

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
DEPARTAMENTO DE APOIO À PESQUISA
PROGRAMA INSTITUCIONAL DE BOLSAS DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA
COMITÊ CIENTÍFICO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

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

Bolsista: Fabrície Karoline Barbosa Guimarães, FAPEAM

Coari
2015

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
DEPARTAMENTO DE APOIO À PESQUISA
PROGRAMA INSTITUCIONAL DE BOLSAS DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA
COMITÊ CIENTÍFICO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

RELATÓRIO FINAL

PIB-B/0029/2014

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

Bolsista: Fabrício Karoline Barbosa Guimarães, FAPEAM

Orientador: Prof.^aNatasha Verdasca Meliciano

Coari
2015

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

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

RESUMO

Abordagens taxonômicas moleculares como a do *DNA barcoding*, vem sendo utilizadas com sucesso nos mais variados níveis e grupos taxonômicos, promovendo: o descobrimento de espécies crípticas, a resolução da variação morfológica e o esclarecimento de ambiguidades dentro de um grupo taxonômico, sendo uma técnica importante para determinação de faunas pouco estudadas, como a ictiofauna amazônica que tem somente 40% das espécies conhecidas, das quais grande parte encontra-se longe dos grandes rios, como em Igarapés, refletindo a carência de estudos neste tipo de ecossistema. Diante do exposto, o presente trabalho propõe, amostrar a ictiofauna de Igarapés da Reserva Florestal Adolpho Ducke (Manaus/AM), pertencente ao INPA que faz parte do programa PPBio, e fazer uma caracterização genético/molecular dessas amostras, seguindo a metodologia do DNA barcoding para discriminação da composição de espécies de peixes da região e de um ecossistema pouco estudado geneticamente, além disponibilizar as informações genéticas obtidas no BOLD system. Como resultado, amostrou-se 378 indivíduos de trinta e uma espécies identificadas. O fragmento do gene COI gerado possui no seu total 587 pares de base, sendo 277pb conservados e 310pb variáveis, destes 257 foram parcimoniosamente informativos. Do total, vinte e cinco espécies foram sequenciadas, sendo doze delas molecularmente resgatadas ao nível de espécie e onze ao nível de gênero. Quatro morfotipos apresentaram inexistência de identificação relação ao gênero e espécie e sete (28%) foram considerados candidatos como registros inéditos taxonômicos. A metodologia do DNA Barcode realizou de maneira satisfatória, embora o fragmento gerado não seja o tamanho padronizado pela técnica (648pb), este se mostrou um comprimento adequado para elucidação taxonômica e com potencial de uso em perspectivas evolutivas de grupos pouco estudados como os peixes de Igarapés.

Palavras-chave: DNA Barcode, Ictiofauna, Igarapés.

LISTA DE FIGURAS

Figura 01. Localização da Reserva Florestal Adolpho Ducke (RFAD) próxima à cidade de Manaus/AM.....	19
Figura 02: Eletroforese em gel de agarose a 0,8% demonstrando fragmentos amplificados do DNA extraído.....	23
Figura 03: Figura 02: Algumas espécies coletadas e identificadas (Da esquerda para direita - <i>Aequidens pallidus</i> , <i>Ammocryptocharax elegans</i> , <i>Apistogramma erythrura</i> , <i>Hyphessobrycon agulha</i> , <i>Mastiglanis asopos</i> , <i>Hemigrammus pretoensis</i>).....	24

LISTA DE SIGLAS

AM – Amazonas

BOLD – *Barcode of Life Data Systems*

COI – Citocromo C Oxidase subunidade I

DNA – Ácido Desoxirribonucleico

FAPEAM – Fundação de Amparo a Pesquisa do Amazonas

GPS – *Global Positioning System*

INPA – Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia

ISB – Instituto de Saúde e Biotecnologia

LEGAL - Laboratório de Evolução e Genética Animal

NCBI – *National Center for Biotechnology Information*

pb – Pares de Bases

PCR – *Polymerase Chain Reaction*

pH – Potencial Hidrogeniônico

PPBio – Programa de Pesquisa em Biodiversidade

RFAD – Reserva Florestal Adolpho Ducke

UFAM – Universidade Federal do Amazonas

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	7
1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	100
1.1 BACIA AMAZÔNICA	100
1.2 ICTIOFAUNA AMAZÔNICA	101
1.3 IGARAPÉS.....	122
1.4 DNA BARCODE.....	133
2. JUSTIFICATIVA	166
3. OBJETIVOS.....	188
3.1 GERAL	18
3.2 ESPECÍFICOS	188
4. MATERIAL E MÉTODOS	199
4.1 ÁREA DE ESTUDO E OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS.....	199
4.2 METODOLOGIA LABORATORIAL.....	200
4.3 ANÁLISE DE DADOS	222
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES	23
CONSIDERAÇÕES FINAIS	26
REFERÊNCIAS.....	2727
CRONOGRAMA.....	32

INTRODUÇÃO

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

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

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

O *DNA Barcode* é um sistema desenhado para prover rapidez, acurácia e a identificação automática de espécies usando regiões curtas e padronizadas de genes como marcador interno das espécies (HEBERT & GREGORY, 2005),

com a eficiência de um 'código de barra', usando como referência um banco público de dados de sequências organizadas.

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

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

O DNA Barcode não pretende substituir a taxonomia tradicional, porém gera um conjunto de dados novos, adicionais e informativos. Os dados do tipo *DNA barcode* também um papel muito importante em outros estudos, além dos relacionados à biodiversidade, podendo ser usados em inventários, estudos ecológicos e evolutivos (VALENTINI, 2009) como, também, em programas de monitoramento e de fiscalização da fauna (HAJIBABAEI et al., 2007), pois proporciona um banco de dados padronizado, eficiente e de ampla aplicação.

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

Existem ainda estudos menos conservadores em que afirmam que a ictiofauna na região é significativamente pouco estimada e incompreendida

(SCHAEFER, 1998). Um dos motivos para se acreditar nesse dado é a presença recorrente de espécies crípticas – espécies morfológicamente iguais, mas geneticamente independentes (FRANKHAM et al., 2002), situação comum em organismos aquáticos (COLATRELLI, 2002).

Tudo isso indica que a biodiversidade da ictiofauna amazônica ainda está pouco compreendida e significativamente subestimada. Isso é marcante nas áreas de igarapés, que são representados por incontáveis canais de água, constituindo a maior e mais densa rede hídrica do mundo (JUNK, 1983; WALKER, 1991; SANTOS & FERREIRA, 1999). Considerados ambientes relativamente pobres em números de espécies, estima-se que num único igarapé podem ocorrer de 20 a 50 espécies de peixes (LOWE-MCCONNELL, 1999; SABINO, 1999), o que reflete a carência de estudos nesse tipo de ecossistema amazônico.

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

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 BACIA AMAZÔNICA

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

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

1.2 ICTIOFAUNA AMAZÔNICA

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

Essa vasta diversidade encontrada nos riachos, rios e lagos está restrita a poucos grupos taxonômicos. O mais importante deles sem dúvida alguma é representado pelos *Ostariophysi*, que incluem os *Cypriniformes*,

Characiformes, *Siluriformes* e *Gymnotiformes*. Das quatro ordens citadas, com exceção dos *Cypriniformes*, as outras três ocorrem naturalmente na região Neotropical e também na Bacia Amazônica (ZUANON et al., 2010). Com base nisso, Junk (1983) relata que várias premissas ecológicas, zoogeográficas e genéticas têm implicação direta na tentativa de explicar a diversidade desta ictiofauna.

Na América do Sul, a bacia amazônica apresenta a maior biodiversidade de espécies de peixes continentais existentes, representando 85% de toda biodiversidade de água doce no continente (FALABELLA, 1994). Além de seus grandes rios e lagos, a bacia amazônica é constituída por incontáveis canais de água, 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 & FERREIRA, 1999).

Estudos sobre distribuição espacial, alimentação e estrutura de comunidades de peixes em pequenos igarapés vêm sendo realizados na região amazônica (RIBEIRO & ZUANON, 2006). O estado atual do conhecimento da diversidade de peixes de água doce na região Neotropical ainda é bastante incipiente, e, de acordo com alguns pesquisadores, cerca de metade ou mais da ictiofauna ainda não foi descrita (ZUANON et al., 2010).

Todas estas observações indicam que a biodiversidade da ictiofauna amazônica ainda está pouco compreendida e significativamente subestimada. Isso é marcante nas áreas de igarapés, que são representados por incontáveis canais de água, constituindo a maior e mais densa rede hídrica do mundo (JUNK, 1983; WALKER, 1991; SANTOS & FERREIRA, 1999). Considerados ambientes relativamente pobres em números de espécies, estima-se que num único igarapé podem ocorrer de 20 a 50 espécies de peixes (LOWE-MCCONNELL, 1999).

1.3 IGARAPÉS

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

Uma característica física dos igarapés é a subida abrupta do nível da água durante a ocorrência de fortes chuvas em suas bacias de drenagem. Nesses eventos meteorológicos extremos o nível da água alcança ou ultrapassa os limites das margens, disponibilizando aos peixes novos recursos alimentares. Em decorrência da redução da luz incidente produzido pela sombra das espécies florestais e a correnteza relativamente acentuada, os igarapés são sistemas aquáticos com baixa produtividade biológica e bastante dependentes da floresta. Esta atua como fonte de recursos alimentares para o sistema lótico, os quais são à base da cadeia trófica nestes ecossistemas (SANTOS & FERREIRA, 1999).

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

Os peixes apresentam grande diversidade morfológica, ocupam uma ampla diversidade de habitats e apresentam uma história evolutiva bastante peculiar. Essas características fazem com que a compreensão da sua sistemática e história evolutiva seja um tema ainda sujeito a muita discussão tornando-os um

excelente material básico nos estudos voltados a questões adaptativas, taxonômicas e evolutivas (RIBEIRO, 2007).

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

A bacia amazônica abriga grande parte dessa fauna “desconhecida” pela ciência, e como salientado por Menezes (1996), uma das principais lacunas é justamente o escasso conhecimento acerca da fauna de peixes de igarapés nas regiões de cabeceiras dos rios amazônicos e áreas pouco exploradas, mais distantes dos centros urbanos regionais (ZUANON et al., 2010).

Sabe-se que diversos estudos têm sido feitos quanto à caracterização físico-químico, à ocupação dos nichos pelas espécies e as mudanças nas diversidades e abundância destas ao longo das estações climáticas da Amazônia (PAZIN, 2006), no entanto nenhum estudo ao nível genético tem sido feito, como, por exemplo, em relação ao perfil e distribuição de variabilidade genética entre os indivíduos de uma espécie.

1.4 DNA BARCODE

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

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

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

Nesse método é utilizado um pequeno fragmento de DNA pode ser usado como um identificador padronizado e único, tal como, um código de barras para identificação de espécies, servindo tanto na identificação de espécies já descritas, como auxiliando na descoberta de novas espécies e em resoluções e ambiguidades taxonômicas. Para animais, o fragmento em questão é uma região de 648 pares de bases, a partir da extremidade 5', do gene mitocondrial do Citocromo C Oxidase subunidade I (COI) (HEBERT et al., 2003).

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

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

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

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

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

2. JUSTIFICATIVA

O Brasil é um dos 17 países mega diversos, contendo mais de 80% de todas as espécies em área menor que 30% do planeta terra. Desse total, grande parte está representada por peixes amazônicos, o que constitui 85% de toda a biodiversidade de água doce no continente sul-americano (FALABELLA, 1994). No entanto, menos da metade (40%) deste grupo de vertebrado amazônico é conhecida (LUNDBERG et al., 2000), necessitando de maiores esforços para sua elucidação, uma vez que conhecer toda sua biodiversidade é um fator crucial para que o Brasil se torne líder na área biotecnológica e de bioprospecção em seu território, permitindo a utilização consciente de seus recursos naturais, como é o caso da bacia amazônica (DINIZ & FERREIRA, 2000).

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

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

Por meio de abordagens genéticas, como a identificação molecular de espécies, como Código de Barras Genético (*DNA Barcode*) e o relacionamento filogenético das espécies componentes, conectado às variáveis ambientais, pode-se obter resultados importantes para o descobrimento da diversidade

biológica e para esclarecimento de processos ambientais e evolutivos atuantes, sobre diversos grupos taxonômicos, de maneira que estas abordagens, se corretamente aplicadas, também podem auxiliar na elucidação de questões mais complexas de um ambiente tão singular quanto o amazônico (Moritz, 1998).

Deste modo, o presente trabalho almejou caracterizar geneticamente as espécies coletadas de peixes em igarapés, ao acessar as informações do gene (COI) do *DNA barcode*, comparando os dados obtidos com os dados preexistentes nos bancos públicos de dados moleculares, contribuindo com dados genéticos inéditos de caracterização molecular e de levantamento de diversidade críptica na ictiofauna amazônica, além de resolver ambiguidades taxonômicas, possibilitando futuros estudos voltados às espécies, populações e comunidades de peixes de igarapés, fazendo parte, como subprojeto, de um projeto maior em desenvolvimento financiado pela FAPEAM intitulado: “Levantamento genético de peixes de igarapé da reserva experimental Adolpho Ducke (Manaus/AM), por meio do *DNA Barcoding*” (021/2011).

Contudo, esta proposta, visa auxiliar o estudo molecular em desenvolvimento nessa reserva, possibilitando desdobramentos futuros de estudos voltados às espécies, comunidades e diversidade de peixes compartilhados entre ambientes de estrutura similar a esses igarapés, como os que margeiam a região da cidade de Coari/AM, que assim como a Reserva Florestal Adolfo Ducke da cidade de Manaus/AM possui, uma unidade experimental e em implementação do PPBio, representado pela área CapMedSol – ISB/UFAM.

2. OBJETIVOS

2.1 GERAL

Esta proposta tem como objetivo geral caracterizar geneticamente a diversidade das espécies de peixes dos igarapés coletados, pertencentes ao sistema de drenagem do rio Amazonas, localizados dentro da reserva do PPBio -Adolpho Ducke (Manaus/AM) de maneira padronizada, seguindo a metodologia do *DNA barcoding* e disponibilizar os dados obtidos, posteriormente, num portal público de referência para que estas possam ser usadas confiavelmente para identificação molecular de espécies de peixes provenientes da região em questão e de outras áreas correlatas, como a unidade PPBio de Coari (em fase de implementação final), aumentando o conteúdo científico dos levantamentos ictiológicos desenvolvidos em sistemas de igarapés, fornecendo, ainda, informações importantes que possibilitem estudos científicos sob aspectos variados de biodiversidade e biotecnológicos, além de fornecer subsídios para o levantamento de diversidade críptica e para identificação molecular de espécies compartilhadas de outras regiões ecologicamente similares.

2.2 ESPECÍFICOS

- Obter os dados de sequência molecular do gene mitocondrial do citocromo C oxidase I dos peixes previamente coletados e identificados da Reserva Adolpho Ducke, através da extração de DNA e sequenciamento deste;
- Identificar molecularmente os indivíduos sequenciados, comparando os dados obtidos com bancos moleculares e genéticos de domínio público *online* como o NCBI e o BOLD system;
- Comparar a identificação molecular com a taxonômica clássica a fim de encontrar espécies crípticas ou conflitos de identificação;

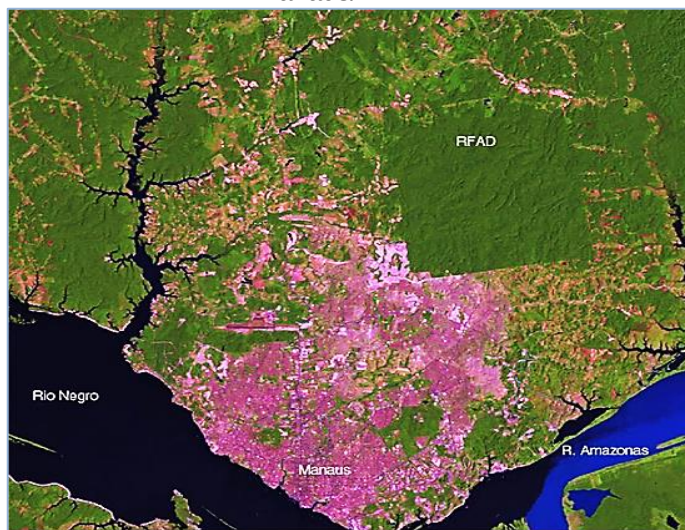
3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 ÁREA DE ESTUDO E OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS

As amostras utilizadas neste estudo já foram coletadas em trabalhos anteriores, sendo provenientes de igarapés da reserva Adolpho Ducke (Manaus/AM) que pertence ao INPA (Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia) e assim como a unidade CAP-MEDSOL, localizada na estrada Coari-Itapéua, a 8 km da sede do município de Coari/AM, que faz parte do programa de monitoramento PPBio.

Essa área está localizada ao noroeste da cidade de Manaus, estando situada na região central da Amazônia em uma área de platô, compreendendo um sistema de cinco sub-bacias de igarapés e 100 km² de floresta tropical úmida de terra firme, recortados por um *grid* composto por subunidades de 1 km² (Figura 01). O sistema de trilhas dá acesso a 38 pontos permanentes de amostragens em igarapés e poças associadas.

Figura 01: Localização da Reserva Florestal Adolpho Ducke (RFAD) próxima à cidade de Manaus/AM



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

Ao longo do eixo norte-sul, os cursos d'água existentes na reserva se dividem em duas bacias hidrográficas maiores, de maneira que os cursos da bacia oeste deságuam em afluentes do rio Negro e da bacia leste deságuam em afluentes do rio Amazonas.

Dos 38 pontos de amostragem permanente, serão amostrados alguns pontos da bacia leste e oeste, estando dispostos em igarapés de 1ª, 2ª e 3ª ordem (Magnusson *et al.*, 2005), com o objetivo de coletar a maior quantidade de espécies diferentes na reserva, que atualmente tem o máximo contabilizado de sessenta e nove espécies registradas para área, com base em catálogos produzidos para a região. Estas amostras, já estão conservadas e identificadas taxonomicamente, sendo este estudo complementar ao trabalho que já vem sendo feito na área de “Filogenia de Comunidades em Igarapés”, que conta com 12 pontos coletados e o PIBIC PIB-B 053/2013 que amostrou sete pontos adicionais.

Ressalta-se que as amostras coletadas para este estudo, foram obtidas por meio da metodologia desenvolvida e aprimorada desde 2001, a partir de estudos realizados pelo Projeto Igarapés na Reserva Florestal Adolpho Ducke, Manaus/AM, utilizando-se de forma ativa redes de cerco, puçás, peneiras e armadilhas (cf. Anjos & Zuanon, 2007), sendo todos os indivíduos identificados e conservados em formol 40%. De cada exemplar coletado, amostras de tecidos foram retiradas e colocadas em álcool 95% e 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 pontos amostrados estão georeferenciados por GPS.

3.2 METODOLOGIA LABORATORIAL

As etapas laboratoriais seguintes foram concentradas nos Laboratórios Temáticos de Genética da Universidade Federal do Amazonas (Laboratório de Biologia Molecular – ISB/UFAM/Coari). Dos tecidos acondicionados em álcool 95%, 60 amostras foram submetidas ao procedimento para obtenção do DNA total, seguindo o protocolo de extração por fenol-clorofórmio, conforme descrito por Sambrook (1989) com modificações, onde a amostra de tecido passou por uma série de fases de exposição a reagentes químicos com a finalidade de eliminar todas as estruturas e moléculas não desejadas, restando somente o DNA (ácido desoxiribonucleíco) isolado e purificado. As amostras resultantes

do procedimento de extração foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 0,8% e ao procedimento de quantificação, visando verificar o sucesso da obtenção do DNA e determinar sua concentração.

Com o material genético extraído foi desenvolvido a reação em cadeia da polimerase, do inglês *Polymerase Chain Reaction* (PCR), que consiste na amplificação, ou no aumento de número de cópias, do segmento do DNA referente à região de interesse, que, neste caso, é um fragmento da subunidade I da citocromo C oxidase mitocondrial, região considerada de BARCODE em peixes.

Para isso, foi utilizado um par de iniciadores (*primers* - modificados por Tomas Hrbek a partir de dados publicados por Ward e colaboradores em 2005) específicos para a região gênica de interesse (subunidade 1 do citocromo C oxidase mitocondrial). O procedimento e as condições gerais da PCR, também seguiram as instruções descritas por Ward e colaboradores em 2005 com algumas modificações. Para confirmar o sucesso da PCR, o produto amplificado passará pelo processo de avaliação em gel de agarose (1%) corado com o intercalante de DNA *GelRed* (*Biotum*).

Após a verificação do sucesso de amplificação, o produto da PCR foi purificado e utilizado na reação de sequenciamento nucleotídico, que é uma reação de PCR modificada com a utilização do Kit de sequenciamento *BigDye* (*Applied Biosystems*), seguindo as especificações do fabricante, sendo todas estas etapas desenvolvidas na unidade de UFAM de Coari (Laboratório de Biologia Molecular). Para a obtenção da sequência nucleotídica final, o DNA amplificado, purificado e submetido à reação de sequenciamento será levado ao um sequenciador automático ABI 3130xl (*Applied Biosystems*), seguindo a metodologia padronizada pelo fabricante, sendo esta etapa executada no sequenciador automático da unidade UFAM de Manaus, contando com colaboradores deste projeto e a parceria do Laboratório de Evolução e Genética Animal – LEGAL. Após o sequenciador automático gerar as sequências nucleotídicas para cada indivíduo coletado, estas foram enviadas por *email* para Coari/AM, onde puderam ser conferidas, alinhadas e editadas manualmente através do programa BioEdit (Hall, 1999).

Com estas sequências, alinhadas e editadas foi originada uma matriz de dados contendo as sequências dos indivíduos de cada espécie amostrada, sendo isto os dados utilizados nos processos analíticos seguintes.

3.3 ANÁLISE DE DADOS

Com as sequências obtidas, foi montado um banco de dados molecular dos indivíduos das espécies coletadas, para que se possa aplicar a metodologia da identificação do *DNAbarcode* e, assim, identificar geneticamente as espécies de peixes coletados, além da montagem de um banco de dados de BARCODE para a ictiofauna de igarapés. Para isso, foi utilizado os recursos de bioinformática como as ferramentas de identificação molecular e de busca disponíveis no portal *Barcode of Life Data Systems* (www.barcodinglife.org) (Ratnasingham e Hebert, 2007) – que faz uma análise de identificação por similaridade genética entre; o fragmento do gene do citocromo C oxidase I sequenciado e o banco de dados desta mesma região disponível *online* neste portal. A identificação obtida pelo DNA barcode foi também comparada com a identificação tradicional feita previamente, com o objetivo de validar tanto a identificação molecular quanto a morfológica e, também, encontrar possíveis espécies crípticas, conflitos de identificação e acessos moleculares indisponíveis no sistema BOLD e, portanto são sequências candidatas a serem depositadas neste banco *online*.

4. RESULTADOSE DISCUSSÃO

Foram coletadas 378 amostras, sendo 173 provenientes dos igarapés do Ipiranga (1ª, 2ª e 3ª ordens), 127 dos igarapés do Tinga (1ª, 2ª e 3ª ordens) e 78 dos igarapés do Uberê (1ª ordem). Entre elas, foram identificados 31 morfotipos diferentes. Foram eles: *Aequidens pallidus*, *Ancistrussp*, *Apistogramma agassizi*, *Apistogramma cf erythrura*, *Apistogramma cf guaporé erythrura*, *Apistogramma regani*, *Bryconops cf caudomaculatus*, *Bryconops giacopini*, *Bryconops sp*, *Copella nigrofasciata*, *Crenicichla sp*, *Crenuchus spirulus*, *Erythrinus erythrinus*, *Gymnotus coropinae*, *Gymnotus pedanopterus*, *Helogenes marmoratus*, *Hemigrammus cf pretoensis*, *Hoplias malabaricus*, *Hypessobrycon aff melazonatus*, *Hypopygus lepturus*, *Mesonauta insignis*, *Microcharacidium ekotrioides*, *Microsternarchus bilineatus*, *Pyrrhulina cf brevis*, *Rineloricaria lanceolata*, *Rivulus micropus*, *Rivulus kirovskyi*, *Rivulus micropus compressus*, *Satanoperca lilith*, *Steatogenys duida* e *Synbranchus sp "reticulata"* (Figura 02).

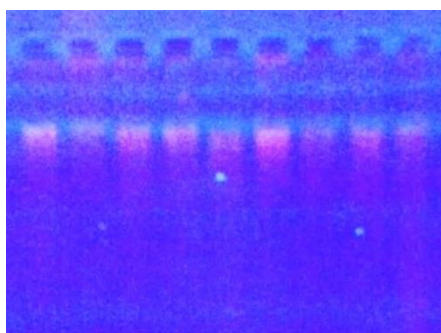
Tais identificações foram realizadas através do auxílio de chaves dicotômicas, literatura especializada e comparação com exemplares depositados em museus e coleções científicas. Todos os exemplares encontram-se identificados e estão em processo de tombamento na Coleção Ictiológica/INPA e os tecidos na Coleção de Tecidos de Genética Animal/UFAM.

Figura 02: Algumas espécies coletadas e identificadas (Da esquerda para direita - *Aequidens pallidus*, *Ammocryptocharax elegans*, *Apistogramma erythrura*, *Hyphessobrycon agulha*, *Mastiglanis asopos*, *Hemigrammus pretoensis*).



Do total de tecidos obtidos, 93 foram submetidos ao processo de extração de DNA. Para confirmar a extração foi feita uma eletroforese dos DNAs obtidos. Como resultado, todas mostraram resultado positivo no processo de extração, quando verificadas por eletroforese (Figura 03).

Figura 03: Eletroforese em gel de agarose a 0,8% demonstrando fragmentos genômicos do DNA extraído.



A partir do resultado positivo, as amostras de DNA foram levadas ao procedimento de quantificação e determinação da concentração do DNA obtido, sendo seus respectivos dados tabulados. Os DNAs resultantes foram submetidos ao processo de amplificação do gene COI por PCR, que foi confirmada por processo de eletroforese.

O fragmento, do gene COI gerado, possui no seu total 587 pares de base, sendo 277pb conservados e 310 pb variáveis, dos quais 257pb foram parcimoniosamente informativos.

As amostras que foram amplificadas com sucesso foram direcionadas ao processo de sequenciamento, que depois foram levadas ao processo de identificação genético molecular no BOLD system.

Até este momento, vinte e cinco morfotipos, anteriormente identificados por morfologia, representando as 93 amostras de DNA, foram sequenciados e identificados molecularmente, quando submetidas à identificação molecular no sistema de dados de BARCODE – BOLD system e também ao NCBI, resultando nas seguintes identificações moleculares (Anexo I). De acordo com as comparações das 93 sequências obtidas dos vinte e cinco morfotipos com o

banco de dados BOLD system e NCBI foi possível resgatar doze morfotipos ao nível espécie, onze ao nível gênero, quatro resultaram em acessos inexistentes tanto ao nível de gênero e espécie. Do total foi possível verificar que sete espécies/morfotipos (28% do total) coletados são candidatas a registros inéditos nos sistemas de dados utilizados (Anexo I).

Embora o fragmento gerado não seja o padronizado pela técnica (648pb), este se mostrou um comprimento satisfatório para este trabalho. Dos haplótipos obtidos, sete (*Aequidens pallidus*, *Apistogramma erythrura*, *Bryconops inpai*, *Hemigrammus pretoensis*, *Hyphessobrycon melazonatus*, *Hyphessobrycon agulha*, *Mastiglanis asopos*,) podem ser consideradas como registros inéditos moleculares de espécie.

Mesmo coincidindo as identificações morfológicas e moleculares de doze espécies coletadas, somente cinco grupos de haplótipos alcançaram o nível de similaridade de 100% com o banco de dados. Tal fato pode indicar três explicações possíveis, dependendo do caso: 1- a qualidade do banco de dados de alguns acessos depositados, o que resulta em similaridades muito baixas para comparações intraespecíficas e podem deixar dúvidas em relação aos resultados de identificação dos sistemas de comparação utilizados; 2- a identificação morfológica efetuada; 3- a existência de alta diversidade genética intraespecífica, que acaba refletindo na variação haplotípica observada, sendo estes haplótipos registros de variação genética desconhecida na espécie e característica de região estudada (HEBERT et al., 2003). Esta última observação nos indica que a metodologia do *DNA Barcode* é mais de que um simples sistema de identificação taxonômica, mas também uma ferramenta para elucidar o entendimento evolutivo e genético de das espécies e das respectivas distribuições da diversidade genética ao nível populacional, assim como na identificação de fenômenos evolutivos de diversificação da vida.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os dados observados neste trabalho puderam validar a maioria das informações feitas morfologicamente *a priori*, evidenciando novas espécies candidatas e inéditas no portal BOLD e também possibilitando o acesso e variabilidade genética regional das espécies estudadas. Isso mostra que esta abordagem molecular mais moderna de identificação pode ser utilizada com segurança por não especialistas, no entanto, não descarta a importância de métodos mais tradicionais, tendo um caráter complementar, mas pode ser uma boa alternativa de validação taxonômica, ainda mais para grupos pouco conhecidos e difícil identificação, como é o caso da ictiofauna de Igarapé, que teve 28% das espécies sequenciadas inexistentes nos bancos estudados. O marcador genético utilizado neste estudo, mesmo não tendo o tamanho padronizado pela técnica, apresentou um tamanho satisfatório, nos dando uma boa qualidade de sequenciamento, cobertura e resolução. Portanto, conclui-se que o *DNA Barcode* é uma ferramenta muito útil na identificação rápida e mais independente de uma mão de obra especializada em determinados grupos taxonômicos, provando sua eficácia em peixes para identificação taxonômica através de dados moleculares, contribuindo para elucidação da biodiversidade da ictiofauna de ambientes pouco explorados como os Igarapés, possibilitando o acesso à diversidade genética entre e dentro de espécies e ao estudo de padrões evolutivos, muitas vezes inacessíveis por outros tipos de abordagem. Futuramente todas estas sequências serão depositadas no sistema BOLD, servindo de referência pública de identificação molecular da ictiofauna de Igarapés.

Obs: O presente trabalho, aqui desenvolvido, teve seus dados parcialmente apresentados no Congresso Colombiano de Ictiologia em Junho de 2015, por meio do trabalho de título “Identificação Molecular da ictiofauna de Igarapés da reserva florestal Adolpho Ducke – Manaus/AM” em apresentação oral e pôster.

REFERÊNCIAS

- ANJOS, M. B.; ZUANON, J. **Sampling effort and fish species richness in small terra-firme forest streams of central Amazonia, Brazil**. *Neotropical Ichthyology*, v. 5, p. 45-52, 2007.
- BORISENKO, A. V. et al. **DNA barcoding in surveys of small mammal communities: a field study in Suriname**. *Molecular Ecology Resources*, v. 8, n. 3, p. 471-479, 2008.
- CARVALHO, M. R. D. et al. **Taxonomic impediment or impediment to taxonomy? A commentary on systematics and the cybertaxonomic automation paradigm**. *Evolutionary Biology*, v. 31, n. 1, p. 140-143, 2007.
- CLARE, E. L. **DNA barcoding of Neotropical bats: species identification and discovery within Guyana**. *Molecular Ecology Notes*, v. 7, n.2, p. 184-190, 2007.
- 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.
- COLATRELI, O. P.; MELICIANO, N.V.; TOFFOLI, D.R.; FARIAS, I.P.; HRBEK, T. **Deep phylogenetic divergence and lack of taxonomic concordance in species of *Astronotus* (Cichlidae)**. *International Journal of Evolutionary Biology*. v. 2012, p. 1-8. 2012
- DAYRAT, B. **Towards integrative taxonomy**. *Biol. J. Linn. Soc*, v. 85, p. 407–415, 2005.
- DIAS, M. S.; MAGNUSSON, W. E.; ZUANON, J. **Effects of Reduced-Impact Logging on Fish Assemblages in Central Amazonia**. *Conservation Biology*, v. 24, p. 278-289, 2010.
- DINIZ, M. F.; FERREIRA, L. M. **Bancos Genéticos de Plantas, Animais e Microrganismos**. *Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento*, v.13, 2000.
- EBACH, M. C.; HOLDREGE, C. **More taxonomy, not DNA barcoding**. *Bioscience*, v. 55, n. 10, p. 822-823, 2005.
- FALABELLA, P. G. R. **A Pesca no Amazonas: Problemas e Soluções**. *Imprensa Oficial do Estado Amazonas*, Manaus. 1994.
- FARIAS, I.P., HRBEK, T. **Patterns of diversification in the discus fishes (*Symphysodon* spp. Cichlidae) of the Amazon basin**. *Mol. Phylogenet. Evol.* 49, 32-43. 2008
- FELSENSTEIN, J. **Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap**. *Evolution* v. 39, p. 783-791, 1985.

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

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

GREENSTONE, M. H. et al. **Barcoding generalist predators by polymerase chain reaction: carabids and spiders**. *Mol. Ecol*, v. 14, p. 3247– 3266, 2005.

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

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

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

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

Hebert, P.D.N., Cywinska, A., Ball, S.L., deWaard, J.R. **Biological identifications through DNA barcodes**. *Proc. R. Soc. London B.* v. 270, p. 313-321, 2003.

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

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

Hrbek, T.; Küçük, F.; Frickey, T.; Stölting, K.N.; Wildekamp, R.H.; Meyer, A.. Molecular **phylogeny and historical biogeography of the *Aphanius* (Pisces, Cyprinodontiformes) species complex of central Anatolia, Turkey**. *Mol. Phylogenet. Evol.* v. 25, p. 125-137, 2002.

Hrbek, T.; Wildekamp, R.H. **Description of a new *Aphanius* species (Pisces; Cyprinodontiformes) from the Sakarya River basin in the western part of the central Anatolian plain, Turkey**. *Ichthyol. Explor. Freshwaters* v. 14, p. 137-144, 2003.

Hrbek, T.; Deus, C.P.d.; Farias, I.P.. ***Rivulus duckensis* (Teleostei; Cyprinodontiformes): New species from the Tarumã basin of Manaus, Amazonas, Brazil, and its relationship to other Neotropical Rivulidae**. *Copeia*. p. 569-576. 2004.

Hrbek, T.; Stölting, K.N.; Bardakçi, F.; Küçük, F.; Wildekamp, R.H.; Meyer, A. **Plate tectonics and biogeographical patterns of the *Pseudophoxinus* (Pisces: Cypriniformes) species complex of central Anatolia, Turkey.***Mol. Phylogenet. Evol.* v. 32, p. 297-308, 2004.

Hrbek, T.; Taphorn, D.C.; Thomerson, J.E. **Molecular phylogeny of *Austrofundulus* Myers (Cyprinodontiformes: Rivulidae), with revision of the genus and the description of four new species.***Zootaxa*, p. 1-39, 2005.

Hrbek, T.; Keivany, Y.; Coad, B.W. **New species of *Aphanius* (Teleostei, Cyprinodontidae) from Isfahan province of Iran and a reanalysis of other Iranian species.***Copeia*. p. 244-255, 2006.

Hrbek, T., Taphorn B., D.C.; Thomerson, J.E. **Two new species of *Rivulus* (Cyprinodontiformes: Rivulidae) from the Amazonas state of Venezuela.***Zootaxa in review*, 2010.

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

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

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

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

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

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

MENDONÇA, F. et al. Peixes. In: OLIVEIRA, M. L.;BACCARO, F. B., *et al* (Ed.). **A reserva Ducke: A biodiversidade amazônica através de uma grade.** Manaus, Am, Brasil: Áttema Design Editorial, 2008.

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

ORTIZ, M. F. **Validação do conceito do DNA barcode como indentificador de espécies biológicas: um estudo de case no gênero *Pseudoplatystoma*.** 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 134, 2010.

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

ROCK, J. et al. **DNA barcodes of fish of the Scotia Sea, Antarctica indicate priority groups for taxonomic and systematics focus.** *Antarctic Science*, v. 20, n. 3, p. 253–262, 2008.

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

SABINO, J. **Comportamento de peixes em riachos: métodos de estudo para uma abordagem naturalística.** In: CARAMASCHI, E. P.; MAZZONI, R., et al (Ed.). **Ecologia de Peixes de Riachos.** Rio de Janeiro, Brasil: Programa de Pós-graduação em Ecologia – Universidade Federal do Rio de Janeiro, v.6, (Série Oecologia Brasiliensis). 1999.

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

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

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

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

SCHNEIDER, C., GROSS, M.C., TEREDECIO, M.L., Porto, J.I.R. **Cryptic diversity revealed in mtDNA of the ornamental fish, *Carnegiella strigata*, from the central Amazon.** *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* Submitted, 2010.

SOUZA, E.R. **Filogeografia do gênero neotropical *Fluviphylax* (Cyprinodontiformes: Poeciliidae) das bacias do Amazonas e do Orinoco.** Dissertação de mestrado: Genética, Conservação e Biologia Evolutiva. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA) and Universidade Federal do Amazonas (UFAM), Manaus, AM, Brazil, p. 106. 2008.

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

TEREDECIO, M.L., SCHNEIDER, C., PORTO, J.I.R. **Molecular signature of the d-loop in the pencilfish *Nannostomus eques* (Characiformes,**

Lebiasinidae) revealing at least two evolutionary units in the Negro River basin, Brazil. Anim. Conserv. submitted. 2010.

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

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

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

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

Webb, C. O.; Ackerly, D. D.; McPeck, M. A.; Donoghue, M. J. **Phylogenies and community ecology.** *Annu. Rev. Ecol. Syst.*, v. 33, p. 475–505, 2002.

Cronograma de Atividades

Nº	Descrição	Jan 2015	Fev 2015	Mar 2015	Abr 2015	Mai 2015	Jun 2015
1	Procedimentos laboratoriais genéticos – extração, amplificação, verificação, purificação e sequenciamento	X	X	X	X	X	
2	Sequenciamento automático		X	X	X	X	
3	Alinhamento e edição das sequências obtidas via <i>on line</i>			X	X	X	
4	Comparações e checagem com bancos públicos de taxonomia molecular via <i>on line</i>		X	X	X	X	X
5	Preparo da Apresentação para o Congresso					X	X
6	- Elaboração do Resumo e Relatório Final (atividade obrigatória)					X	X
7	- Preparo da Apresentação (atividade obrigatória)					X	X
8	Levantamento Bibliográfico	X	X	X	X	X	

Anexo I: Identificações moleculares das 93 amostras (25 morfotipos) encontradas no BOLD e NCBI (similaridade verde - ao nível de espécie; azul – ao nível de gênero; branco – sem similaridade), o asterisco representa registros inéditos no banco dados analisados.

Número de amostra	Identificação Morfológica	SIMILARIDADE
OPC 119	<i>Aequidens pallidus</i> *	BOLD: 100% <i>Aequidens</i> sp. NCBI: 91% <i>Aequidens diadema</i>
OPC 120	<i>Aequidens pallidus</i> *	BOLD: 100% <i>Aequidens</i> sp. NCBI: 91% <i>Aequidens diadema</i>
OPC 213	<i>Aequidens pallidus</i> *	BOLD: 100% <i>Aequidens</i> sp. NCBI: 91% <i>Aequidens diadema</i>
OPC 252	<i>Aequidens pallidus</i> *	BOLD: 100% <i>Aequidens</i> sp. NCBI: 91% <i>Aequidens diadema</i>
OPC 253	<i>Aequidens pallidus</i> *	BOLD: 100% <i>Aequidens</i> sp. NCBI: 91% <i>Aequidens diadema</i>
OPC 328	<i>Aequidens pallidus</i> *	BOLD: 100% <i>Aequidens</i> sp. NCBI: 91% <i>Aequidens diadema</i>
OPC 328	<i>Aequidens</i> sp.	BOLD/NCBI: 91% <i>Aequidens diadema</i>
OPC 419	<i>Aequidens</i> sp.	BOLD/NCBI: 91% <i>Aequidens diadema</i>
OPC 473	<i>Aequidens</i> sp.	BOLD/NCBI: 91% <i>Aequidens diadema</i>
OPC 407	<i>Ammocryptocharax elegans</i>	BOLD: 85, 13% <i>Characidium</i> NCBI: 85% <i>Characidium</i> sp. e 85% <i>Ammocryptocharax elegans</i>
OPC 375	<i>Apistogramma erythrura</i> *	BOLD: 89, 69% <i>Apistogramma</i> sp. NCBI: 87% <i>Apistogramma bitaeniata</i>
OPC 376	<i>Apistogramma erythrura</i> *	BOLD: 89, 69% <i>Apistogramma</i> sp. NCBI: 87% <i>Apistogramma bitaeniata</i>
OPC 377	<i>Apistogramma erythrura</i> *	BOLD: 89, 69% <i>Apistogramma</i> sp. NCBI: 87% <i>Apistogramma bitaeniata</i>
OPC 378	<i>Apistogramma erythrura</i> *	BOLD: 89, 69% <i>Apistogramma</i> sp. NCBI: 87% <i>Apistogramma bitaeniata</i>
OPC 243	<i>Bryconops giacopinii</i>	BOLD: 100% <i>Bryconops giacopinii</i> NCBI: 88% <i>Bryconops affinis</i>
OPC 245	<i>Bryconops giacopinii</i>	BOLD: 99.83% <i>Bryconops giacopinii</i> NCBI: 88% <i>Bryconops affinis</i>
OPC 453	<i>Bryconops giacopinii</i>	BOLD: 100% <i>Bryconops giacopinii</i> NCBI: 88% <i>Bryconops affinis</i>
OPC 454	<i>Bryconops giacopinii</i>	BOLD: 100% <i>Bryconops giacopinii</i> NCBI: 88% <i>Bryconops affinis</i>
OPC 001	<i>Bryconops giacopinii</i>	BOLD/NCBI: 88% <i>Bryconops affinis</i>
OPC 002	<i>Bryconops giacopinii</i>	BOLD/NCBI: 88% <i>Bryconops affinis</i>
OPC 003	<i>Bryconops giacopinii</i>	BOLD/NCBI: 88% <i>Bryconops affinis</i>
OPC 313	<i>Bryconops inpai</i> *	BOLD: 98.56% <i>Astyanax</i> sp. e 89.76% <i>Bryconops</i> sp. e 89.76% <i>Bryconops affinis</i> NCBI: 90% <i>Bryconops affinis</i>
OPC 341	<i>Bryconops inpai</i> *	BOLD: 98.56% <i>Astyanax</i> sp. e 89.76% <i>Bryconops</i> sp. e 89.76% <i>Bryconops affinis</i> NCBI: 90% <i>Bryconops affinis</i>
OPC 415	<i>Bunocephalus verrucosus</i>	BOLD: 91,28% <i>Bunocephalus verrucosus</i> NCBI: 100% <i>Bunocephalus coracoideus</i>
OPC 395	<i>Callichthys callichthys</i>	BOLD: 97.61% <i>Callichthys callichthys</i> NCBI: 94% <i>Callichthys callichthys</i>
OPC 156	<i>Crenicichla</i> sp.	BOLD: 99,66% <i>Crenicichla alta</i> NCBI: 99% <i>Crenicichla alta</i>
OPC 322	<i>Crenicichla</i> sp.	BOLD: 99,66% <i>Crenicichla alta</i> BLAST (NCBI): 99% <i>Crenicichla alta</i>
OPC 323	<i>Crenicichla</i> sp.	BOLD: 99,66% <i>Crenicichla alta</i> BLAST (NCBI): 99% <i>Crenicichla alta</i>

OPC 084	<i>Crenuchus spilurus</i>	BOLD: 100% <i>Crenuchus spilurus</i> NCBI: 88% <i>Crenuchus spilurus</i>
OPC 085	<i>Crenuchus spilurus</i>	BOLD: 99, 83% <i>Crenuchus spilurus</i> NCBI: 85% <i>Crenuchus</i> sp.
OPC 220	<i>Crenuchus spilurus</i>	BOLD: 100% <i>Crenuchus spilurus</i> NCBI: 88% <i>Crenuchus spilurus</i>
OPC 221	<i>Crenuchus spilurus</i>	BOLD: 100% <i>Crenuchus spilurus</i> NCBI: 88% <i>Crenuchus spilurus</i>
OPC 261	<i>Crenuchus spilurus</i>	BOLD: 99.48% <i>Crenuchus spilurus</i> NCBI: 87% <i>Crenuchus spilurus</i>
OPC 272	<i>Crenuchus spilurus</i>	BOLD: 100% <i>Crenuchus spilurus</i> NCBI: 88% <i>Crenuchus spilurus</i>
OPC 274	<i>Crenuchus spilurus</i>	BOLD: 100% <i>Crenuchus spilurus</i> NCBI: 88% <i>Crenuchus spilurus</i>
OPC 302	<i>Crenuchus spilurus</i>	BOLD: 100% <i>Crenuchus spilurus</i> NCBI: 88% <i>Crenuchus spilurus</i>
OPC 303	<i>Crenuchus spilurus</i>	BOLD: 100% <i>Crenuchus spilurus</i> NCBI: 88% <i>Crenuchus spilurus</i>
OPC 272	<i>Crenuchus spilurus</i>	88% <i>Crenuchus spilurus</i>
OPC 304	<i>Crenuchus spilurus</i>	88% <i>Crenuchus spilurus</i>
OPC 306	<i>Crenuchus spilurus</i>	88% <i>Crenuchus spilurus</i>
OPC 263	<i>Erythrinus erythrinus</i>	BOLD: 97,08% <i>Erythrinus erythrinus</i> BLAST (NCBI): 97% <i>Erythrinus erythrinus</i>
OPC 393	<i>Erythrinus erythrinus</i>	BOLD: 97,08% <i>Erythrinus erythrinus</i> BLAST (NCBI): 97% <i>Erythrinus erythrinus</i>
OPC 394	<i>Erythrinus erythrinus</i>	97% <i>Erythrinus erythrinus</i>
OPC 397	<i>Gymnorhamphichthys petiti</i>	BOLD: 88,34% <i>Gymnorhamphichthys petiti</i> NCBI: 89% <i>Gymnorhamphichthys</i> sp.
OPC 398	<i>Gymnorhamphichthys petiti</i>	BOLD: 88,34% <i>Gymnorhamphichthys petiti</i> NCBI: 89% <i>Gymnorhamphichthys</i> sp.
OPC 268	<i>Helogenes marmoratus</i>	BOLD: 99.83% <i>Helogenes marmoratus</i> NCBI: 99.83% <i>Helogenes marmoratus</i>
OPC 269	<i>Helogenes marmoratus</i>	BOLD: 100% <i>Helogenes marmoratus</i> NCBI: 86% <i>Helogenes marmoratus</i>
OPC 405	<i>Helogenes marmoratus</i>	BOLD: 84,8% <i>Helogenes marmoratus</i> NCBI: 84% <i>Loricaria lentiginosa</i>
OPC 406	<i>Helogenes marmoratus</i>	BOLD: 84,8% <i>Helogenes marmoratus</i> NCBI: 84% <i>Loricaria lentiginosa</i>
OPC 111	<i>Helogenes marmoratus</i>	86% <i>Helogenes marmoratus</i>
OPC 268	<i>Helogenes marmoratus</i>	86% <i>Helogenes marmoratus</i>
OPC 269	<i>Helogenes marmoratus</i>	86% <i>Helogenes marmoratus</i>
OPC 072	<i>Hemigrammus pretoensis</i> *	BOLD: 90, 77% <i>Moenkhausia diktyota</i> ; NCBI: 84% <i>Hyphessobrycon uruguayensis</i> e 83% <i>Hemigrammus cf. gracilis</i>
OPC 073	<i>Hemigrammus pretoensis</i> *	BOLD: 90, 77% <i>Moenkhausia diktyota</i> ; NCBI: 84% <i>Hyphessobrycon uruguayensis</i> e 83% <i>Hemigrammus cf. gracilis</i>
OPC 346	<i>Hemigrammus pretoensis</i> *	BOLD: 90, 77% <i>Moenkhausia diktyota</i> ; NCBI: 84% <i>Hyphessobrycon uruguayensis</i> e 83% <i>Hemigrammus cf. gracilis</i>
OPC 347	<i>Hemigrammus pretoensis</i> *	BOLD: 90, 77% <i>Moenkhausia diktyota</i> ; NCBI: 84% <i>Hyphessobrycon uruguayensis</i> e 83% <i>Hemigrammus cf. gracilis</i>
OPC 098	<i>Heros severus</i>	BOLD: 99.66% <i>Heros efasciatus</i> e 99.66% <i>Heros severus</i> NCBI: 99% <i>Heros severus</i>
OPC 190	<i>Heros severus</i>	BOLD: 99.66% <i>Heros efasciatus</i> e 99.66% <i>Heros severus</i> NCBI: 99% <i>Heros severus</i>

OPC 130	<i>Hoplias malabaricus</i>	BOLD: 99,65% <i>Hoplias malabaricus</i> BLAST (NCBI): 99% <i>Hoplias malabaricus</i>
OPC 206	<i>Hoplias malabaricus</i>	BOLD: 99,65% <i>Hoplias malabaricus</i> BLAST (NCBI): 99% <i>Hoplias malabaricus</i>
OPC 236	<i>Hoplias malabaricus</i>	BOLD: 99,65% <i>Hoplias malabaricus</i> BLAST (NCBI): 99% <i>Hoplias malabaricus</i>
OPC 411	<i>Hyphessobrycon agulha*</i>	BOLD: 88,14% <i>Hyphessobrycon loretoensis</i> e 87,63% <i>Hyphessobrycon</i> sp. NCBI: 88% <i>Hyphessobrycon herbertaxelrodi</i>
OPC 412	<i>Hyphessobrycon agulha*</i>	BOLD: 88,14% <i>Hyphessobrycon loretoensis</i> e 87,63% <i>Hyphessobrycon</i> sp. NCBI: 88% <i>Hyphessobrycon herbertaxelrodi</i>
OPC 427	<i>Hyphessobrycon agulha*</i>	BOLD: 88,14% <i>Hyphessobrycon loretoensis</i> NCBI: 85% <i>Hyphessobrycon herbertaxelrodi</i>
OPC 434	<i>Hyphessobrycon agulha*</i>	BOLD: 88,14% <i>Hyphessobrycon loretoensis</i> NCBI: 85% <i>Hyphessobrycon herbertaxelrodi</i>
OPC 437	<i>Hyphessobrycon agulha*</i>	BOLD: 88,14% <i>Hyphessobrycon loretoensis</i> NCBI: 85% <i>Hyphessobrycon herbertaxelrodi</i>
OPC 011	<i>Hyphessobrycon melazonatus*</i>	BOLD: 90,6% <i>Hyphessobrycon herbertaxelrodi</i> NCBI: 89% <i>Hyphessobrycon herbertaxelrodi</i>
OPC 012	<i>Hyphessobrycon melazonatus*</i>	BOLD: 90,6% <i>Hyphessobrycon herbertaxelrodi</i> NCBI: 89% <i>Hyphessobrycon herbertaxelrodi</i>
OPC 409	<i>Hyphessobrycon melazonatus*</i>	BOLD: 89,69% <i>Hyphessobrycon</i> sp. NCBI: 88% <i>Hyphessobrycon herbertaxelrodi</i>
OPC 410	<i>Hyphessobrycon melazonatus*</i>	BOLD: 89,69% <i>Hyphessobrycon</i> sp. NCBI: 88% <i>Hyphessobrycon herbertaxelrodi</i>
OPC 424	<i>Mastiglanis asopos*</i>	BOLD: 85,48% <i>Pseudocorynopoma doriae</i> e 84,46% <i>Chrysichthys dendrophorus</i> NCBI: 85% <i>Chrysichthys brachynema</i>
OPC 172	<i>Mesonauta</i> sp.	94% <i>Mesonauta festivus</i>
OPC 173	<i>Mesonauta</i> sp.	94% <i>Mesonauta festivus</i>
OPC 174	<i>Mesonauta</i> sp.	94% <i>Mesonauta festivus</i>
OPC 017	<i>Pyrrhulina brevis</i>	BOLD: 100% <i>Pyrrhulina brevis</i> NCBI: 94% <i>Pyrrhulina australis</i>
OPC 018	<i>Pyrrhulina brevis</i>	BOLD: 100% <i>Pyrrhulina brevis</i> NCBI: 94% <i>Pyrrhulina australis</i>
OPC 019	<i>Pyrrhulina brevis</i>	BOLD: 100% <i>Pyrrhulina brevis</i> NCBI: 94% <i>Pyrrhulina australis</i>
OPC 264	<i>Pyrrhulina brevis</i>	BOLD: 100% <i>Pyrrhulina brevis</i> NCBI: 94% <i>Pyrrhulina australis</i>
OPC 326	<i>Pyrrhulina brevis</i>	BOLD: 100% <i>Pyrrhulina brevis</i> NCBI: 94% <i>Pyrrhulina australis</i>
OPC 359	<i>Pyrrhulina brevis</i>	BOLD: 99.83% <i>Pyrrhulina brevis</i> NCBI: 94% <i>Pyrrhulina australis</i>
OPC 362	<i>Pyrrhulina brevis</i>	BOLD: 99.83% <i>Pyrrhulina brevis</i> NCBI: 94% <i>Pyrrhulina australis</i>
OPC 363	<i>Pyrrhulina brevis</i>	BOLD: 99.83% <i>Pyrrhulina brevis</i> NCBI: 94% <i>Pyrrhulina australis</i>
OPC 422	<i>Pyrrhulina brevis</i>	BOLD: 99.83% <i>Pyrrhulina brevis</i> NCBI: 94% <i>Pyrrhulina australis</i>
OPC 216	<i>Pyrrhulina brevis</i>	94% <i>Pyrrhulina australis</i>
OPC 217	<i>Pyrrhulina brevis</i>	94% <i>Pyrrhulina australis</i>
OPC 218	<i>Pyrrhulina brevis</i>	94% <i>Pyrrhulina australis</i>
OPC 319	<i>Rineloricaria heteroptera</i>	BOLD: 100% <i>Rineloricaria lanceolata</i> e 95.35% <i>Rineloricaria heteroptera</i> NCBI: 89% <i>Rineloricaria latirostris</i>
OPC 317	<i>Rineloricaria</i>	BOLD: 100% <i>Rineloricaria lanceolata</i> e 95.35%

	<i>heteroptera</i>	<i>Rineloricaria heteroptera</i> NCBI: 89% <i>Rineloricaria latirostris</i>
OPC 317	<i>Rineloricaria lanceolata</i>	89% <i>Rineloricaria latirostris</i>
OPC 319	<i>Rineloricaria lanceolata</i>	89% <i>Rineloricaria latirostris</i>
OPC 082	<i>Satanoperca lillith</i>	BOLD: 100% <i>Heros efasciatus</i> e 100% <i>Satanoperca lillith</i> BLAST (NCBI): 99% <i>Heros efasciatus</i>
OPC 083	<i>Satanoperca lillith</i>	BOLD: 99,83% <i>Heros efasciatus</i> e 99,83% <i>Satanoperca lillith</i> BLAST (NCBI): 99% <i>Heros efasciatus</i>
OPC 457	<i>Synbranchus sp. "reticulada"</i>	BOLD: 94,85% <i>Synbranchus marmoratus</i> NCBI: 95% <i>Synbranchus marmoratus</i>