

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: Sayara Meyre Zaguri Pereira, FAPEAM

COARI
2015

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/048/2014

**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: Sayara Meyre Zaguri Pereira, FAPEAM

Orientador: Prof.^a Natasha Verdasca Meliciano

COARI

2015

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, mediante menção de créditos, ou pelos detentores destes direitos.

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 do 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, abundância 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 intraespecíficos, 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= 5-10 por ponto) 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 morfológicamente. Posteriormente, houve a extração, purificação e quantificação do DNA dos espécimes coletados, que posteriormente foram submetidos ao processo de identificação de diversidade genética por meio do RAPD, iniciando pelo procedimento de seleção de *primers* mais adequados para o levantamento de diversidade genética do grupo taxonômico escolhido. Uma vez selecionados, padronizados e o respectivo *loci* caracterizados dos *primers* candidatos, estes serão utilizados nas análises genético/populacionais. 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 like 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 = 5-10) 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 129 specimens were exclusively *Pyrrhulina brevis*, not having any *Pyrrhulina laeta*, even though are reports of its occurrence in the surveyed area. Of the fourteen tested primers, ten showed appropriate characteristics as RAPD marker. 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	15
3.1 GERAL.....	15
3.2 ESPECÍFICOS	15
4. METODOLOGIA.....	16
4.1 ORGANISMO MODELO	16
4.2 ÁREA DE ESTUDO	16
4.3 MÉTODO DA COLETA.....	17
4.4 METODOLOGIA LABORATORIAL.....	18
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES	20
5.1 AMOSTRAGEM	20
5.2 DADOS GENÉTICOS MOLECULARES DE RAPD	20
CONCLUSÃO.....	24
REFERÊNCIAS	25

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 de várias formas, sendo uma delas 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).

As águas de característica ácida dos igarapés 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, as águas 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 compõem cada igarapé, as características de produtividade ambiental que circundam as diferentes ordens influenciam a riqueza e

distribuição regional 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, estreitos 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) e influenciando a distribuição das espécies nestes igarapés.

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 subsidiar uma diversa coleção de espécies de peixes que buscam alimento, abrigo e local de procriação (PAZIN et al., 2006).

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 a esses habitats o que configura uma estruturação de comunidade ecológica única e diferenciada de outros

tipos de ambientes aquáticos, fazendo com que estas comunidades possam, também, ser utilizadas como indicadoras 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 de riachos, como poças e cursos de igarapés, o que permite avaliar a estrutura populacional, a capacidade de locomoção e a 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 pode ser influenciado pela estrutura e 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 do gênero de *Pyrrhulina* sp., grupo de ampla distribuição entre os diferentes ambientes de igarapés localizados na Reserva Florestal Adolpho Ducke/Manaus/AM, utilizando como modelo na elucidação sobre hábitos e capacidades biológicas sobre espécies de igarapés, uma vez que este gênero apresenta pequeno porte, comum na ictiofauna deste ambiente, e ampla distribuição e que diferentes propriedades ambientais podem alterar a composição e a distribuição regional das espécies viventes.

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 IGARAPÉS AMAZÔNICOS E ICTIOFAUNA ASSOCIADA

A bacia amazônica é um dos ecossistemas que apresenta uma das maiores biodiversidade de espécies de peixes continentais existentes, representando 85% de toda biodiversidade de água doce na porção sul-americana 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, com temperatura baixa e pouco variável ao longo do ano (GOULDING et al., 1988).

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).

Os igarapés de terra firme, em sua maioria, apresentam águas ácidas, devido à presença de ácidos húmicos e fúlvicos. São pobres em nutrientes e as árvores que se fecham sobre os mesmos impedem que a luz atinja a superfície da água, de forma que plantas aquáticas são virtualmente inexistentes (Junk & Furch, 1985; Walker, 1995).

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. 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, na definição de estrutura e distribuição 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 seres vivos (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 e fluxo gênico. No entanto, esse marcador molecular, baseado também 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), sem contar outros custos associados aos microssatélites relacionados ao procedimento de genotipagem, portanto seu uso deve ser ponderado dependendo do caso.

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 com 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.

De maneira geral, 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 microssatélites (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998; SOLÉ-CAVA, 2001).

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 ao mesmo tempo (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998).

O princípio da técnica é 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).

Os marcadores de polimorfismo de DNA amplificado ao acaso (RAPD, *Random Amplified Polymorphic DNA*) são altamente eficazes na identificação de variações no DNA genômico entre subespécies ou populações de várias espécies; na identificação de linhagens distintas, na determinação do impacto genético da introdução de espécies cultivadas em populações naturais (FREITAS et al, 2007) entre outras aplicações voltadas para o entendimento da variabilidade genética . Este marcador genético tem sido utilizado com muito sucesso para a estimativa do valor de diversidade genética em populações, espécies e linhagens de peixes (Povh et al., 2005).

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 genético-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*, o presente projeto propõe um estudo genético populacional das espécies deste gênero nos igarapés da reserva Adolpho Ducke/Manaus/AM, 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 *Pyrrulyna* spp, coletados em diferentes ordens e sub-bacias de igarapés da Reserva Experimental Adolpho/Ducke/Manaus, AM (unidade PPBio), 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

- Extração de DNA dos indivíduos coletados da espécie *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.
- Confeccionar relatório e artigo.

4. METODOLOGIA

4.1 ORGANISMOS MODELO

O gênero *Pyrrhulina* (Characiformes: Lebiasinidae) é representado na Reserva Adolpho Ducke por duas espécies: *Pyrrhulina brevis* e *Pyrrhulina laeta*, sendo *P. brevis* entre as espécies mais abundante, frequente e distribuída em estudos de variações sazonal, sendo encontrada tanto em poças quanto nos cursos d'água (ESPIRITO-SANTO, 2009). A gênero *Pyrrhulina* possui pequeno porte corpóreo (comprimento máximo = 7,0 cm), e dieta relativamente generalista, sendo frequentemente encontrados em remansos e nas proximidades das margens, 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).

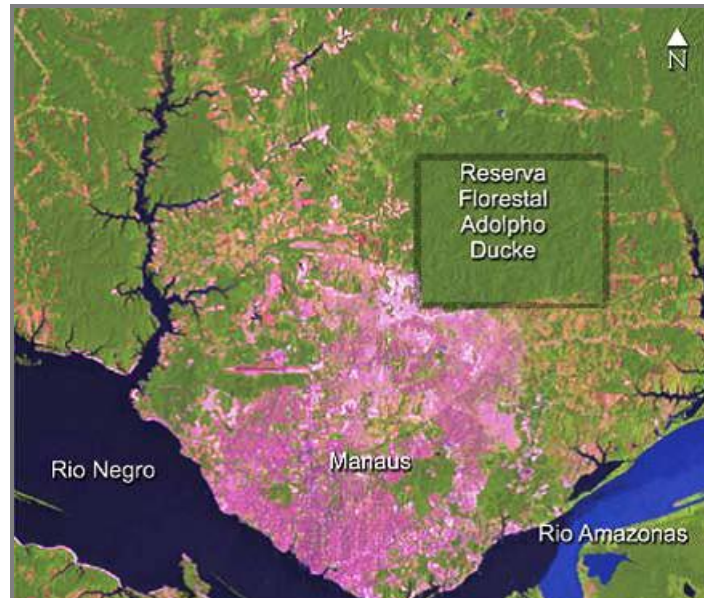
Por possuírem ampla distribuição, frequência, abundância e características da ictiofauna de igarapés, incluindo os da área de estudo, as espécies deste gênero (*P. brevis* e *P. laeta*), existentes na Reserva Adolpho Ducke, foram selecionadas como modelo para o entendimento de dinâmica e de distribuição genético/populacional dos peixes de igarapés.

4.2 ÁREAS 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.

4.3 MÉTODOS DA COLETA

As coletas das amostras foram desenvolvidas, seguindo a metodologia proposta por Mendonça e Zuanon (2007), com algumas modificações. Em diferentes pontos escolhidos dos 38 existentes, as extremidades de um transecto de 50 metros dos igarapés foram bloqueadas com redes de malha fina para posterior coleta de indivíduos das espécies de *Pyrrhulina*.

Após a coleta das amostras, estas foram colocadas em sacos plásticos com álcool 90% e identificados por sua respectiva localidade. 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 1,5mL contendo álcool 95%. Os indivíduos de menor porte que não possibilitaram a retirada de tecido sem danificar o exemplar, foram armazenados diretamente em microtubos de 2 mL com álcool 95% e postos em freezer -10 ou - 80°C.

Uma alíquota dos tecidos obtidos e acondicionados em álcool serão depositados em freezer -80°C na Coleção de Tecidos de Genética Animal da UFAM (CTGA/ICB/UFAM, Fiel Depositário, CGEN, Deliberação No. 75, de 26 de agosto de

2004) e os exemplares fixados serão depositados na Coleção de Peixes do INPA. Todos os pontos amostrados serão georeferenciados por GPS e pelo menos 1 indivíduo de cada espécie será fotografado vivo e posteriormente fixado. A identificação taxonômica das espécies será realizada com uso de chaves dicotômicas, literatura especializada, e comparação com exemplares depositados em museus e coleções científicas.

Ressalta-se que esta etapa metodológica já foi efetuada em 2011 e durante o PIBIC anterior 2013/2014.

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 95%, foi feito seguindo o protocolo de extração por Fenol-Clorofórmio conforme estabelecido por Sambrook e colaboradores (1989), com algumas modificações. Nesse processo 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-RAPD, que num primeiro momento teve como finalidade uma seleção de *primers*, buscando isolar regiões moleculares que apresentem melhor padrão e sucesso de aplicação para o genoma do gênero. Os testes de amplificação para a seleção de marcadores de *locos* de RAPD foram desenvolvidos com 14 sequências de *primers* distintos, respeitando a temperatura de *melting* de cada *primer* (Tabela 1). Os reagentes utilizados na reação de PCR-RAPD com suas respectivas quantidades e concentrações estão representados na Tabela 2. As reações de PCR-RAPD foram amplificadas num termociclador “Bio-Rad MyCycler”, programado para 40 ciclos, em que cada ciclo compreende uma desnaturação de 92°C por 40 segundos, anelamento a 30°C-42°C por 90 segundos e extensão a 72°C por 120 segundos. Precedendo e após os 40 ciclos houve uma pré-desnaturação de 92°C por 5 minutos e extensão final a 72°C por cinco minutos, respectivamente. Os produtos da amplificação foram aplicados em agarose 1,5%, misturados a um intercalante de DNA e corante para visualização da corrida eletroforética (*Gel Red - Biotum* e azul de bromofenol, respectivamente). Em cada

corrida de eletroforese, foi utilizado um marcador de peso molecular de 100 pares de base (pb) como parâmetro para avaliar os perfis eletroforéticos diferentes obtidos para cada oligonucleotídeo testado.

Tabela 1: Sequências de nucleotídeos, temperatura média de desnaturação (*melting temperature* – *TM*) e porcentagem G+C dos *primers* testados.

<i>Primer</i>	Sequência de nucleotídeos	TM	% (G+C)
W01	5'CCTGTGACTC3'	30.6 °C	60
W02	5'AAGCGCCCA3'	42.9 °C	60
W03	5'GTGAGGCCTG3'	36.6 °C	70
W04	5'AGGCGAAGA3'	34.6 °C	50
W08	5'TCTCCGTCG3'	32.8 °C	60
W09	5'GTGACCGAGT3'	33.9 °C	60
W10	5'TCGCATCCCT3'	36.5 °C	60
W11	5'CTGATGCGTG3'	33.7 °C	60
W13	5'CACAGCGACA3'	35.9 °C	60
W19	5'CTGGCGAAC3'	34.4 °C	60
X03	5'GTGACGCGGT3'	41.3 °C	70
X06	5'ACGCCAGAGG3'	39.3 °C	70
X09	5'GGTCTGGTTG3'	31.6 °C	60
PC-01	5'TTCGAGCCAT3'	32.2 °C	50

Tabela 2: Reagentes e medidas utilizados na PCR-RAPD

Reagentes	Medidas
Tampão (10X)	1.5 µL
dNTP (10mM)	1.5 µL
MgCl ₂ (25mM)	1.5 µL
<i>Primer</i> (2 µM)	1.5 µL
<i>Taq</i> DNA Polimerase (5u/µL)	0,3 µL
H ₂ O	7,7 µL
DNA (10-15ng/µl)	1 µL
TOTAL	15 µL

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 AMOSTRAGEM

Os igarapés em que foram realizadas as coletas são pertencentes às microbacias: Ipiranga (1^a, 2^a e 3^a ordem), Tinga (1^a, 2^a e 3^a ordem) e Uberê (1^o ordem), da bacia Leste de Reserva, totalizando sete pontos de coleta e 88 amostras. O projeto já continha 41 amostras prévias de *Pyrrhulina brevis* anteriormente coletadas na bacia Oeste, que no total resulta em 129 amostras. Na região Leste foram obtidas 70 amostras de *Pyrrhulina brevis* coletadas em igarapés de 1^o ordem (26 Ipiranga; 26 Uberê e 18 Tinga); 10 coletadas em igarapés de 2^o ordem (2 Ipiranga e 8 Tinga) e 8 coletadas em igarapés de 3^o ordem (1 Ipiranga e 7 Tinga). Vale ressaltar que não foram coletados espécimes de *Pyrrhulina laeta*, no período realizado das amostragens de 2011 e 2013 (PIB/0124/2013), apesar de haver relatos de coleta desta espécie em igarapés na região Leste da reserva (MENDONÇA et al., 2008; ZUANON, 2010) e nas áreas de concentração das coletas. Dessa forma, todas as análises seguintes desenvolvidas desse projeto serão focadas somente na espécie *P. brevis*.

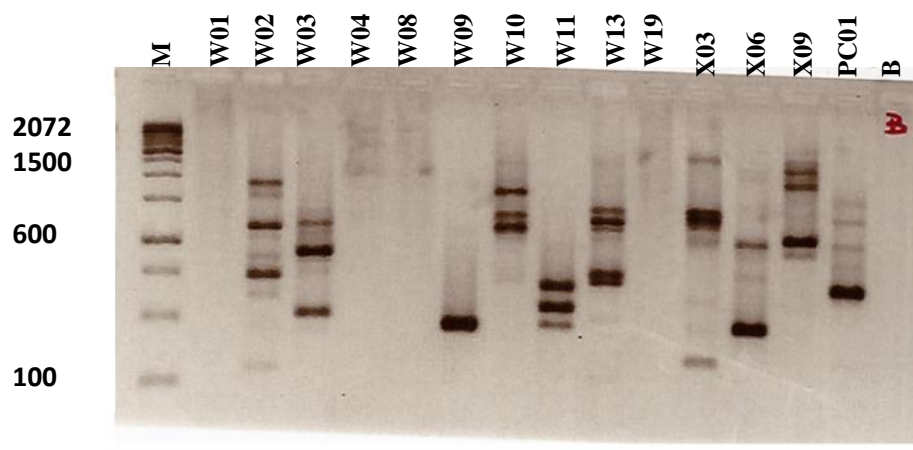
A *Pyrrhulina brevis* é característica desse tipo de habitat, sendo a terceira espécie mais amplamente distribuída pelos igarapés da Reserva Ducke e uma das seis mais abundantes entre a ictiofauna dos igarapés desta região (MENDONÇA et al., 2008).

5.2 DADOS GENÉTICOS MOLECULARES DE RAPD

Num primeiro momento encontrou-se dificuldade para seleção dos *primers*, pois alguns reagentes da PCR encontravam-se contaminados. Após o processo de rastreamento dos reagentes contaminantes, foi desenvolvido e etapa de seleção de *primers*. Dos 14 *primers* testados; apenas quatro não amplificaram (W01, W04, W08 e W19) (figura 2) e dez *primers* apresentaram sucesso de amplificação (W02, W03, W09, W10, W11, W13, X03, X06, X09 e PC01), apresentando no total 41 *locos*, com o número médio de *locos* encontrado de 4,1, sendo no mínimo 1 (W09) e o máximo 8 (W02) *locos* por *primer* observados (Tabela 3).

Telles et al.(2001) em seu estudo com marcadores RAPD na análise da divergência genética entre raças de bovinos, testaram 40 *primers*, 16 deles não amplificaram ou não apresentaram um bom padrão de amplificação e os 24 *primers* restantes, que mostraram padrão de amplificação adequado, apresentaram um total de 133 *locos* e o número médio de *locos* encontrado foi 5,5, sendo o mínimo 2 e o máximo 10 *locos* por *primer* analisado.

Figura 2: Ensaio de seleção de *primers*



Fonte: Zaguri, 2015

Tabela 3: Relação do número de *locos* por *primer* selecionados.

<i>Primer</i>	Nº de <i>Locos</i>	Tamanho dos fragmentos amplicados (pb)
W02	8	100~900
W03	3	400~600
W09	1	~200
W10	3	~600~800
W11	3	~200~400
W13	5	~500~800
X03	5	~100~1500
X06	3	~300~600
X09	5	~600~1500
PC01	5	~300~1100
TOTAL	41	-

O T_m dos *primers* utilizados variou de 30, 6° C até 42,9° C (Tabela 1). A temperatura de *melting* (T_m) é uma propriedade dos ácidos nucleicos em dupla fita e é definida como a temperatura na qual metade dos fragmentos de DNA está na forma desnaturada, ou seja, não pareados, e a outra metade está pareada. Esta propriedade é influenciada pela quantidade relativa das bases Citosina (C) e Guanina (G) de uma dada dupla fita de DNA, basicamente pelo fato do pareamento destas bases ocorrerem mediante a formação de três pontes de hidrogênio, trazendo maior estabilidade à dupla fita (SNUSTAD & SIMMONS, 2008).

Este fato também pode interferir na temperatura de hibridação de um *primer* e sua cinética de trabalho durante uma reação de PCR, pois quanto maior o número de bases C e G, mais facilmente haverá “ligação” do *primer* a sua região complementar, porém mais difícil será sua desnaturação (JÚNIOR, 2010). Isto significa que durante o processo de seleção de locos de RAPD este fator deve ser levado em conta, pois este fenômeno pode comprometer o desenvolvimento adequado da reação em cadeia da polimerase.

Segundo Gomes et al., (1998) o procedimento de amplificação PCR-RAPD é particularmente sensível as mudanças nas condições de reação, que podem afetar a reprodutibilidade dos produtos de amplificação e também influenciar no sucesso de amplificação dos quatro *primers* que não apresentaram resultado positivo na PCR e também na quantidade de *locos* observada.

Existem muitas variáveis na reação que contribuem para isso, entre as quais o termociclador, a DNA polimerase, a concentração de DNA e *primers* e a composição do tampão são as mais freqüentemente citadas (QUESADA & CENIS, 1995).

Contudo, mesmo contendo certas limitações, o RAPD-PCR não exige o conhecimento prévio da sequência de DNA, uma vez que as variações genômicas detectadas pelo método se baseiam apenas na diferença de tamanho genético-molecular entre indivíduos, relacionada à distribuição dos sítios complementares a um *primer* curto específico (07 até 10 bases), mas de sequência aleatória e, ainda, apresenta baixo custo operacional, quando comparados com outros marcadores de polimorfismo genético (SOLÉ-CAVA et al., 2001; FREITAS et al., 2007).

A partir de um único *primer* por reação, verifica-se um grande número de segmentos amplificados, de sequências desconhecidas e de tamanhos variáveis, resultando em variação de polimorfismos e números de *locos*. Assim, diferentes indivíduos produzem distintos padrões de fragmentos amplificados com base nas

variações de diferentes localizações dos sítios de hibridização dos *primers* ao longo da fita de DNA (FREITAS et al, 2007).

Por todas as características demonstradas, anteriormente, o RAPD é um marcador interessante em estudos prévios e amplos de variabilidade genética de organismos, sendo muito utilizado em estudos de distribuição e caracterização de variabilidade genética de peixes, tanto *in natura* (FREITAS et al, 2007), como de cultivo (GOMES et al, 2008).

CONCLUSÃO

Os *primers* estudados apresentaram padrão adequado de amplificação e variação de *locos*, quando comparados com outros trabalhos. Para reação de PCR-RAPD é preciso observar a temperatura de anelamento de cada primer, a porcentagem de citosina e guanina, concentrações dos reagentes e os equipamentos utilizados na reação, pois estes podem influenciar no resultado. Porém com os devidos cuidados é possível selecionar uma variedade de *primers* marcadores de RAPD com grande número de *locos* e, conseqüentemente mais informativos, capazes de distinguir variações genéticas populacionais, que podem refletir o comportamento reprodutivo de uma espécie e, portanto, úteis como marcadores de estruturação genética, uma alternativa mais barata e rápida para levantamentos de diversidade genética e entendimento do comportamento genético e evolutivo de espécies biologicamente pouco compreendidas, como é o caso dos organismos de igarapés que apresentam sua dinâmica populacional praticamente desconhecida.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a minha orientadora Natasha Verdasca Meliciano, pelo apoio, paciência e pelos conhecimentos repassados a mim. As minhas colegas de trabalho Fabrícia Karolina Guimarães e Adriana Alencar e ao Olavo P. Colatreli pela paciência e ajuda neste trabalho.

A FAPEAM pela bolsa concedida na realização deste trabalho.

Muito obrigada!

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.
- 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.
- 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>, último 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 genética**. 3ªed. Brasília: Ed. EMBRAPA-CENARGEN, 1998.

GOMES, Patrícia Cristina; RIBEIRO, Ricardo Pereira, et al. **Diversidade genética de três estoques de piapara (*Leporinus elongatus*), utilizando RAPD**. Maringá. 2008.

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.

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.

JÚNIOR, Reginaldo Gomes de Arruda; **Temperatura de Melting: um estudo comparativo**. Campo Grande, 2010

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**. Projetoigarapés, 2.

MENDONÇA, F.; V, P.; ESPÍRITO-SANTO, H. M. V.; ZUANON, J.; MAGNUSSON, W. E. 2008. **Peixes**. In: Oliveira, M. L.; BACCARO, F. B.; BRAGANETO, R.; MAGNUSSON, W. E. (Eds). **A reserva Ducke: A biodiversidade amazônica através de uma grade**. Vol. Áttema Design Editorial, Manaus, Am, Brasil.

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.

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.

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.

TELLES, M. P. de C. et al. **Marcadores RAPD na Análise da Divergência Genética entre Raças de Bovinos e Número de locos necessários para a estabilidade da divergência estimada**. *Ciência Animal Brasileira* 2(2): p. 87-95, 200.

POVH, J.A. et al. **Estimativa da variabilidade genética em linhagens de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) com a técnica de RAPD**. Acta Sci. Anim. Sci., Maringá, v. 27, n. 1, p. 1-10, 2005.

QUESADA, M.P., & CENIS, J.L. 1995. **Random amplified polymorphic DNA (RAPD-PCR) in the characterization of wine yeasts**. Am. J. Enol. Vitic.

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.

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.

SNUSTAD, P.; SIMMONS, M.J. 2008. **Fundamentos de genética**. 4ª Edição. Editora Guanabara. Koogan S. A.. Rio de Janeiro. 922 p.

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.