA

Considerando: (1) o pequeno porte corpóreo, associado ictiofauna de igarapé, o que pressupõem capacidade de migração limitada, que pode resultar em estrutura populacional; (2) a falta de estudos genético populacionais em espécies representantes dos igarapés; (3) ampla aplicabilidade de marcadores moleculares para estudos genéticos populacionais, com destaque o RAPD; (4) a variação de nichos e estruturas que compõem os igarapés, que podem alterar a estrutura e o comportamento populacional das espécies; (5) a ampla distribuição entre habitats distintos e relacionados aos igarapés das espécies do gênero *Pyrrhulina*, presente tanto nos igarapés quanto em poças, esta última utilizada como berçários por várias espécies, o presente projeto propôs um estudo genético populacional das espécies deste gênero nos igarapés da reserva Adolpho Ducke/Manaus/AM/PPBio-INPA, utilizando este grupo de peixe como modelo representativo para os possíveis processos de distribuição e estruturação populacional das espécies da ictiofauna de igarapés e ambiente associados, por meio do marcador molecular de RAPD, fazendo parte de um projeto maior financiado pela FAPEAM intitulado “Levantamento genético de peixes de igarapé da reserva experimental Adolpho Ducke (Manaus/AM), por meio do *DNA Barcoding*” (021/2011).

Este estudo trás sua importância nas análises genéticas, no qual representam informações importantes para a compreensão, manejo e manutenção da biodiversidade tanto em Coari- AM, quanto em outros lugares com estruturas ambientais de igarapés similares e de espécies compartilhadas, possibilitando desdobramentos futuros de estudos voltados às espécies, comunidades e diversidade de peixes compartilhados entre ambientes, como, por exemplo, os riachos que margeiam a região da cidade de Coari/AM, que assim como a Reserva Adolfo Ducke da cidade de Manaus possui, uma unidade experimental e em implementação do PPBio, representado pela área CapMedSol – ISB/UFAM.

3. OBJETIVOS

3.1 GERAL

Realizar estudos referentes à variabilidade e à estrutura genética de populações das espécies de peixe do gênero *Pyrrhulina* sp, dos diferentes ambientes associados aos igarapés da Reserva Experimental Adolpho/Ducke/Manaus, AM, por meio do marcador molecular polimórfico de RAPD, visando comparar os padrões de distribuição genético populacional entre os diferentes locais e ambientes amostrados dentro de cada espécie, utilizando este grupo como modelo para estudar os padrões de estruturação genética populacional da ictiofauna de igarapés e ambientes relacionados.

3.2 ESPECÍFICOS

- Amostrar, por meio de coletas, as espécies (*Pyrrhulina* sp.) representantes do gênero e existentes nos igarapés da Reserva Adolpho Ducke;
- Identificar morfológicamente os indivíduos coletados, com auxílio de chaves de identificação, para confirmação das espécies de *Pyrrhulina* sp;
- Testar marcadores distintos (*primers*) para uma melhor análise molecular através de RAPD.
- Obter os dados moleculares do marcador de RAPD, no Laboratório de Biologia Molecular - UFAM/Coari dos indivíduos já coletados e identificados de *Pyrrhulina* sp.
- Avaliar a relação genética de indivíduos da espécie *Pyrrhulina* sp em diferentes poças e ao igarapé adjacente a elas;
- Avaliar a relação genética de indivíduos da espécie *Pyrrhulina* sp encontradas ao longo de diferentes ordens e de um mesmo curso d'água e entre ambientes de amostragem distintos;
- Confeccionar relatório.

4. METODOLOGIA

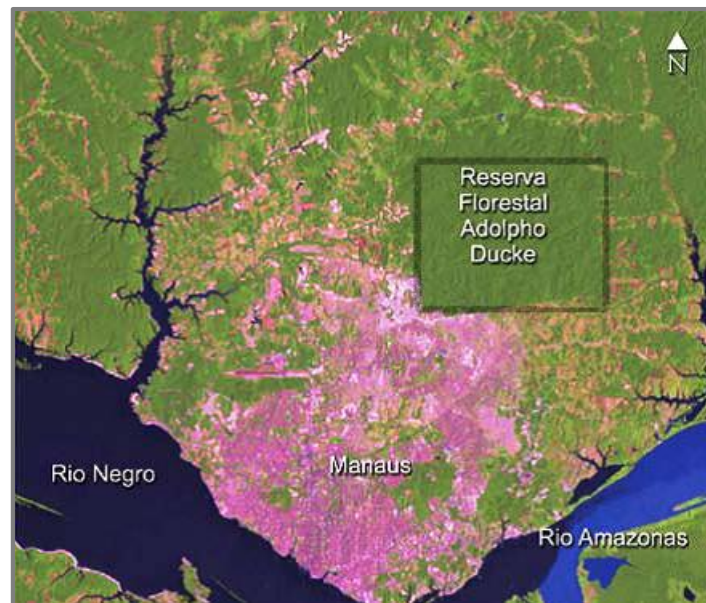
4.1 ORGANISMO MODELO

O gênero *Pyrrhulina* (Characiformes: Lebiasinidae) é representado na Reserva Adolpho Ducke por duas espécies: *Pyrrhulina brevis* e *Pyrrhulina laeta*, sendo *P. brevis* a segunda espécie mais abundante em estudos de variações sazonal, sendo encontrada tanto em poças quanto nos cursos d'água (ESPIRITO-SANTO, 2009). A espécie de *Pyrrhulina*, possui pequeno porte corpóreo (comprimento máximo = 7,0 cm), e dieta relativamente generalista, sendo frequentemente encontrados em remansos e nas proximidades das margens, onde há uma redução considerável da correnteza e ocorre o acúmulo de folhiço e gravetos no substrato, ocupando quase que exclusivamente a lâmina superficial da água utilizando o oxigênio aí presente e utilizando alimentos tanto de origem autóctone quanto alóctone (CARDOSO, 2005).

4.2 ÁREA DE ESTUDO

O estudo foi realizado na reserva Adolpho Ducke (Figura 1), pertencente ao INPA (Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia), que se localiza a noroeste da cidade de Manaus-AM, estando situada na região central da Amazônia em uma área platô, compreendendo um sistema de cinco sub-bacias de igarapés, que distribuem entre as regiões Leste e Oeste em relação ao platô central. Um sistema de trilhas foi instalado na Reserva Ducke, formando uma malha de 64 km² que cobre toda a reserva, exceto uma borda externa de 1 km de largura. Este sistema de trilhas dá acesso a 38 pontos permanentes de amostragem em igarapés e poças associadas, para amostragem de organismos aquáticos. Quase todos os igarapés da Reserva Ducke nascem dentro da área protegida, sendo que alguns correm em direção ao rio Amazonas e outros em direção ao rio Negro (ZUANON, 2010).

Figura 1: Área da reserva Adolpho Ducke



Fonte: Livro Reserva Ducke, 2008.

As principais microbacias de igarapés da reserva são denominadas: Barro Branco, Acará e Bolívia (compondo a porção Oeste) Tinga, Uberê e Ipiranga, na área Leste (MENDONÇA, 2002). Sendo esses riachos alvos das coletas realizadas na Reserva Florestal Adolpho Ducke entre o mês de Outubro de 2013 (nos períodos de 12/10 a 14/10 e 19/10 a 21/10 de 2013).

4.3 MÉTODO DA COLETA

As coletas das amostras foram desenvolvidas, seguindo a metodologia proposta por Mendonça e Zuanon (2007), com algumas modificações.

As extremidades de um transecto de 50 metros dos igarapés foram bloqueadas com redes de malha fina para coleta de indivíduos das espécies de *Pyrrhulina*. Para isso, se utilizou instrumentos (Figura 2) de coleta passiva e ativa como armadilhas, puçás, peneiras e rede de arrasto para a captura de indivíduos nos igarapés de primeira, segunda e terceira ordens e poças associadas, buscando o N amostral médio de 10 à 15 indivíduos, por ponto, que também foram georeferenciados.

Figura 2: Instrumentos utilizados nas coletas. (A) Rede de malha fina; (B) Peneira; (C) Puçá.



Fonte: Carmo, 2013.

Após a coleta das amostras, estas foram colocados em sacos plásticos com álcool 90% e identificados por sua respectiva localidade. Posteriormente foram retiradas fotografias das amostras com etiquetas de acordo com sua localidade coletadas e retirou-se uma mostra de tecido muscular da região dorsal de cada um, tentando conservar ao máximo as características externas de cada indivíduo, sendo estes tecidos armazenados individualmente em microtubos de 1,5 mL contendo álcool 95% e os indivíduos de menor porte que não possibilitaram a retirada de tecido, foram armazenados diretamente em microtubos de 2 mL e postos em freezer – 10 a - 80°C.

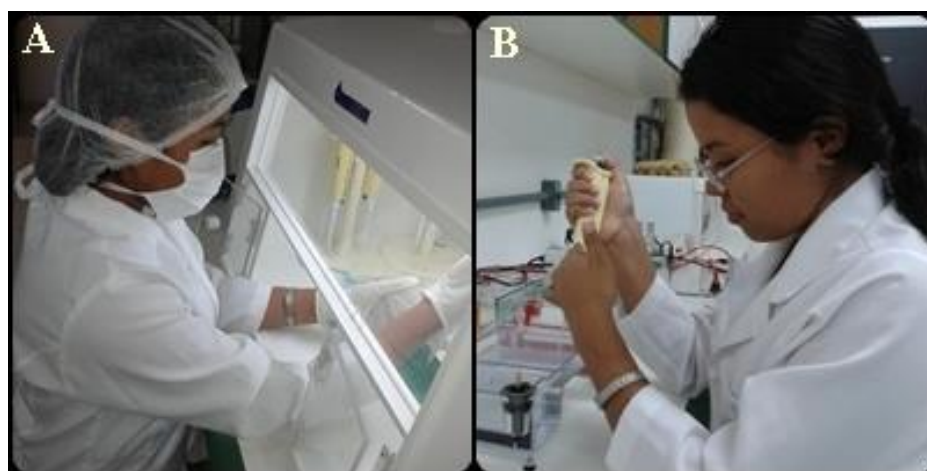
A identificação taxonômica das amostras coletadas foi realizada com uso de chaves dicotômicas, com especialistas da área, sendo comparados com exemplares depositados em museus e coleções científicas.

4.4 METODOLOGIA LABORATORIAL

As atividades laboratoriais foram realizadas no Laboratório de Genética Molecular – ISB/Coari/AM. Sendo que o procedimento para obtenção do DNA total dos tecidos acondicionados em álcool 90% foi feita seguindo o protocolo de extração por Fenol-Clorofórmio conforme estabelecido por Sambrook e colaboradores (1989), com modificações, no qual as amostras de tecido passaram 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 isolado e purificado, sendo estes quantificados posteriormente.

Após a extração do material genético, realizou-se a reação de PCR (*Polymerase Chain Reaction* – Reação em Cadeia da Polimerase). Num primeiro momento foram feitos testes de amplificação para marcadores de *locos* de RAPD utilizados *kits* de *primers* distintos, visando à reprodutibilidade, qualidade e polimorfismo. Após a escolha de *primers* e a execução da PCR, os produtos da amplificação da mesma foram aplicados em agarose 1% misturados a um intercalante de DNA e corante para visualização da corrida eletroforética (*Gel Red* - *Biotum* e azul de bromofenol, respectivamente) (Figura 3). Em cada corrida de eletroforese, foi utilizado um marcador de peso molecular de 100 pares de base (pb) como parâmetro para avaliar polimorfismos entre os indivíduos de perfis eletroforéticos diferentes.

Figura 3: Procedimentos laboratoriais. (A) Teste de PCR; (B) Eletroforese para analisar se a PCR funcionou.



Fonte: Carmo, 2013.

4.5 ANÁLISES POPULACIONAIS

Os resultados obtidos do RAPD estavam previstos para serem analisados através da comparação do perfil eletroforético obtido do DNA amplificado das amostras coletadas entre cada ponto e dentro de cada espécie, com cada *primer* escolhido através dos testes. Os dados iriam ser introduzidos nos programas computacionais na forma de variáveis binárias, sendo o número 1 correspondente à presença de banda e o número 0 a ausência de banda no gel. Apenas iriam ser contadas e incluídas nas análises as bandas que pudessem ser visualizadas com certeza. Para a contagem, somente serão considerados locos polimórficos cujos alelos mais raros têm frequência igual ou superior a 5% (ALMEIDA; SODRÉ; CONTEL, 2003).

A variabilidade genética seria estimada com base na proporção de locos polimórficos (\bar{P}) usando-se o critério de 95% de presença na população, empregando o programa computacional TFPGA 1.3 (MILLER, 1997). Além da variabilidade genética o programa TFPGA 1.3 (MILLER, 1997) iria realizar o teste exato de Fisher, aplicado para o cálculo de diferenças significativas das frequências dos marcadores nas diferentes populações. Seria também calculado, pelo TFPGA 1.3 (MILLER, 1997), a identidade e distância genética de NEI (NEI, 1978) e ainda, a estimativa da divergência da frequência gênica entre as populações, calculada pelo teste *theta*, que é uma estimativa de F_{ST} , utilizando 1000 interações para gerar o intervalo de confiança (estimativa de Jackknife).

A significância de theta (θ) seria medida por meio de um teste de qui-quadrado representado pela fórmula $\chi^2 = 2.N. \theta.(\kappa-1)$, com $(\kappa-1).(s-1)$ graus de liberdade, onde N é o total de indivíduos amostrados, κ é o número de alelos e s é o número de subpopulações analisadas para o loco gênico (SOLÉ-CAVA, 2001).

A análise da similaridade genética entre os indivíduos das áreas seria desenvolvida por meio do programa computacional NTSYS-PC (ROHLF, 1992), empregando-se o coeficiente de Jaccard (J) e método de agrupamento UPGMA (*Unweighted Pair-Group Method with Arithmetical Average*) que permite a construção do dendrograma de similaridade genética. O cálculo do número de migrantes por

geração (Nm), que representa o fluxo gênico entre as populações, seria estimado a partir do valor de theta por meio da fórmula $Nm = (1 - \theta)/(4 \theta)$.

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 AMOSTRAGEM

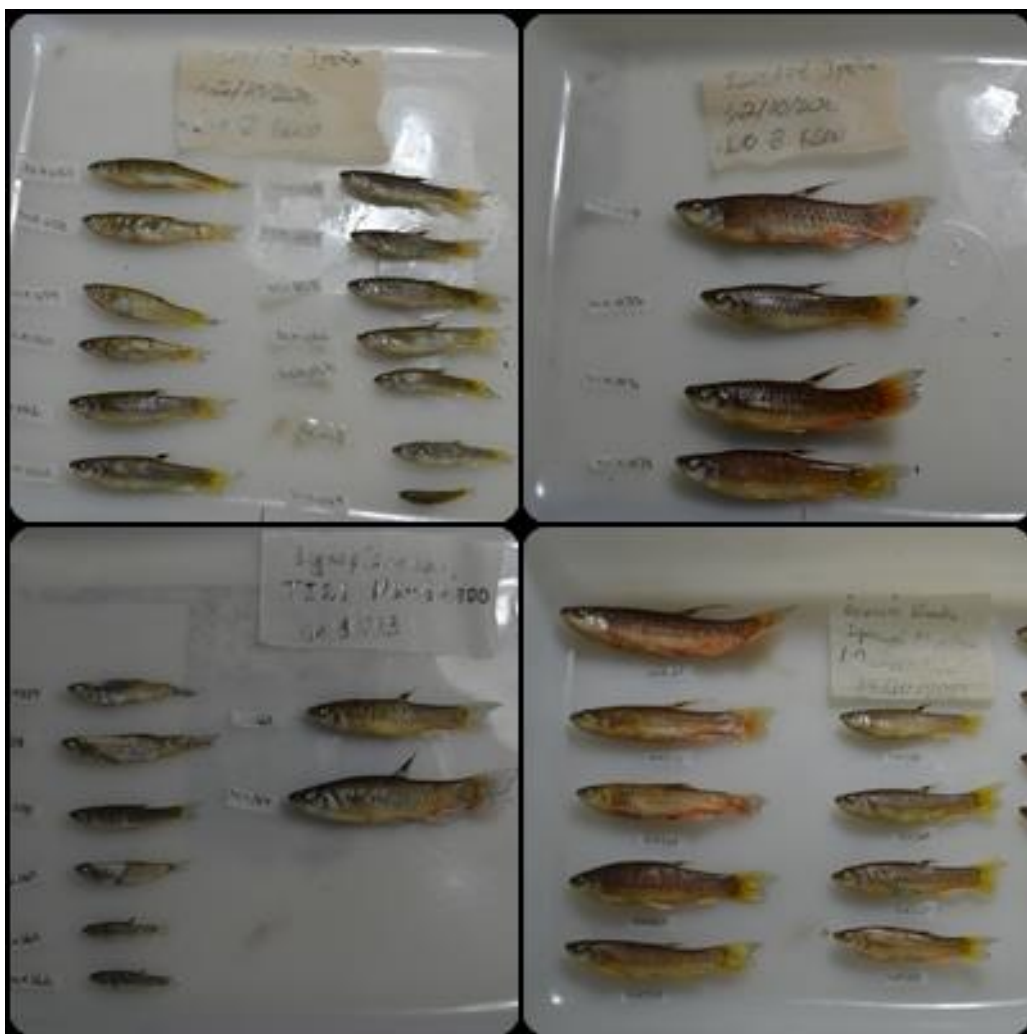
Os igarapés nos quais se realizaram as coletas foram os pertencentes às microbacias: Ipiranga (1ª, 2ª e 3ª ordem), Tinga (1ª, 2ª e 3ª ordem) e Uberê (1º ordem), da bacia leste, totalizando sete pontos amostrados, não havendo a coleta em poças devido o difícil acesso e até mesmo a inexistências destas devido o período que realizou-se as coletas.

O projeto já continha 41 amostras prévias de *Pyrrhulina brevis* coletadas na bacia oeste, sendo realizadas as coletas de amostras adicionais, no qual foram coletados 361 amostras de diversas espécies, no qual as 88 foram da espécie de *Pyrrhulina brevis* apenas. Sendo 70 amostras de *Pyrrhulina brevis* coletadas em igarapés de 1º ordem (26 Ipiranga; 26 Uberê e 18 Tinga); 10 coletadas em igarapés de 2º ordem (2 Ipiranga e 8 Tinga) e 8 coletadas em igarapés de 3º ordem (1 Ipiranga e 7 Tinga) (Figura 4).

A *Pyrrhulina brevis* é a terceira espécie mais amplamente distribuídas pelos igarapés da Reserva Ducke (Livro reserva Ducke, 2008)

Vale ressaltar que não *Pyrrhulina laeta* não foi coletada no período realizado, apesar de haver relatos de coleta desta espécie em igarapés na região leste (ZUANON, 2010), mesma área de concentração das coletas.

Figura 4: Amostragem de *Pyrrhulina brevis* coletadas na Reserva Ducke/INPA.

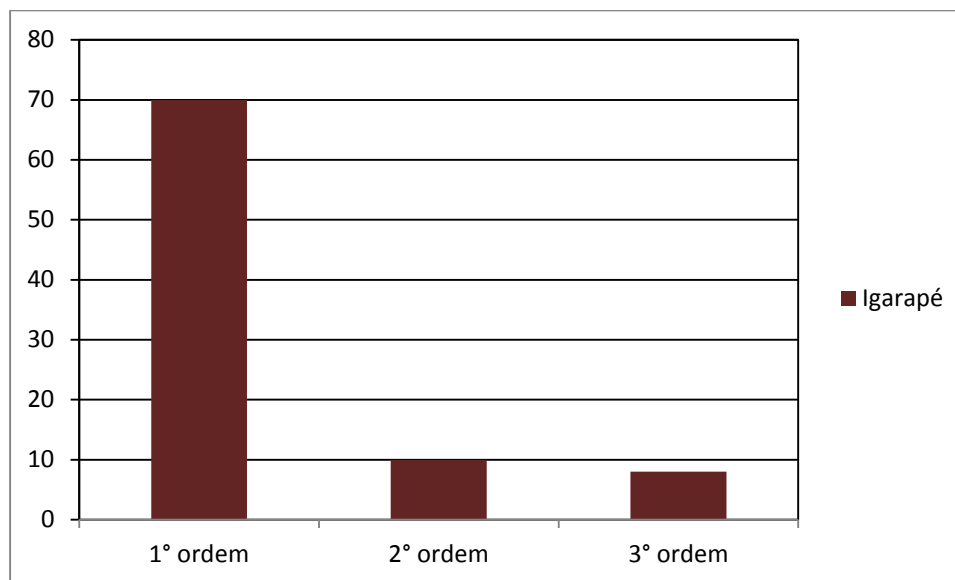


Fonte: Carmo, 2013.

Observou-se que as maiores quantidades de indivíduos coletados de *P. brevis* foram os igarapés de 1ª e 2ª ordem, como podemos observar na Figura 5, devido à estrutura dos mesmos, não possuindo muitos espaços para o refúgio o que facilitou a amostragem. Além disso, esses organismos são característicos desse tipo de habitat e que a espécie *P. brevis* é caracteristicamente abundante entre a ictiofauna de igarapés.

Características estruturais dos ambientes aquáticos tropicais também podem afetar a composição das comunidades de peixes e têm sido reconhecidas como fatores decisivos na distribuição de espécies e na organização das comunidades de peixes de riachos (HYNES, 1970; VANNOTE et al., 1980).

Figura 5: Distribuição de *Pyrrhulina brevis* coletas em diferentes ordens de igarapés.



Fonte: Carmo, 2014.

5.2 DIAGNÓSTICO MOLECULAR

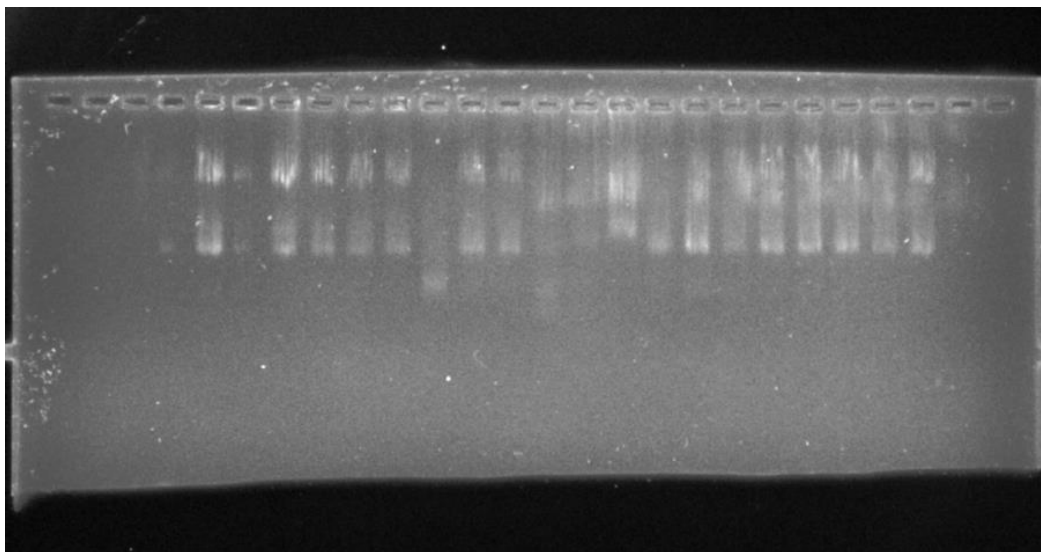
Foi extraído o DNA de 52 amostras da região leste da Reserva, sendo estas purificadas e quantificadas (Anexo 1). As quantificações apesar de estarem no valor de concentração abaixo ou acima do estimado de 5ng/μl, foi possível realizar a amplificação através da PCR.

Através de testes de otimização de *primers* distintos, foi verificados que dos 3 tipos de *primers* analisados: o primeiro OPE09 não apresentou um perfil adequado eletroforético e não se apresentou como um marcador polimórfico para análise de variabilidade de *loci* de RAPD (Figura 6); o segundo OPK04 apresentou polimorfismo e qualidade no perfil eletroforético (Figura 7) e o terceiro o OPA09 não se apresentou como um marcador polimórfico, embora com o padrão eletroforético mostrado foi mais adequado para a finalidade de molecular do RAPD (Figura 8).

O marcador polimórfico e a qualidade de amplificação oferecida pelo mesmo é de crucial importância para que ocorra satisfatoriamente uma PCR e posteriormente as análises de variabilidade genética. Quanto mais bandas forem geradas na eletroforese, polimorfismo e qualidade de separação e visualização, mais informativo o *locus* é considerado para ensaios de variabilidade genética e genético populacioansi, sendo que idealmente um *locus* de RAPD deve gerar um número de bandas superior a 4 e estas

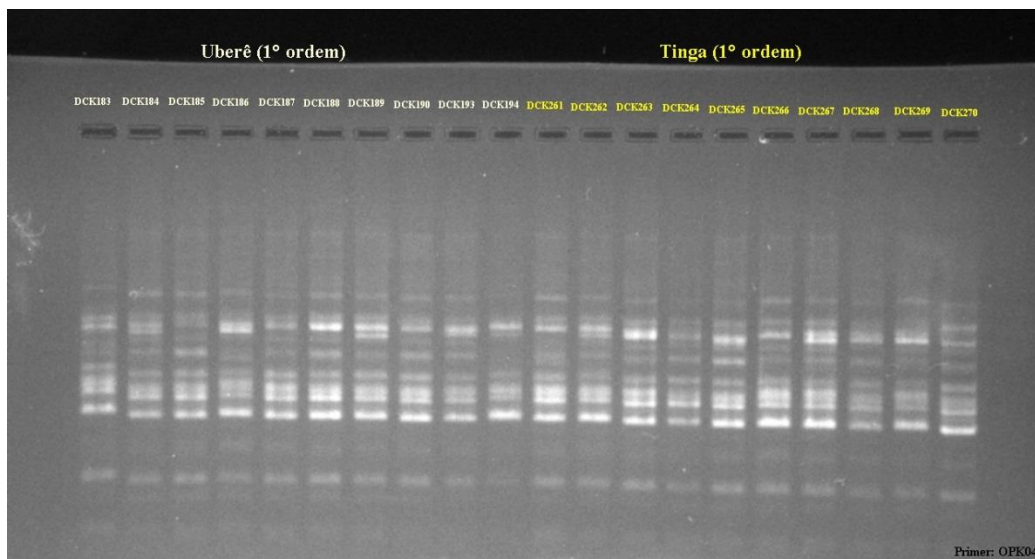
bandas devem ser polimórficas em conjunto populacional, para indivíduos diferentes e entre grupos distintos.

Figura 6: Teste de otimização com o primer OPE09 (baixa qualidade de eletroforese e baixo número de polimorfismo e número de *loci*)



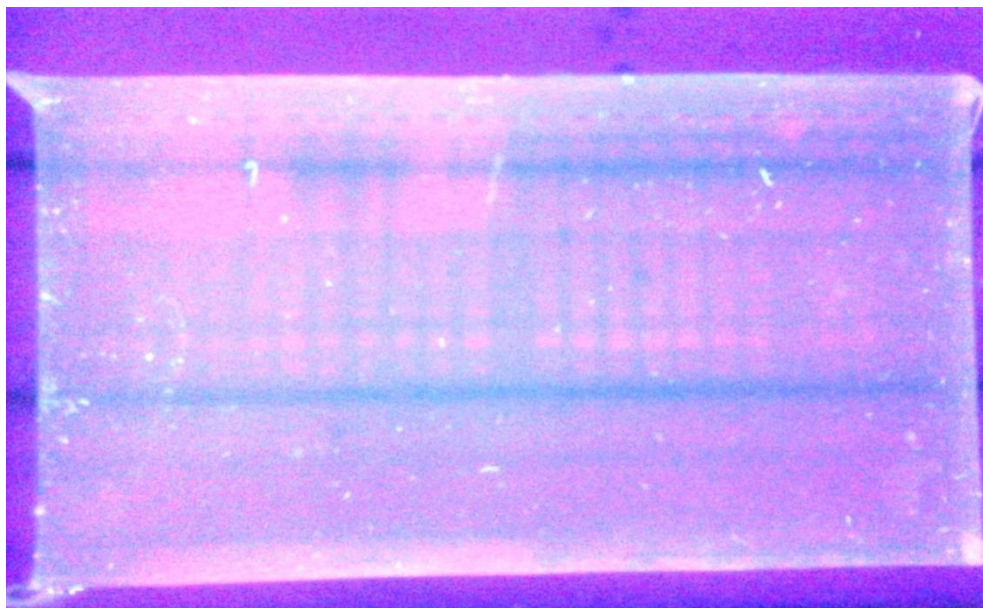
Fonte: Carmo, 2013.

Figura 7: Otimização com o primer OPK04 (Polimórfico e com número de *loci* satisfatório)



Fonte: Carmo, 2014.

Figura 8: Teste de otimização com o primer OPA09

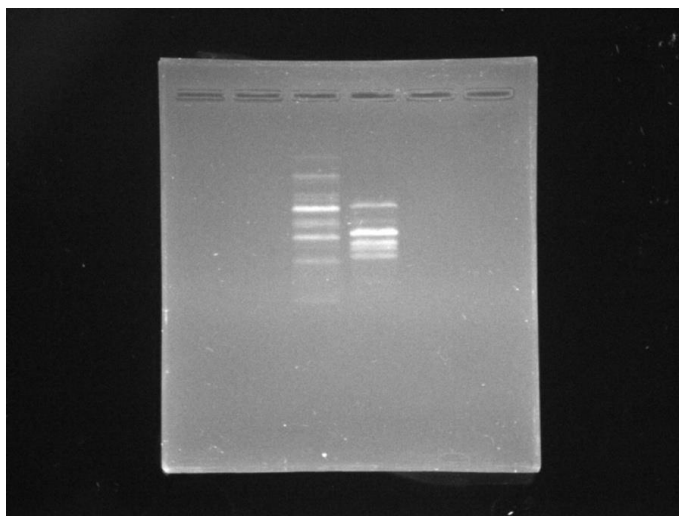


Fonte: Carmo, 2014.

O *primer* OPK04 se apresentou como o único *locus* apropriado para realização do RAPD, porque correspondeu aos pré-requisitos necessários como: reprodutibilidade, número de bandas e polimorfismo (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998; SOLÉ-CAVA, 2001), porém este e o *primer* OPA09 estavam contaminados, de acordo com o padrão do branco (Figura 9). Tal fato impossibilitou as análises populacionais. O próximo passo seria rastrear o agente contaminante, para otimizar o marcador genético molecular para o fim desejado, o que está em processo de execução.

Limitações técnicas frequentemente são relatadas, quando se utiliza marcadores moleculares como o RAPD (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998; SOLÉ-CAVA, 2001), sendo comum relatos da necessidade de otimização laboratorial. A partir da padronização seu uso é tranquilo.

Figura 9: Teste de otimização com o primer OPK04 e OPA09, respectivamente, padrão branco. Note a presença de perfil de bandas, o que não era esperado como controle branco/negativo.



Fonte: Carmo, 2014.

CONCLUSÃO

Verifica-se que os igarapés possuem um emaranhado de informações, principalmente no que diz respeito às populações de peixes existentes neles, a junção de vários fatores contribui nas suas peculiaridades. Cada espaço dos igarapés de 1º, 2º e 3º ordens possuem suas características, o que reflete na distribuição característica de ictiofauna. A espécie *Pyrrhulina brevis* foi mais abundante, principalmente em igarapés de 1º ordem, devido à estrutura do mesmo, o que facilitou a amostragem. Esta espécie caracteristicamente apresenta alta abundância nas amostragens de igarapés, sendo um bom modelo para estudos genético populacionais na ictiofauna de igarapés.

Todas as etapas do projeto trouxeram de certa forma contribuições apesar do trabalho não ter chegado ao nível das análises genético populacionais, em virtude de obstáculos apresentados na seleção de *loci* de RAPD em relação à otimização técnica, fato frequente em procedimentos com marcadores moleculares. Os testes com diferentes tipos de *primers* e condições para a técnica de RAPD, são de grande relevância para que ocorra sua padronização, o que possibilita seu uso para as análises de variabilidade genético/populacionais.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a minha orientadora Natasha Verdasca Meliciano, pelo apoio, paciência e pelos conhecimentos repassados a mim. Aos meus colaboradores, Adrianilson Silva, Cristiane Zurra, Olavo Colatreli, Jansen Zuanon e em especial Alessandra Silva pela companhia e amizade durante todas as fases deste trabalho.

Aos colegas de Laboratório de Genética Molecular – ISB/Coari/AM.
A FAPEAM pela bolsa concedida na realização deste trabalho.

Muito obrigada!

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, F. S.; SODRÉ, L. M. K.; CONTEL, E. P. B. **Population structure analysis of *Pimelodus maculodus* (Pisces, Siluriformes) from the Tiête and Paranapanema Rivers (Brazil).** *Genetics and molecular Biology*, v.26, p.301– 305, 2003.
- 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.
- 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.
- CARAMASCHI, R. MAZZONI, AND P. R. PERES-NETO (eds.). *Série Oecologia Brasiliensis*, v. 6, Programa de Pós-graduação em Ecologia–Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil.
- CARDOSO, V. T., 2005 – **A dieta de *Pyrrhulina brevis* (Characiforme: Lebiasinidae) varia entre igarapé e poças temporárias?** Relatório final do curso “Ecologia da Floresta Amazônica”, disponível em: <http://pdbff.inpa.gov.br/cursos/efa/livro/2005/pdfs/rlfvictor.pdf>, ultimo acesso em 11 de abril de 2013.
- CASTRO, R. M. C.1999. **Evolução da ictiofauna de riachos sul-americanos: padrões gerais e possíveis processos causais.** In: CARAMASCHI, E. P.; MAZZONI, R.; PERES-NETO, P. R. (Eds). **Ecologia de Peixes de Riachos**. Vol. Programa de Pós-graduação em Ecologia-Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil. p. 139-155.
- CASTRO, R.M.C. & Casatti, L. 1997. **The fish fauna from a salt forest stream of the upper Paraná River basin, southeastern Brazil.** *Ichthyology Explorer Freshwaters* 7:337-352.
- COLATRELI, O. C. **Novas abordagens de comunidades utilizando dados genéticos de peixes de igarapés da bacia do rio Negro.** Dissertação de mestrado: Genética, Conservação e Biologia Evolutiva. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA) e Universidade Federal do Amazonas (UFAM), Manaus, AM, Brasil, p. 55, 2012.
- 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.
- ESPÍRITO-SANTO, H. M. V.; MAGNUSSON, W. E.; ZUANON, J.; MENDONÇA, F.; LANDEIRO, V. L. 2009. **Seasonal variation in the composition of fish assemblages in small Amazonian forest streams: evidence for predictable changes.** *Freshwater Biology*, 54: 536-548.

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

FARIAS, I. P.; Orti, G.; Sampaio, I.; Schneider, H.; Meyer, A. 1999. **Molecular DNA phylogeny of the family Cichlidae: Monophyly and fast molecular evolution of the neotropical assemblage.** *Jour. Mol. Evol.*, 48: 703-711.

FARIAS, I. P.; Orti, G.; Sampaio, I.; Schneider, H.; Meyer, A. 2001. **The cytochrome b gene as phylogenetic marker: The limits of resolution for analyzing relationships among cichlid fishes.** *Jour Mol. Evol.*, 53: 89-103.

FARIAS, I. P.; Schneider, H.; Sampaio, I. 1998. **Molecular phylogeny of neotropical cichlids: The relationship of Cichlasomines and Heroines.** p. 499-508. In: Malabarba, L. R.; Reis, R. E.; Vari, R. P.; Lucena, Z. M.; Lucena, C. A. S. *Phylogeny and classification of Neotropical fishes.* EDIPUCRS, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil. p. 603.

FERREIRA, M. E. & Grattapaglia, D. 1995. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética.** 2a. ed. Brasília, EMBRAPA/CENARGEN, 220 pp.
FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética.** 3ªed. Brasília: Ed. EMBRAPA-CENARGEN, 1998.

FRITSCH, P. & Rieseberg, L. H. 1996. The use of Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) in conservation genetics. *In:* Smith, T. B. & Wayne, R. K. (Ed.). **Molecular genetic approaches in conservation**, New York: Oxford University Press, pp. 54-73.

GOULDING, M.; Carvalho, M.L. & Ferreira, E.G. 1988. **Rio Negro: Rich Life in Poor Water.** Academic Publishing, Netherlands.

HYNES, H.B.N.. **The Ecology of Running Waters.** Liverpool University Press, Liverpool. 555p. 1970.

JACKSON, D.A. & OLDEN J.D. (2001) **What controls who is where in freshwater fish communities - the roles of biotic, abiotic, and spatial factors.** *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, **58**, 157-170.

JUNK, W. J.; FURCH, K. 1985. **The physical and chemical properties of Amazonian waters and their relationship with the biota.** In: TREHERNE, J. E. (Eds). *Key Environments: Amazonia.* p. 03-17.

JUNK, W. J. 1983. **As águas da Região Amazônica.** In: SALATI, E.; SCHUBART, H. O. R.; JUNK, W. J.; OLIVEIRA, A. E. (Eds). *Amazônia: Desenvolvimento, Integração e Ecologia.* Vol. Editora Brasiliense. São Paulo, Brazil. p. 45-100.

LOWE-MCCONNELL, R. H. 1999. **Especiação: Os Grandes Lagos Africanos como Laboratórios de Evolução.** In: LOWE-MCCONNELL, R. H. (Eds). *Estudos ecológicos de comunidades de peixes tropicais.*

MENDONÇA, F. P.; ZUANON, J. A. S. 2007. **Metodologia padronizada para coletas de peixes em igarapés de 1ª e 2ª ordens.** Projeto igarapés, 2.

- MEYER J.L., Strayer D.L., Wallace J.B., Eggert S.L., Helfman G.S. & Leonard N.E.(2007) **The contribution of headwater streams to biodiversity in river networks.** *Journal of the American Water Resources Association*, **43**, 86-103.
- MEYER, A. 1993. **Evolution of mitochondrial DNA in fishes.** In: Hochachka; Mommsen. *Biochemistry and molecular biology of fishes.* Elsev. Scie. Pub., 2: 1-38.
- MILLER, M.P. **Tools for population genetic analyses (TFPGA) 1.3:** A Windows program for the analysis of allozyme and molecular population genetic data. Computer software distributed by author. 1997.
- NASON, J. D.; Aldrich, P. R. & Hamrick, J. L. 1997. Dispersal and the dynamics of genetic structure in fragmented tropical tree populations. *In: Laurence, W. F. & Bierregaard Jr. R. O.(Ed.) Tropical Forest remnants: ecology, management and conservation of fragmented communities*, Chicago: University of Chicago Press, pp. 304-320.
- NEI, M. **Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals.** *Genetics*, v. 89, p. 583-590,1978.
- NORMAN, J. A.; Mortiz, C.; Limpus, C. J. 1994. **Mitochondrial DNA control region polymorphisms: Genetic markers for ecological studies of marine turtles.** *Mol. Eco.*, 3: 363-373.
- PAZIN, V. F. V.; Magnusson, W. E.; Zuanon, J.; Mendonça, F. 2006. **Fish assemblages in temporary ponds adjacent to ‘terra-firme’ streams in Central Amazonia.** *Freshwater Biology*, 51: 1025–1037.
- PETTS, G. E.1994. **Rivers: dynamic components of catchment ecosystems.** In: CALOW, P.; PETTS, G. E. (Eds). *The River Handbook*. Vol. 2. Blackwell Scientific, Oxford. p. 3-22.
- RESERVA DUCKE: **A biodiversidade amazônica através de uma grade / Organizadores: Márcio Luiz de Oliveira, Fabrício B. Baccaro, Ricardo Braga-Neto, William E. Magnusson — Manaus : Áttema Design Editorial, 2008.**
- ROHLF, F. J. NTSYS-pc: **Numeral taxonomy and multivariate analysis system.** Exeter Software, Applier Biostatistics, N.Y., p.225, 1992.
- SABINO, J. & ZUANON, J. 1998. **A stream fish assemblage in central amazonia: distribution, activity patterns and feeding behavior.** *Ichthyology Explorer Freshwaters*. 8: 201-210.
- SABINO, J. 1999. **Comportamento de peixes em riachos: métodos de estudo para uma abordagem naturalística,** p 183–208. In: *Ecologia de Peixes de Riachos*. E. P.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. 1989. **Molecular cloning: A laboratory manual.** Cold Spring Harbor, New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2^a ed.

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

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

SOLÉ-CAVA, A. J. **Biodiversidade molecular e genética da conservação**. In: MATIOLI, S. R. *Biologia Molecular e Evolução*. Ribeirão Preto: Holos, p.171-190, 2001.

UIEDA, V.S.; Buzzato, P. & Kikuchi, R.M. 1997. **Partilha de recursos alimentares em peixes em um riacho de serra do sudeste do Brasil**. Anais da Academia Brasileira de Ciência. 69:243-252.

VANNOTE, R.L.; MINSHALL, W.G.; CUMMINS, K.W.; SEDELL, J.R.; CUSHING, C.E.. **The river continuum concept**. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 37, 130 – 137, 1980.

WALKER, I. 1991. **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.

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

ANEXO 1- Quantificação/Concentração das amostras de DNA extraído da região leste da Reserva Ducke.

| AMOSTRA | DNA(ng/μl) | A260/280 | A260/230 |
|----------------|-------------------|-----------------|-----------------|
| 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 |

Fonte: Carmo, 2014.