



UNIVERSIDADE FEDERAL DO OESTE DO PARÁ
PRO-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO E INOVAÇÃO TECNOLÓGICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS NATURAIS DA AMAZÔNIA

**ESTUDO DA DIVERSIDADE GENÉTICA EM PEIXES DE
IGARAPÉS DA BACIA DO RIO TAPAJÓS: UMA ABORDAGEM
DE SISTEMÁTICA MOLECULAR UTILIZANDO-SE *DNA*
*BARCODING***

MARCOS PAULO ALHO DE SOUSA

Santarém, Pará
Setembro, 2013

MARCOS PAULO ALHO DE SOUSA

**ESTUDO DA DIVERSIDADE GENÉTICA EM PEIXES DE
IGARAPÉS DA BACIA DO RIO TAPAJÓS: UMA ABORDAGEM
DE SISTEMÁTICA MOLECULAR UTILIZANDO-SE *DNA*
*BARCODING***

DR. LUIS REGINALDO RIBEIRO RODRIGUES

Dissertação apresentada à Universidade Federal do Oeste do Pará – UFOPA, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Ambientais, junto ao Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Recursos Naturais da Amazônia.

Área de concentração: Estudos e manejos de ecossistemas amazônicos

**Santarém, Pará
Setembro, 2013**

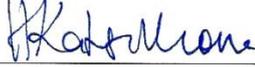
**ESTUDO DA DIVERSIDADE GENÉTICA EM PEIXES DE
IGARAPÉS DA BACIA DO RIO TAPAJÓS: UMA
ABORDAGEM DE SISTEMÁTICA MOLECULAR
UTILIZANDO-SE *DNA BARCODING***

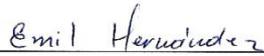
Esta dissertação foi julgada adequada para a obtenção do Título de Mestre em Recursos Naturais da Amazônia, Área de concentração: Estudos e Manejos de Ecossistemas Amazônicos. Aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Recursos Naturais da Amazônia, nível de mestrado, da Universidade Federal do Oeste do Pará – UFOPA, em 27 de Setembro de 2013.


Prof.^o. Dr. Luis Reginaldo Ribeiro Rodrigues (UFOPA)
Coordenador do PGRNA

Apresentada à Comissão Examinadora, integrada pelos Professores:


Prof.^o. Dr. Frank Raynner Vasconcelos Ribeiro (UFOPA)
Examinador 01


Prof.^a. Dra. Honorly Kátia Mestre Correa (UFOPA)
Examinadora 02


Prof.^o. Dr. Emil José Hernandez Ruz (UFPA)
Examinador 03


Prof.^o. Dr. Luis Reginaldo Ribeiro Rodrigues (UFOPA)
Orientador

Santarém, Setembro, 2013.

DEDICATÓRIA

À minha mãe, Nonata Alho, por sua paciência e auxílio nos mais variados momentos, e a meu filho, João Gabriel, por ser uma das maiores motivações para minhas conquistas, amo vocês.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente ao meu Deus que, além de me sustentar e encorajar, me proporcionou a oportunidade de alcançar mais uma vitória em minha vida. Obrigado Senhor.

A minha ‘principal’ família, minha mãe e meu filho, por compartilharem os mais diversos momentos e sentimentos em minha vida, me incentivarem e tornarem essa conquista possível.

A minha ‘segunda’ família, Suélen, Simone, Nazaré, Conceição, Daniel e as duas princesas, Ana e Manú. Obrigado por sempre acolherem a mim ou ao meu filho quando precisamos. Sem vocês as viagens a Manaus nem aconteceriam.

A minha namorada, Izabelli, pelo companheirismo, paciência, ajuda e amor durante a realização deste trabalho.

Ao meu orientador, Professor Luís Reginaldo, por ter aceitado o desafio de me orientar, por ser paciente, pelos ensinamentos, ajuda em coletas, força e correções, muitas vezes, disfarçadas dos necessários e bem vindas ‘puxões de orelha’. Quanto maior o tempo de convivência, maiores são os aprendizados.

Ao Professor Jorge Porto por tornar possível minha ida ao INPA e ao Laboratório Temático de Biologia Molecular (LTBM), além de me receber sem impor dificuldade alguma para tratar sobre tudo o que era relacionado ao projeto.

Aos professores André Canto e Frank Raynner, e ao Cárllison e Rayane, todos da Coleção Ictiológica da UFOPA, pelo grande auxílio na identificação dos peixes e pelas respostas às muitas dúvidas que surgiam.

Ao pessoal do museu de peixes do INPA Renildo, Marcelo, Dr. Lucia, Dr. Jansen e Douglas, pelo auxílio diante das dúvidas com as identificações e pelos mais variados artigos que me forneceram.

À professora Ynglea de Freitas pelo grande auxílio com os apetrechos de pesca.

À professora Sírria Ribeiro pela simpatia e por me permitir cumprir o estágio em sua disciplina.

A toda equipe do LGBio-UFOPA, principalmente à Rúbia, Érika, Thaís, Talita Cunha e Fabíola. Obrigado pelo auxílio em algumas coletas, pelo apoio, amizade e pelos muitos momentos de descontração.

Às meninas do Laboratório de Bioprospecção pelo auxílio na hora das dúvidas e companheirismo nas conversas.

Aos colegas de genética do LTBM no INPA, principalmente à Denise, pela ajuda da fase das extrações ao sequenciamento. Sou muito grato a cada um.

A meus amigos Adyson e Neto pelo auxílio em algumas coletas, as mais descontraídas, com certeza.

Ao seu Beto que garantiu acesso as coletas no igarapé da UDV e ao Miguel que possibilitou acesso as coletas no igarapé São Bráz.

À turma do PGRNA 2011, obrigado pelo tempo que passamos juntos e pelas situações que vivemos. Agradeço ainda à Jacque por dividir os problemas do estágio comigo, rs, e ao Zé Eilton por emprestar a rede de arrasto e pela viagem ao Pimental.

A todos os colegas que em algum momento compartilharam comigo a sala 103 do prédio laranja, com estudos, conversas e desabafos.

À UFOPA e ao Programa de Pós-graduação em Recursos Naturais da Amazônia (PGRNA) pela oportunidade do curso.

Aos professores do programa PGRNA pelos ensinamentos fornecidos.

A CAPES pelo apoio financeiro na modalidade de bolsa de mestrado, sem a qual este trabalho se tornaria muito mais difícil.

Ao Instituto Chico Mendes de Biodiversidade (ICMBio) pela licença concedida para a realização das coletas.

A cada um que por ventura não foi citado aqui, mas que de alguma maneira contribuiu para a realização deste trabalho, muito obrigado.

EPÍGRAFE

“A evolução, como mecanismo, pode e deve ser real. No entanto, não nos diz nada acerca da natureza de seu criador. Para quem acredita em Deus, agora existem motivos para ter mais, e não menos, admiração.”

Francis S. Collins

SOUSA, Marcos Paulo Alho de. **Estudo da diversidade genética em peixes de igarapés da bacia do rio Tapajós: Uma abordagem de sistemática molecular utilizando-se DNA *Barcoding***. 2013. 77 páginas. Dissertação de Mestrado em Recursos Naturais da Amazônia. Área de concentração: Estudos e manejos de Ecossistemas Amazônicos – Programa de Pós-Graduação em Recursos Naturais da Amazônia. Universidade Federal do Oeste do Pará – UFOPA, Santarém, 2013.

RESUMO

A bacia Amazônica apresenta a maior diversidade ictífica do Brasil em seus mais variados ambientes, tais como os igarapés de terra firme, comuns na Amazônia. Em igarapés são encontradas espécies de peixes com alto endemismo e pouco estudadas em relação aos peixes de alto valor comercial. Para caracterização da ictiofauna em tais ambientes o emprego de coletas ativas com a utilização de puçás e redes de arrasto tem alcançado resultados satisfatórios. A ferramenta molecular DNA barcoding é utilizada para a caracterização de espécies em diversos tipos de animais, inclusive em peixes, por meio do uso de um marcador mitocondrial, região Citocromo Oxidase I. O presente trabalho objetivou caracterizar a ictiofauna de 4 igarapés de terra firme de 1ª ou 2ª ordens da região de Santarém por meio do emprego da coleta ativa em trechos de 50 metros de cada igarapé e identificação tradicional e molecular dos espécimes coletados. De um total de 836 peixes coletados alcançou-se um total de 20 diferentes espécies, distribuídos em 20 gêneros, 14 famílias e 6 ordens em 3 destes igarapés, com a predominância de Characiformes, Siluriformes e Gymnotiformes, respectivamente. Ainda, por meio da utilização da técnica de *DNA barcoding*, 69 sequências de 12 diferentes espécies foram obtidas nos ambientes analisados, ocorrendo 75% de consenso entre a identificação tradicional e a molecular, ocorrendo divergência intraespecífica superior ao limiar de 3,5%, adotado como delimitador de espécies no *barcoding*, em *Bryconops giacopinii*, *Hypessobrycon heterorhabdus* e *Aequidens tetramerus*, sugerindo novas análises nesses grupos para haver consenso em relação a se caracterizarem como mais de uma espécie.

Palavras-chave: bacia amazônica, igarapés, peixes, DNA *barcoding*.

SOUSA, Marcos Paulo Alho de. **Estudo da diversidade genética em peixes de igarapés da bacia do rio Tapajós: Uma abordagem de sistemática molecular utilizando-se DNA *Barcoding***. 2013. 77 páginas. Dissertação de Mestrado em Recursos Naturais da Amazônia. Área de concentração: Estudos e manejos de Ecossistemas Amazônicos – Programa de Pós-Graduação em Recursos Naturais da Amazônia. Universidade Federal do Oeste do Pará – UFOPA, Santarém, 2013.

ABSTRACT

The Amazon basin has the greatest diversity of fishes of Brazil in its various environments, such as lowland forest streams, common in the Amazon. Streams are found in fish species with high endemism and little studied in relation to fish of high commercial value. For characterization of fish populations in such environments the use of active sampling with the use of hand nets and seine nets has achieved satisfactory results. The DNA barcoding molecular tool is used to characterize species in various types of animals, including fish, through the use of a mitochondrial marker region I. Cytochrome oxidase The present study aimed to characterize the fish fauna of four streams upland 1st or 2nd orders in the Santarém region through the use of active collecting in stretches 50 feet each stream and traditional and molecular identification of the collected specimens. A total of 836 fish collected reached a total of 20 different species, belonging to 20 genera, 14 families and 6 orders in these three streams, with the predominance of Characiformes, Siluriformes and Gymnotiformes, respectively. Further, by using the technique of DNA barcoding, 69 12 different sequences were obtained from species analyzed environments, occurring 75% of consensus between the traditional identification and molecular intraspecific divergence occurring above the threshold of 3.5%, which was adopted as delimiter in species barcoding in *Bryconops giacopinii*, *Hypessobrycon heterorhabdus* and *Aequidens tetramerus*, suggesting new analyzes in these groups to be no consensus on whether there is only one specie.

Keywords: Amazon basin, streams, fish, DNA barcoding.

SUMÁRIO

RESUMO.....	viii
ABSTRACT.....	ix
1. INTRODUÇÃO GERAL.....	1
1.1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
1.1.1 A bacia amazônica e seus aspectos da ictiofauna.....	3
1.1.2 Igarapés de terra firme na Amazônia e sua comunidade de peixes.....	5
1.1.3 Estudos genéticos aplicados à sistemática e conservação.....	8
1.1.4 <i>DNA barcoding</i> e a identificação molecular de espécies.....	10
1.2 OBJETIVOS	16
1.2.1 Objetivo geral	16
1.2.2 Objetivos específicos	16
CAPÍTULO I	17
CAPÍTULO II	37
2 SÍNTESE INTEGRADORA	53
3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	54
ANEXOS	61

1 INTRODUÇÃO GERAL

Uma diversidade de corpos d'água, não somente grandes rios e lagos, mas também inúmeros pequenos riachos, córregos, várzeas alagadas e igapós formam a maior bacia hidrográfica existente em todo o mundo, a bacia Amazônica (Junk, 1983; Sioli, 1985). Esta possui extensão que alcança 7.050.000 km² e vazão de 220.800 m³/s, o que equivale a cerca de 20% de toda água despejada pelos rios nos oceanos do mundo todo (Malabarba *et al.*, 1998; Santos & Ferreira, 1999; Barthem & Fabré, 2004).

A maior diversidade ictíica do Brasil está na bacia Amazônica (Ministério do Meio Ambiente, 2002), são 2.400 espécies de peixes presentes – das 4.500 espécies que ocorrem na região Neotropical –, sendo 2.000 espécies endêmicas a essa bacia (Vari & Malabarba, 1998; Reis *et al.*, 2003). Tal ictiofauna é representada principalmente por membros das ordens Characiformes, Siluriformes e Gymnotiformes, e, em menor número, por 14 outras famílias de diferentes ordens, tais como Cichlidae, Osteoglossidae, Cyprinodontidae e Poecillidae (Roberts, 1972; Bayley & Petrere, 1989).

Os igarapés auxiliam na formação da bacia amazônica e são apontados como um dos principais ambientes aquáticos que ocorrem na floresta amazônica, sendo encontrados tanto em áreas de várzea como em florestas de terra-firme (Junk, 1983; Santos & Ferreira, 1999). Como características comuns, apresentam águas ácidas e altas concentrações de oxigênio dissolvido (Mendonça *et al.*, 2005).

Assim como no canal principal dos grandes rios, as corredeiras e os igarapés sustentam grande biomassa de peixes, explorados pela pesca comercial ou de subsistência (Ministério do Meio Ambiente, 2002). Em igarapés, no entanto, a ictiofauna é composta principalmente por uma abundância de peixes de pequeno porte (15 centímetros ou menos, de comprimento), que apresentam alto grau de endemismo e acabam sendo muito menos estudadas que as espécies de maiores porte e valor comercial (Castro, 1999; Lowe-McConnell, 1999).

Os igarapés de terra-firme, em particular, caracterizam-se por não serem submetidos a pulsos de inundação, mas a chuvas locais com menor amplitude e maior frequência (Junk *et al.*, 1989; Rezende, 2007). Em tais ambientes, a produção primária autóctone é reduzida por conta do sombreamento da área causado pelo denso dossel da vegetação marginal (Anjos & Zuanon 2007; Santos & Ferreira, 1999), sendo sua fauna aquática, então, altamente dependente da matéria orgânica do sistema terrestre que está ao redor dos cursos d'água

(Goulding, 1980; Walker, 1991 *apud* Anjos & Zuanon, 2007; Rezende, 2007; Santos & Ferreira, 1999).

Os estudos sobre igarapés amazônicos ainda são pouco expressivos diante da complexidade desses ambientes e da enorme malha hídrica que cobre a região amazônica. Os principais temas investigados até o presente tratam da composição e estrutura das comunidades ictífica em geral e sua relação com o ambiente (Bührnheim & Fernandes, 2003; Mendonça *et al.*, 2009; Espirito-Santo *et al.*, 2011; Brejão *et al.*, 2013). Buscando auxiliar na caracterização da ictiofauna de igarapés, estudos com marcadores genéticos também têm sido aplicados e abordam temas como análise de populações, filogenia molecular e identificação de espécies (Toffoli *et al.*, 2008; Carvalho-Costa *et al.*, 2011; Ardura *et al.*, 2010; Ortiz, 2010; Maia & Gomes, 2012).

Dentre as metodologias genéticas utilizadas, atualmente destaca-se a técnica conhecida como *DNA Barcoding* (código de barras de DNA), proposta por Hebert *et al.* (2003) como uma ferramenta para identificação molecular de espécies visando o rápido crescimento de conhecimento sobre a biodiversidade. Tal técnica tem provado ser eficiente para a identificação de espécies em muitos grupos de organismos, incluindo peixes (Steinke *et al.*, 2009), aves (Kerr *et al.*, 2007), mamíferos (Borisenko *et al.*, 2007), insetos (Hebert *et al.*, 2004), plantas (Kress *et al.*, 2005) e fungos (Schoch *et al.*, 2012).

A sequência nucleotídica escolhida, gerada de parte de um gene mitocondrial, o Citocromo Oxidase I, com 648 pares de bases, é tida como um marcador universal para espécies animais, servindo como um código de barras de DNA – fazendo-se uma analogia ao código de barras universal que identifica cada produto em um supermercado, por exemplo – e que possui vantagens como a identificação de espécies crípticas e a possibilidade de identificação de um organismo em todos os seus ciclos de vida (ovos, larvas, indivíduos maduros) (Hebert *et al.*, 2003).

Com o intuito de fortalecer o desenvolvimento e o emprego do *DNA Barcoding* como um padrão global de identificação de espécies biológicas, foi criado o *Consortium for the Barcode of Life* (CBOL), onde instituições do mundo todo contribuem para a identificação do maior número possível de organismos por meio do *DNA barcoding*. Um banco de dados público chamado de *Barcode of Life Data System* (BOLD) também foi criado para que as sequências de *barcode* dos organismos de todo o mundo, assim como outras informações como fotos e locais de coleta, pudessem ser depositadas e disponibilizadas publicamente (Ratnasingham & Hebert, 2007).

No Brasil, o consórcio *Brazilian Barcode of Life* (BrBOL), objetiva a identificação molecular da biodiversidade brasileira com vários grupos de pesquisadores associados para gerar sequências *barcode* de diferentes organismos, tais como organismos marinhos, invertebrados terrestres, plantas, fungos, peixes e anfíbios. O presente trabalho é vinculado à rede BrBOL, por meio do projeto Rede de ‘*DNA Barcoding* da ictiofauna do Brasil’ e dessa maneira, partilha seu objetivo.

1.1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1.1 A bacia amazônica e aspectos da ictiofauna

A bacia amazônica é a maior bacia hidrográfica do mundo com 7.050.000 km² de extensão territorial (Sioli, 1985; Malabarba *et al.*, 1998). Cerca de 68% de sua área de drenagem situa-se em território brasileiro, sendo o restante distribuído pelos países do norte da América do Sul: Peru, Colômbia, Equador, Bolívia, Venezuela, Guiana, Guiana Francesa e Suriname (Junk *et al.*, 2011). Sua malha hídrica é formada por uma diversidade de corpos d’água, não somente grandes rios e lagos, mas também inúmeros pequenos riachos que tem o rio Amazonas como seu coletor final (Junk, 1983, Santos e Ferreira, 1999).

Os diversos corpos d’água que formam a bacia em questão foram classificados por Harald Sioli, em 1956. Tal classificação foi baseada na observação da cor das águas e também em parâmetros físicos e químicos para explicar as características limnológicas dos grandes rios amazônicos, além de relacionar estas características às propriedades geológicas e geomorfológicas das bacias, classificando os corpos d’água em três categorias: águas clara, preta ou branca (Junk *et al.*, 2011). No caso das águas clara e preta, em particular, foram considerados ainda o tipo de solo e a vegetação presente na área de represa de cada curso d’água (Sioli, 1964). Segundo essa classificação o rio Amazonas é tido como um rio de água branca, enquanto que o rio Tapajós possui água clara e o Rio Negro, água preta (Fink & Fink, 1979).

O rio Tapajós é originado na região do cerrado brasileiro pela junção dos rios Téles Pires e Juruena, na divisa dos estados Pará, Amazonas e Mato Grosso. É o quinto maior tributário do rio Amazonas, com extensão de 1.784 km (Costa, 2007). Sua bacia possui uma área de drenagem de 400.000 km², o equivalente a 7% da bacia Amazônica, além de vazão

que alcança 13.540 m³/s (Barthem & Fabré, 2003; Godoi, 2008). Mais de 95% do vale do Tapajós estão divididos entre os Estados de Mato Grosso e Pará, e o restante nos estados de Rondônia e Amazonas (Godoi, 2008). Assim como os demais rios de água clara, tende a apresentar características como águas esverdeadas e com grande transparência - visibilidade chegando a quase 5m -, baixa quantidade de sedimentos e sólidos dissolvidos, pH ácido (entre 5 e 6) e condutividade elétrica baixa, entre 20-40 µS cm⁻¹ (Barthem & Fabré, 2004; Junk & Piedade, 2010).

Na região do alto Tapajós, sul da Amazônia, diversos estudos feitos em rios e riachos apontam a descrição de novas espécies, além de outros aspectos como diversidade e alimentação dos peixes desta região (Lucena 2003; Oliveira *et al.*, 2010; Birindelli *et al.*, 2008; Godoi, 2008; Bertaco & Garutti, 2007; Britski & Garavello, 2007; Costa *et al.*, 2007; Smerman, 2007). Na porção do baixo Tapajós (ou região do baixo Amazonas), a maioria das informações sobre a ictiofauna esta relacionada à atividade pesqueira que ocorre nessa região (Ruffino, 2008; Ruffino *et al.*, 1998; Bayley & Petrere Jr., 1989), sendo escassos os trabalhos sobre a diversidade, ecologia e hábitos alimentares de peixes, seja no rio Tapajós ou nos vários igarapés situados ali.

Dados de atividade pesqueira da região de Santarém, baixo Tapajós, apontam a pesca como sendo estritamente artesanal, ocorrendo principalmente nos lagos (50%) e rios (49%) da região e tendo como principais espécies capturadas a dourada (*Brachyplatistoma flavicans*), o mapará (*Hypophthalmus spp.*), a pescada (*Plagioscion spp.*) e o surubim (*Pseudoplatystoma spp.*) (Ruffino *et al.*, 1998). O desembarque pesqueiro nessa cidade é de 4.000 toneladas/ano, sendo quase 100 espécies comercializadas, porém, apenas 10 destas representam mais de 80% do total, o que favorece a ocorrência da sobre-exploração dessas espécies (Isaac *et al.*, 2004).

Embora o número exato de espécies de peixes existentes no mundo ainda não seja conhecido (Levequê *et al.*, 2008), estima-se que das 30.000 espécies já registradas nos mais diversos ambientes aquáticos, 13.000 (39%) ocorrem em águas fluviais (de acordo com o FishBase: www.fishbase.com.br, em Ivanova *et al.*, 2007). Nas regiões tropicais e subtropicais do globo terrestre há maior abundância de espécies de peixes em relação às demais regiões do globo, sendo que na região equatorial encontra-se a maior diversidade ictíica existente (Vari & Malabarba, 1998; Levequê *et al.*, 2008;). Tal riqueza para a região Neotropical está estimada na ordem de 8.000 espécies de peixes (Vari & Malabarba, 1998), sendo que de 2.400 a 3.000 espécies de peixes calcula-se que ocorram na bacia amazônica (Levequê *et al.*, 2008; Ardura *et al.*, 2000). Segundo Lowe-McConnell (1999), a alta diversidade ictíica presente na Amazônia é atribuída a fatores como: a idade e o tamanho do

sistema de drenagem; a sucessão de habitats oferecidos pelos rios de meandro; os diversos nichos presentes nos rios de planície e lagos adjacentes; a alta proporção da bacia em terras de nível baixo; e a incorporação de rios de outras bacias que geram o intercâmbio de fauna.

Os peixes de água doce compreendem 170 famílias, agrupadas em sua maior parte nas ordens Characiformes, Cypriniformes, Siluriformes, Gymnotiformes, Perciformes e Cyprinodontiformes (Levequê *et al.*, 2008; Roberts, 1972). A ictiofauna amazônica é representada principalmente por Characiformes (43%), Siluriformes (39%) e Gymnotiformes (3%), o restante (15%) é representado por 14 famílias de diferentes ordens (Lowe-McConnell, 1987; Roberts, 1972).

1.1.2 Igarapés de terra-firme na Amazônia e sua comunidade de peixes

Quase todos os rios amazônicos são resultantes da junção de pequenos riachos, chamados regionalmente de igarapés. São corpos d'água de pequeno porte, caracterizados pelo leito bem delimitado, correnteza relativamente acentuada e água com temperatura pouco variável ao longo do ano – entre 24 e 26 °C (Santos & Ferreira, 1999).

Os igarapés podem ser encontrados tanto em áreas de várzea como em florestas de terra-firme e são apontados como um dos principais ambientes aquáticos que ocorrem na floresta amazônica (Junk, 1983; Santos & Ferreira, 1999). Em florestas de terra-firme, nas áreas de baixio, ocorrem igarapés que se caracterizam por não serem submetidos a pulsos de inundação (Rezende, 2007) e sim a chuvas locais em frequência elevada e menor amplitude, estes são denominados igarapés de terra-firme (Junk *et al.*, 1989). Esses ambientes contribuem para a formação dos grandes rios amazônicos por formarem uma densa malha de corpos d'água que representa grande parte da área drenada de todo o sistema fluvial amazônico (Espírito Santo *et al.*, 2009).

Na Amazônia central os igarapés de terra firme possuem águas claras e ácidas por conta principalmente da elevada concentração de compostos húmicos e fúlvicos, com altas concentrações de oxigênio dissolvido (Walker, 1995 *apud* Anjos & Zuanon, 2007; Mendonça *et al.*, 2005). Em tais ambientes, a produção primária autóctone é reduzida por conta do sombreamento de sua área causado pelo denso dossel da vegetação marginal (Santos & Ferreira, 1999; Anjos & Zuanon, 2007). Além da redução da luz penetrante, o reduzido teor de sais minerais dissolvidos e a correnteza relativamente acentuada, os igarapés possuem

baixa produção biológica e sua fauna aquática torna-se dependente da matéria orgânica advinda do sistema terrestre que está ao seu redor, seja em forma de folhas, flores, frutos ou invertebrados. (Goulding, 1980; Santos & Ferreira, 1999; Walker, 1991 *apud* Anjos & Zuanon, 2007; Rezende, 2007).

São observados tanto igarapés com alta velocidade de correnteza e que apresentam substrato composto principalmente por areia, seixo, intercalado por extensos bancos de folhiço e troncos submersos (Rezende, 2007), quanto ambientes de poções mais profundos, formados em áreas de baixa velocidade de correnteza, normalmente nos retornos dos meandros do canal ou após barreiras naturais (troncos de árvores, por exemplo) e que tem como substrato banco de folhas em decomposição e pequenos galhos (Fittkau, 1967 *apud* Espirito Santo *et al.* 2009).

Nos igarapés, com o início de fortes chuvas o volume de água se eleva, muitas vezes ultrapassando o limite do canal e atingindo o vale circundante, a turbidez da água aumenta e os bancos de liteira do curso dos riachos são espalhados, e somente apenas após algumas horas depois do término da chuva é que o volume volta ao inicial (Espirito Santo *et al.*, 2009). Algumas poças temporárias encontradas nos vales ou baixios são formadas pela água que transborda dos riachos devido às chuvas e à água advinda dos platôs, estas poças permanecem com água por um período de três a onze meses e podem manter assembleias de peixes diversas, inclusive com espécies que ocorrem principalmente ou exclusivamente nesses ambientes (Pazin *et al.*, 2006).

De acordo com o tamanho dos igarapés há maior ou menor influência sobre a diversidade de espécies encontradas ali, sendo que igarapés de maior ordem tendem a possuir maior diversidade do que aqueles de menor ordem (Anjos & Zuanon, 2007). Segundo Lowe-McConnell (1999), a diversidade de espécies de peixes diminui em direção às nascentes dos córregos, onde os fatores físico-químicos, as obstruções que causam pequenas corredeiras, a elevada velocidade do fluxo, o tamanho e as condições dos refúgios na estação de seca podem ser mais limitantes que os recursos alimentares nesses ambientes.

Os igarapés de terra firme abrigam um grande número de espécies de peixes (Anjos & Zuanon, 2007), sendo essa diversidade caracterizada principalmente por uma abundância de peixes de pequeno porte (15 centímetros ou menos de comprimento) que apresentam um alto grau de endemismo e tem sido pouco estudadas (Lowe-McConnell, 1999; Castro, 1999). Dentre as espécies comuns encontradas em igarapés, podem-se destacar as piabas (ex. *Bryconops* spp., *Moenkhausia* spp., *Hemigrammus* spp.), sarapós (*Eigenmannia* spp., *Gymnorhamphichthys* sp.), acarás (*Aequidens* spp., *Apistogramma* spp.), jacundás

(*Crenicichla* spp.), pequenos bagres (*Helogenes marmoratus*) e jejus (*Hoplerythrinus unitaeniatus*, *Erythrinus erythrinus*) (Santos & Ferreira, 1999).

Nos últimos anos houve um crescente interesse pelo estudo da ictiofauna de igarapés de na bacia Amazônica. Tais estudos contemplam temas como: levantamentos da diversidade ictíca (Anjos & Zuanon, 2007, Smerman, 2007); estudo das assembleias de peixes (Mendonça, 2002; Buhrnheim & Cox Fernandes, 2003; Pazin *et al.*, 2006); metodologias de coleta (Anjos & Zuanon 2007; Ribeiro & Zuanon, 2006); relação entre o número de espécies e o hábitat (Araújo-Lima *et al.*, 1999; Buhrnheim & Cox Fernandes, 2003); variação temporal da ictiofauna (Espírito Santo *et al.*, 2009); e efeitos da pressão antrópica sobre os igarapés (Barbosa *et al.*, 2003; Ferreira *et al.*, 2012).

A dimensão da diversidade ictiofaunística em igarapés amazônicos ainda é uma questão em debate, muitas vezes influenciada pelo método de amostragem que cada pesquisador utilizou para alcançar determinado número de espécies nesses ambientes. Böhlke *et al.*, (1978), por exemplo, registraram de 50 a 70 espécies, enquanto que Buhrnheim & Cox (2003) e Espírito Santo *et al.*, (2009) encontraram de 20 a 30 espécies e, finalmente Barbosa *et al.*, (2003) registraram apenas 10 espécies. Pazin *et al.* (2006) analisaram poças marginais próximas ao igarapé e observaram riqueza de 18 espécies.

Um ponto importante é que cada um desses estudos aplicou um protocolo de amostragem diferente principalmente em relação ao tamanho do trecho amostrado, o que impossibilita comparações fidedignas. Segundo Anjos & Zuanon (2007), a comparação entre os resultados obtidos por diferentes autores fica prejudicada devido à falta de padronização na forma de amostragem desses ambientes.

Para o estudo da ictiofauna em igarapés de menor ordem (1^a a 3^a ordens) é utilizada, principalmente, a coleta ativa como meio de amostragens dos espécimes. Este tipo de coleta tem maior eficiência e parece ser menos seletivo quanto às espécies e o tamanho dos peixes capturados em relação ao método de coleta passiva – coleta que ocorre por meio de apetrechos que não são movidos ativamente pelo coletor (Uieda & Castro, 1999; Ribeiro & Zuanon, 2006). No entanto, os instrumentos utilizados no método ativo promovem perturbação no ambiente, tanto pela movimentação dos coletores quanto pelas alterações provocadas na estrutura de microhábitats (Ribeiro & Zuanon, 2006). Além disso, as coletas que utilizam essa metodologia são altamente influenciadas pela habilidade do coletor, ao passo que coletores menos experientes podem subestimar a análise de determinado ambiente por ineficiência na amostragem (Uieda & Castro, 1999).

Mendonça *et al.* (2005) propuseram uma metodologia de amostragem por coleta ativa que tem sido amplamente utilizada, proporcionando no mínimo, comparações mais precisas. Em resumo, são amostrados trechos de 50 metros de igarapés, denominados de parcela aquática, bloqueados no início e fim por redes para que seja reduzido o escape dos peixes. A parcela aquática é inspecionada por dois ou três coletores durante um tempo predefinido de uma ou duas horas. Neste período os coletores utilizam apetrechos como redes de arrasto, puçás e peneiras para capturar os peixes ao longo da parcela (Figura 1).

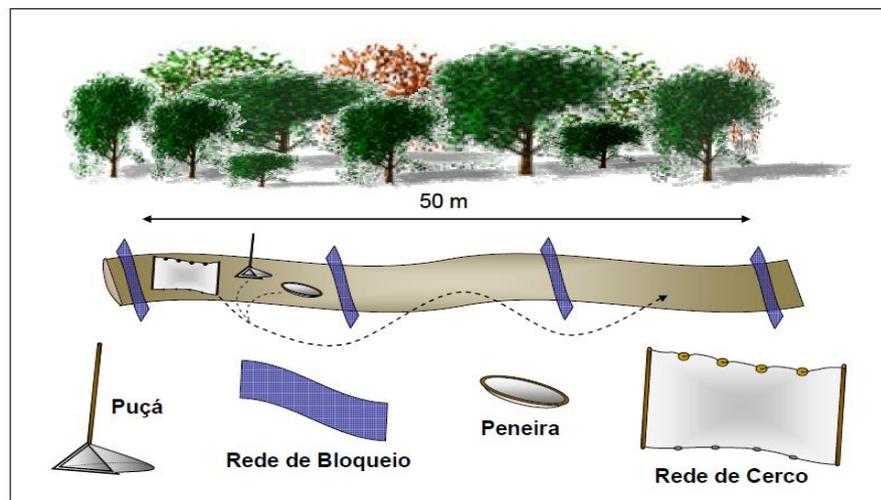


Figura 1: Esquema de parcela aquática e apetrechos de coleta de peixes em igarapés, adaptado de Mendonça *et al.* (2005).

Por meio da caracterização da comunidade ictíica em ambientes como igarapés utilizando-se metodologias tais como a de Mendonça *et al.* (2005), é possível haver uma compreensão maior sobre as espécies encontradas nesses locais e as características físico-químicas dos mesmos, o que possibilita o desenvolvimento de programas de preservação ou monitoramento dessas áreas, inclusive com a utilização de métodos adequados a ictiofauna local, para que causem o mínimo de impacto sobre tais espécies (Espírito-Santo *et al.*, 2011).

1.1.3 Estudos genéticos aplicados à sistemática e conservação

A degradação ambiental iminente sobre rios, lagos e igarapés amazônicos, principalmente nos que estão mais próximos dos grandes centros urbanos, age contra a proteção desses ambientes e, conseqüentemente, da ictiofauna presente nos mesmos. Áreas como a Amazônia, por concentrarem um elevado número de espécies devem receber

constante atenção em pesquisas científicas visando-se a conservação de biodiversidade e ecossistemas (Reid, 1998).

É grande o número de espécies que podem ser extintas antes mesmo de serem conhecidas pela humanidade (Hebert *et al.*, 2003). Nos dias de hoje, o ritmo anual de extinção de espécies no mundo todo aumentou de uma espécie por milhão para 100 a 1000 espécies por milhão, ou seja, são milhares de espécies de plantas e animais extintas a cada ano (USING DNA BARCODES TO IDENTIFY AND CLASSIFY LIVING THINGS, disponível em <http://www.dnabarcoding101.org/files/using-dna-barcodes.pdf>). Aos níveis taxonômicos de gênero e espécie desconhece-se grande parte da diversidade existente, em muitos táxons (Blaxter, 2004). Dos 5 a 50 milhões de espécies que, estima-se existam no mundo, apenas 30% foram descritas – isso se for considerado o número de 5 milhões de espécies (Winston, 1999).

Um outro aspecto que tem favorecido o crescimento da utilização de ferramentas genéticas em taxonomia é que a identificação baseada em características morfológicas, além de ser uma atividade muitas vezes minuciosa, necessita de profissionais especializados em grupos específicos de organismos, profissionais esses que estão cada vez mais raros (Hebert *et al.*, 2003). Mesmo quando espécimes adultos intactos estão disponíveis para serem analisados, as características morfológicas usadas para discernir espécies podem ser tão sutis que a identificação se torna difícil, até para taxonomistas treinados (Ward *et al.*, 2009).

A necessidade de se efetuar identificação de espécies de modo rápido e eficiente está vinculada a uma série de situações relacionadas à biologia como a questão de saúde, de pragas na agricultura, de identificação de espécies exóticas, de monitoramento ambiental, manejo da fauna, turismo, controle de comércio de produtos biológicos e/ou organismos protegidos e de manejo de estoques (Hebert *et al.*, 2003). A partir do momento que as descrições de espécies baseiam-se em uma ampla base de dados, estas se tornam hipóteses científicas interessantes, o que permite a elaboração de predições explícitas sobre os atributos dos organismos (Lipscomb *et al.*, 2003).

Assim, como método de auxílio à identificação tradicional (morfológica) de espécies, há mais de 30 anos a genética vem sendo utilizada em vários tipos de estudos por meio da análise de sequências de DNA (Ward *et al.*, 2005). Entre os dados moleculares utilizados em Taxonomia e Sistemática podem-se citar as análises citogenéticas, análises bioquímicas, o uso de isozimas, dados imunológicos e de polimorfismo do DNA (Henriques, 2010). Nos estudos taxonômicos, essas ‘novas’ categorias de dados têm sempre sido adicionadas aos dados morfológicos, nunca pretendendo substituí-los (Henriques, 2010).

Segundo Galtier *et al.* (2009), o DNA mitocondrial tem sido o marcador molecular de diversidade animal mais utilizado ao longo das últimas três décadas. Recentemente, iniciou-se o emprego de uma ferramenta que utiliza uma região do DNA mitocondrial como um marcador genético universal capaz de identificar espécies animais de maneira padronizada e rápida, servindo como um código de barras de DNA, ou *DNA barcoding* (Hebert *et al.*, 2003; Blaxter, 2004).

1.1.4 *DNA barcoding* e a identificação molecular de espécies

No genoma, existem regiões cuja sequência de nucleotídeos mantém-se conservada entre membros de um táxon devido à pressão exercida pela seleção natural, mas que podem variar entre os táxons (Blaxter, 2004). Baseados na utilização de uma destas extensões, Hebert *et al.*, (2003) propuseram o emprego da técnica denominada *DNA Barcoding* almejando a identificação de qualquer espécie animal por meio da utilização de um fragmento de 648 pares de bases da extremidade 5' do gene mitocondrial Citocromo Oxidase Subunidade I (COI) (Figura 2). A identificação ocorreria de maneira rápida, padronizada e com baixo custo, com a possibilidade de ser gerado um banco de dados público mundial que agruparia os *barcodes* gerados em todo o mundo, de qualquer organismo. Possibilitaria também uma melhor resolução taxonômica do que aquela que poderia ser alcançada apenas com estudos morfológicos, além de ser uma solução parcial para o problema de declínio no conhecimento taxonômico tradicional (Taylor & Harris, 2012).

Entre as principais vantagens da utilização desta técnica destacam-se: 1) a identificação de espécies mesmo a partir de pequenos fragmentos; 2) identificação podendo ocorrer em qualquer estágio de vida (ovos, larvas, adultos); 3) a possibilidade de se distinguir espécies aparentemente semelhantes, como em espécies crípticas; e 4) redução de ambiguidades graças à identificação inequívoca das espécies (Stoeckle *et al.*, 2005).

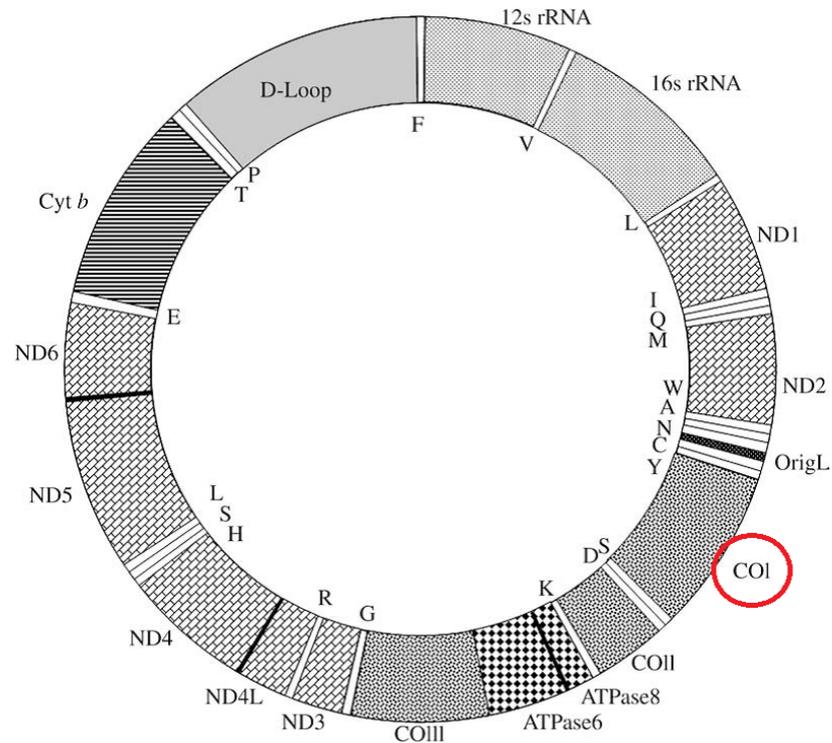


Figura 2 – Genoma mitocondrial em vertebrados, destacando-se a região do gene da citocromo oxidase subunidade I (*COI*), adaptado de Brown, (2008).

O termo *DNA barcoding* faz analogia ao código de barras universal (Figura 3) presente nos produtos comercializados e que identifica cada item singularmente, o código de barras de DNA serviria então como um código de barras para a identificação de espécies (Hebert *et al.*, 2003, Blaxter, 2004).

O DNA mitocondrial apresentou-se vantajoso para utilização no proposto por Hebert *et al.* (2003) principalmente por características como: 1) possuir um elevado número de cópias por célula; 2) apresentar diferenças de seqüências entre espécies próximas de 5 a 10 vezes maiores do que em genes nucleares; 3) possuir variação intraespecífica pequena na maioria das espécies animais; 4) não apresentar íntrons, o que facilita a obtenção da amplificação de DNA mitocondrial; 5) possuir herança predominantemente materna e baixo polimorfismo ancestral (Hebert *et al.*, 2003; Stoeckle *et al.*, 2005).



Figura 3: Comparação entre o código de barras universal de produtos e o código de barras de DN, adaptado de (Maia & Alves-Gomes, 2012).

O gene *COI*, escolhido como marcador universal, é responsável por codificar parte de uma enzima terminal da cadeia respiratória da mitocôndria e apresenta baixa variação dentro de uma mesma espécie quando comparada com variações entre espécies (Ward *et al.*, 2009). Embora outros segmentos gênicos tenham sido sugeridos para o mesmo fim, como os genes mitocondriais 16S rRNA e Citocromo B (Vences *et al.*, 2005), o gene *COI* continuou a ser utilizado como padrão por seu aparente melhor desempenho (Henriques, 2010).

O principal fundamento do *DNA barcoding* está baseado no fato de que certos fragmentos de DNA possuem uma baixa variação intraespecífica e uma alta variação interespecífica, dessa forma, a efetividade da aplicação da técnica depende de que as divergências dentro de uma mesma espécie sejam menores do que entre espécies diferentes, o que se chama de *barcoding gap* (Ward *et al.*, 2008; Hubert *et al.*, 2008; Lautredou *et al.*, 2010; Ortiz, 2010). Assim, um limite de variação pode ser caracterizado para cada grupo taxonômico, acima do qual um grupo de indivíduos pode ser considerado como não pertencendo à mesma espécie, ou seja, representando uma nova espécie (Hebert *et al.*, 2003).

O limite entre os valores para as divergências interespecíficas e intraespecíficas tem sido sugerido para ser cerca de 2% (3,5% para peixes) de divergência entre as sequências *COI* (Ward *et al.*, 2009, Lautredou *et al.*, 2010). Os desvios à regra do *barcoding gap* seriam atribuídos a um pequeno número de espécies incipientes, com separação incompleta de linhagens (Hebert *et al.*, 2004). Outra recomendação para aplicação e eficiência do *DNA barcoding* sugere que uma quantidade de 5 a 10 indivíduos de cada espécie devem ser amostrados, sempre que possível, de diferentes pontos dentro da área estudada. Segundo Ortiz

(2010), tanto o número amostral quanto o número de localidades de coleta pode interferir nos resultados já que a subamostragem de espécimes pode subestimar as divergências intraespecíficas e superestimar as divergências interespecíficas, facilitando a visualização do *barcoding gap*.

O sucesso apresentado pela aplicação do DNA *barcoding* se estende aos mais variados grupos de animais, como em peixes (Ward *et al.*, 2005; Costa *et al.*, 2008; Lautérou *et al.*, 2010), aves (Hebert *et al.*, 2004; Kerr *et al.*, 2007), mamíferos (Clare *et al.*, 2007; Borisenko *et al.*, 2008) e insetos (Hebert *et al.*, 2004; Hajibabaei *et al.*, 2006), apresentando resultados satisfatórios na identificação de espécies crípticas (Hebert *et al.*, 2004; Allcock *et al.*, 2010; Lara *et al.*, 2010;) ou de híbridos (Carvalho *et al.*, 2008) e também na autenticação de produtos alimentícios de origem animal, prevenindo fraudes na rotulagem de alimentos (Ardura *et al.*, 2010, Barbuto *et al.*, 2010).

Em outros organismos como em protistas, o *COI* também é utilizado e tem alcançado bons resultados, especialmente em algas vermelhas e marrons (Burgess *et al.*, 2011). Já em plantas e fungos, há um menor número de estudos realizados e as regiões padronizadas para barcode foram determinadas somente após alguns anos do trabalho de Hebert *et al.* (2003) (Kress & Erickson, 2012). Em plantas uma região do cloroplasto, o gene *rbcL* – RuBisCo grande subunidade – é utilizada (Kress & Erickson, 2012), enquanto que em fungos a região ITS tem sido a mais apropriada (Burgess *et al.*, 2011).

Apesar dos resultados favoráveis à sua adoção, o *DNA barcoding* não está isento de críticas. Tais críticas apontam limitações intrínsecas que comprometeriam grandemente sua funcionalidade e eficácia, por problemas como: inexatidão no número de indivíduos necessários para a validação do *barcode* em determinada espécie; impossibilidade de somente o gene *COI* servir à identificação de todas as espécies animais; a ineficiência da aplicabilidade do *barcoding* em grupos de espécies com tempo de divergência bastante reduzido; e mesmo quanto à validação da técnica como uma atividade científica por esta não testar hipóteses e apenas produzir informações (Lipscomb *et al.*, 2003; Hickerson *et al.*, 2006; Brower, 2006; Wiemers & Fiedler, 2007; Galtier *et al.*, 2009). Ward *et al.* (2009), se referindo a algumas críticas, observa que os problemas são característicos em apenas grupos específicos e que baixas taxas de eficiência do *DNA barcoding* podem ser devidas inclusive a erros na identificação prévia de alguns organismos.

Mesmo em meio às críticas, o *DNA Barcoding* é um empreendimento global com amplo crescimento, que atrai muitos fundos, possui várias organizações parceiras de diversas partes do mundo e opera três sites internacionais: 1) *Consortium for the Barcode of Life* –

CBOL (<http://www.barcodeoflife.org>); 2) *International Barcode of Life* – iBOL (<http://www.ibol.org>); 3) *The barcode of Life Datasystems* – BOLD (<http://www.boldsystems.org>) (Taylor & Harris, 2012).

Com o intuito de se estabelecer uma biblioteca de referências de *barcodes* de DNA para todas as espécies de peixes derivadas de espécimes testemunhos (*vouchers*) com identificação taxonômica confiável, também foi desenvolvida a Iniciativa em Peixes do Código de Barras da Vida (*Fish Barcode of Life Initiative* – FISH-BOL – <http://www.fishbol.org>). Segundo seu próprio website (acessado em 15.07.2013), há no FISHBOL atualmente um total de 88757 *barcodes* de espécimes realizados, sendo 9769 espécies com seus *barcodes* gerados, e dentre estas, 1935 são espécies que ainda não possuem uma descrição. Segundo Ivanova *et al.* (2007), os benefícios deste trabalho incluem identificação facilitada de espécies – sinalizando potencialmente espécies previamente não reconhecidas –, permitir identificações onde os métodos tradicionais não são aplicados e fornecer uma poderosa ferramenta para a melhora do entendimento da história natural e interações ecológicas de espécies de peixes.

No Brasil, criou-se a rede BrBOL (Brazilian Barcode of Life - <http://www.brbol.org>), um consórcio brasileiro de identificação molecular da biodiversidade com quase uma centena de instituições colaboradoras. Peixes, artópodes, anfíbios, passáros, répteis, mamíferos, plantas e fungos são alguns dos grupos sendo caracterizados pelo BrBOL. Dentre os projetos pertencentes a esse consórcio está o denominado “Rede de ‘DNA Barcode’ da Ictiofauna do Brasil” que visa a identificação de 2100 espécies de peixes no Brasil por meio da metodologia de *DNA Barcoding*.

Estudos realizados em países como Cuba (Lara *et al.*, 2010), Canadá (Steinke *et al.*, 2009) e Austrália (Ward *et al.*, 2005) utilizando o DNA barcoding, tem agido de maneira eficiente na caracterização da fauna de peixes nesse locais assim como na proteção da ictiofauna por conta das informações geradas por esses estudos. Ortiz (2010) aplicando o DNA barcoding em um estudo de ampla amostragem em siluriformes de várias regiões da amazônia, alcançou grande eficiência na validação dessa ferramenta como identificador desse grupo de peixes.

Em ambientes com grande biodiversidade e considerados pouco estudados, onde ainda existem lacunas de identificação, como em igarapés amazônicos que ainda estão sujeitos a processos dinâmicos e complexos que representam ameaças para a sua biodiversidade e estrutura ambiental, o advento do DNA barcode pode contribuir para acelerar

o acúmulo de conhecimento sobre a ictiofauna desses ambientes e sua proteção e com isso viabilizar estratégias e políticas de conservação e manejo desse componente biótico.

O presente trabalho é integrado a Rede BrBOL e tem como objetivo principal a geração de etiquetas moleculares (DNA barcodes) de peixes de igarapés da bacia do rio Tapajós, além de promover a caracterização da ictiofauna desses ambientes. Como objetivos específicos visa-se observar as possíveis semelhanças e diferenças entre os ambientes analisados e sua comunidade íctiica por meio de parâmetros como abundância e diversidade, e ainda, contribuir com a biblioteca mundial de barcodes (plataforma BOLD system) por meio das sequências de barcodes obtidas nesse trabalho.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo geral:

Caracterizar a ictiofauna de três igarapés da região de Santarém utilizando-se dos métodos de identificação tradicional baseado na morfologia e biologia molecular baseado no marcador genético DNA *barcoding*.

1.2.2 Objetivos específicos:

Relacionar as espécies de peixes encontradas nos igarapés e classificá-las conforme suas categorias taxonômicas;

Comparar os igarapés com base na composição e abundância das espécies encontradas;

Desenvolver etiquetas moleculares (*DNA barcodes*) para as espécies de peixes coletadas nos igarapés;

Comparar o desempenho do marcador genético frente à identificação baseada em morfologia;

Depositar os DNA barcodes gerados e associa-los com a rede BrBOL no repositório BOLD System;

Capítulo 1

Levantamento rápido da ictiofauna em três igarapés da região de Santarém, Pará¹

Marcos Paulo Alho de Sousa
Luís Reginaldo Ribeiro Rodrigues

1 Manuscrito de artigo científico a ser submetido ao periódico Neotropical Ichthyology (ISSN-1679-6225)

Resumo

A biodiversidade dos igarapés da bacia Amazônica ainda é pobremente conhecida e muitos são os fatores que ameaçam o equilíbrio desses ricos ecossistemas. No presente trabalho investigamos três igarapés da região de Santarém para conhecer a composição de espécies e comparar os padrões ictiofaunísticos observados. Foram realizadas coletas ativas em parcelas aquáticas de 50m com o esforço amostral padronizado. Os peixes foram coletados com uso de peneiras, e redes de arrasto. Foram capturados 836 indivíduos de 20 espécies representando 14 famílias e seis ordens. Os Characiformes foram o grupo predominante representando 75,5% das capturas e 45% do número de espécies (n=9). A dominância de Characiformes pode indicar que os igarapés analisados apresentam bom estado de conservação ambiental.

Palavras-chave

Igarapés; coleta ativa; ictiofauna, Alter do Chão

Introdução

A bacia amazônica é reconhecida por sua extensa malha hídrica de rios caudalosos que nascem nas terras altas da cordilheira dos Andes e dos planaltos guianês e brasileiro, e drenam enormes porções da planície até desembocar no oceano Atlântico (Goulding, 1997). Os grandes rios da Amazônia são irrigados pela conexão com uma complexa rede de pequenos riachos (igarapés) que drenam a floresta (Junk, 1983).

Os igarapés são ambientes aquáticos com baixa produção biológica, caracterizados como corpos d'água de pequeno porte, cujo leito é bem delimitado, a correnteza é relativamente acentuada, a temperatura da água varia em torno de 26 °C ao longo do ano; os cursos médio e superior são encobertos pelo dossel da floresta de terra firme e o leito é entulhado por troncos caídos. O nível das águas nos igarapés oscila anualmente em função dos períodos de enchente e vazante do rio principal, além disso, variações abruptas podem ocorrer devido a fortes chuvas em sua área de drenagem (Santos & Ferreira, 1999).

A ictiofauna da bacia amazônica ainda é considerada pouco conhecida e estima-se que sua diversidade alcance de 2.400 a 3.000 espécies (Ardura *et al.*, 2000, Levequê *et al.*, 2008). A maioria dos peixes amazônicos é classificada na superordem Ostariophysi sendo representada por Characiformes (43%), Siluriformes (39%), Gymnotiformes (3%), os 15% restante classifica-se em 14 famílias de diferentes ordens (Roberts, 1972; Lowe-McConnell, 1987; Bayley & Petrere, 1989).

Recentemente, muitas espécies novas têm sido descritas a partir de espécimes tipos coletados nesta região (Lucena, 2003; Kullander & Ferreira, 2005; Bertaco & Garutti, 2007; Costa, 2007; Birindelli *et al.*, 2008; Godoi, 2008; Oliveira *et al.*, 2010; Lucena & Malabarba, 2010). Segundo Castro (1999), estima-se que cerca de 2.000 novas espécies de peixes dulcícolas sul-americanos ainda estão por serem descritas. Os ambientes de igarapés da bacia amazônica foram pouco explorados e possivelmente abrigam espécies desconhecidas para a

ciência. Entre as características mais estudadas dos igarapés podemos citar a composição e estrutura das comunidades, a distribuição espacial da ictiofauna, aspectos da alimentação, influencia da variação temporal e de perturbações antrópicas sobre a fauna de peixes (para revisão: Araujo-Lima *et al.*, 1999; Mendonça, 2002; Barbosa *et al.*, 2003; Buhrnheim & Cox Fernandes, 2003; Mendonça *et al.*, 2005; Pazin, 2006; Ribeiro & Zuanon, 2006; Anjos & Zuanon 2007; Espirito Santo *et al.*, 2009; Ferreira *et al.*, 2012).

A ictiofauna de igarapés é composta normalmente por peixes de pequeno porte com média de 15 cm de comprimento total. Dentre as espécies comumente encontradas em igarapés destacam-se as piabas (ex. *Bryconops* spp., *Moenkhausia* spp., *Hemigrammus* spp.), os acarás (*Aequidens* spp., *Apistogramma* spp.), os sarapós (*Eigenmannia* spp., *Gymnorhamphichthys* sp.), os jacundás (*Crenicichla* spp.), os pequenos bagres (*Helogenes marmoratus*), as traíras e jejus (*Hoplias malabaricus*, *Hoplerythrinus unitaeniatus*, *Erythrinus erythrinus*) (Santos & Ferreira, 1999).

As características estruturais dos ambientes aquáticos tropicais afetam a composição das comunidades de peixes (Mendonça *et al.*, 2005). Tem se observado que igarapés de maior ordem tendem a possuir maior diversidade do que aqueles de menor ordem (Anjos & Zuanon, 2007). Segundo Lowe-McConnell (1999), a diversidade de espécies de peixes diminui em direção às nascentes dos córregos onde os fatores físico-químicos, as obstruções que causam pequenas corredeiras, a elevada velocidade do fluxo, o tamanho e as condições dos refúgios na estação de seca podem ser mais limitantes que os recursos alimentares nesses ambientes. Vários autores tem observado uma variação do número de espécies entre 20 a 50 (Lowe-McConnell, 1999; Mendonça *et al.*, 2005; Buhrnheim & Cox, 2003, Espirito Santo *et al.*, 2009). Parte dessa variação pode ser explicada pela não adoção de metodologias padronizadas nos estudos ictiofaunísticos (Anjos & Zuanon, 2007).

Os igarapés ocorrem por toda a bacia amazônica, que ocupa uma área de aproximadamente 7×10^6 km², entretanto, nota-se que estudos da ictiofauna de igarapés estão concentrados em poucas áreas deste vasto território, tais como a Reserva Adolpho Ducke localizada próximo a Manaus/AM e a Floresta Nacional de Caxiuanã, localizada em Melgaço/PA. A região de Santarém, localizada na confluência dos rios Tapajós e Amazonas, é considerada um importante centro de desembarque pesqueiro e há um bom nível de conhecimento sobre as espécies exploradas comercialmente (Santos et al. 1998), por outro lado, nota-se uma completa lacuna de informações científicas sobre a ictiofauna dos igarapés dessa região, o que demanda por atenção e esforço de pesquisa no tema, visto que essa região é atualmente alvo de grandes projetos, tais como o asfaltamento da BR-163, a construção de hidrelétricas no rio Tapajós e a expansão das áreas de cultivo de grãos, que podem ser consideradas potencialmente danosas aos ecossistemas de igarapés. Por ser um rio de cabeceira, o Tapajós pode possuir biótopos restritos com a possibilidade de abrigar uma fauna diferenciada, com a ocorrência, inclusive, de espécies endêmicas (Godoi, 2008).

Segundo Abell *et al.* (2008) o crescimento populacional e as mudanças recentes no estilo de vida humano tem causado perturbações e degradação dos ambientes naturais de água doce. Os igarapés da região de Santarém/PA têm sofrido alterações devido à expansão da área urbana seguida por degradação de matas ciliares e poluição de solos e corpos d'água, além disso, são modificados em seu curso e estrutura do canal para uso em piscicultura e atividades de lazer. No presente trabalho, investigamos a composição da ictiofauna em três igarapés da região de Santarém/PA, visando contribuir para o conhecimento da ictiofauna na bacia do rio Tapajós além de prover informações úteis subsidiar medidas de conservação desses ecossistemas e de sua biota aquática.

Material e métodos

Área de estudo

O município de Santarém (S 2°24'; W 54°42') pertence à mesorregião do Baixo-Amazonas, situando-se na bacia Sedimentar Amazônica. Seu solo é formado pelo Latossolo Amarelo de texturas médias, argilosas e muito argilosas; o relevo é constituído por áreas de várzeas, terraços e praias fluviais. O clima do município é quente e úmido, com temperatura em média 25.6 °C, e umidade relativa acima dos 80% em quase todos os meses do ano. Entre os meses de dezembro a junho observa-se maior precipitação, seguida por um período mais seco que se estende de julho a novembro. Ao longo do ano as chuvas são irregulares e a pluviosidade se aproxima dos 2.000mm (Boletim Estatístico de Santarém, 2011).

Foram investigados três igarapés situados nas proximidades da Rodovia Everaldo Martins que liga Santarém a Vila de Alter do Chão: igarapé UDV (S 2°28'50.1''; W 54°47'19.1''), igarapé São Bráz (S 2°30'36.8''; W 54°48'39.3'') e igarapé Sonrisal (S 2°32'15''; W 54°55'26.5'') (Fig. 1).

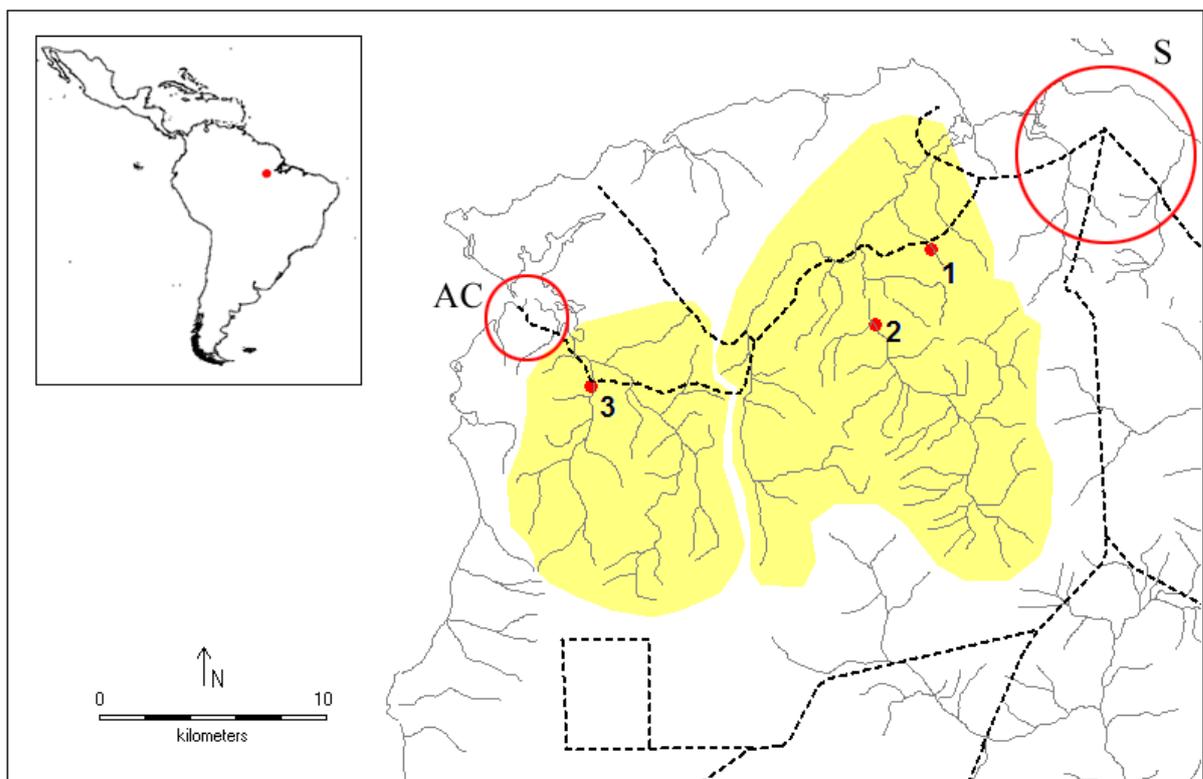


Fig. 1: Mapa de localização da área de estudo na margem direita do rio Tapajós nas proximidades de Santarém e Alter do Chão, estado do Pará, Brasil. Áreas coloridas em amarelo correspondem as microbacias dos Igarapés UDV (1) e São Bráz (2) e do Igarapé Sonrisal (3). Os círculos em vermelho representam as áreas urbanas de Santarém (S) e Alter do Chão (AC). Linhas tracejadas indicam as rodovias principais.

Delineamento Amostral

As coletas ocorreram entre os meses de janeiro de 2012 a janeiro de 2013, preferencialmente no período matutino. Foram realizadas três coletas em cada um dos igarapés. Em cada igarapé foi delimitada uma parcela aquática de 50m de comprimento, bloqueada em seus limites por redes de malha fina. A captura dos peixes foi realizada com o uso de redes, puçás e peneiras sempre no sentido jusante-montante, até se cobrir completamente o trecho. Cada sessão de coleta foi executada por três coletores e teve duração de duas horas. Este protocolo de amostragem foi adaptado de Mendonça *et al.* (2005).

Os exemplares coletados foram transportados ao laboratório, anestesiados e sacrificados em dose letal de solução de óleo de cravo (Eugenol). Em seguida, foram obtidas fotografias e amostras de tecido muscular para futuros estudos moleculares. Os peixes então foram fixados em formalina 10% e posteriormente transferidos para recipientes com etanol a 70%. A identificação taxonômica dos espécimes foi realizada com base na literatura pertinente com o auxílio de chaves de identificação e por comparação com espécimes da Coleção Ictiológica do Instituto de Ciência e Tecnologia das Águas (ICTA-UFOPA). Os espécimes testemunho foram depositados na Coleção Ictiológica do ICTA/UFOPA.

Parâmetros Ambientais

Os igarapés foram classificados em 1^a, 2^a e 3^a ordem seguindo-se a escala de Horton (Petts, 1994 *apud* Mendonça *et al.*, 2005). Para a caracterização dos ambientes e explicar possíveis relações das ictiocenoses com as variáveis ambientais foram registrados dados sobre a estrutura dos igarapés e de parâmetros físico-químicos da água. As medidas foram feitas antes do início de cada sessão de coleta e foram registradas as seguintes variáveis estruturais: 1) velocidade da corrente; 2) largura média; 3) profundidade média; para detalhamento dos protocolos adotados ver Mendonça *et al.* (2005) . As variáveis físico-químicas foram: 1) potencial hidrogeniônico (pH); 2) temperatura (°C), medidas com equipamento portátil HANNA HI 98128; e 3) oxigênio dissolvido, medida com o oxímetro HOMIS, modelo YK – 22DO.

Análise de dados

Os dados de abundância de cada espécie foram utilizados para se estimar a riqueza da ictiofauna local com base no estimador não paramétrico Jackknife de 1^a ordem com auxílio do programa EstimateS (Colwell, 2006). Uma análise de similaridade entre os igarapés foi realizada a partir de uma matriz de presença-ausência utilizando-se o método de Jaccard com auxílio do programa PAST (Hammer *et al.*, 2001). As estimativas de diversidade foram efetuadas através do índice de Simpson (1/D) com auxílio do programa Biodiversity PRO.

Resultados

Os parâmetros ambientais analisados são resumidos na Tabela 1. Nota-se que os igarapés apresentam águas ácidas e frias com pH variando de 4.6 a 4.8 e temperaturas de 25.3 a 26.4 °C; em relação as variáveis físicas os maiores valores de largura, profundidade e velocidade da corrente foram obtidos no Ig. São Brás, o que poderia ser explicado por sua ordem de grandeza, pois se trata de um igarapé de terceira ordem.

Foram capturados 836 indivíduos, distribuídos em 20 espécies (Fig. 2) pertencentes a 6 ordens, 14 famílias e 20 gêneros (Tabela 2). A curva acumulativa de espécies mostrou tendência à assíntota e a estimativa de riqueza indicou 23 espécies, evidenciando forte eficiência da metodologia empregada para amostrar a diversidade da ictiofauna local (Fig. 3). Com base na composição de espécies observou-se maior similaridade entre os igarapés UDV e Sonrisal (Fig. 4). Em relação ao número de espécies o igarapé São Brás apresentou maior riqueza, seguido pelo UDV e Sonrisal respectivamente, entretanto, a medida de diversidade (Simpson 1/D) mostrou os maiores valores nos igarapés UDV e São Brás (Tabela 3).

Tabela 1 – Valores médios de parâmetros ambientais em três igarapés do baixo rio Tapajós, PA. Largura (Larg), Profundidade (Prof.), velocidade da corrente (VC), taxas de oxigênio dissolvido (O₂), potencial hidrogeniônico (pH) e temperatura (Tmp).

Igarapé	Ordem	Larg (m)	Prof. (cm)	VC (m/s)	O ₂ (mg/L)	pH	Tmp (° C)
UDV	1 ^a	1.29	34	0.23	10.4	4.61	25.3
Sonrisal	2 ^a	3.42	72	0.22	6.6	4.85	25.7
São Brás	3 ^a	8.93	97	0.44	19.1	4.88	26.4

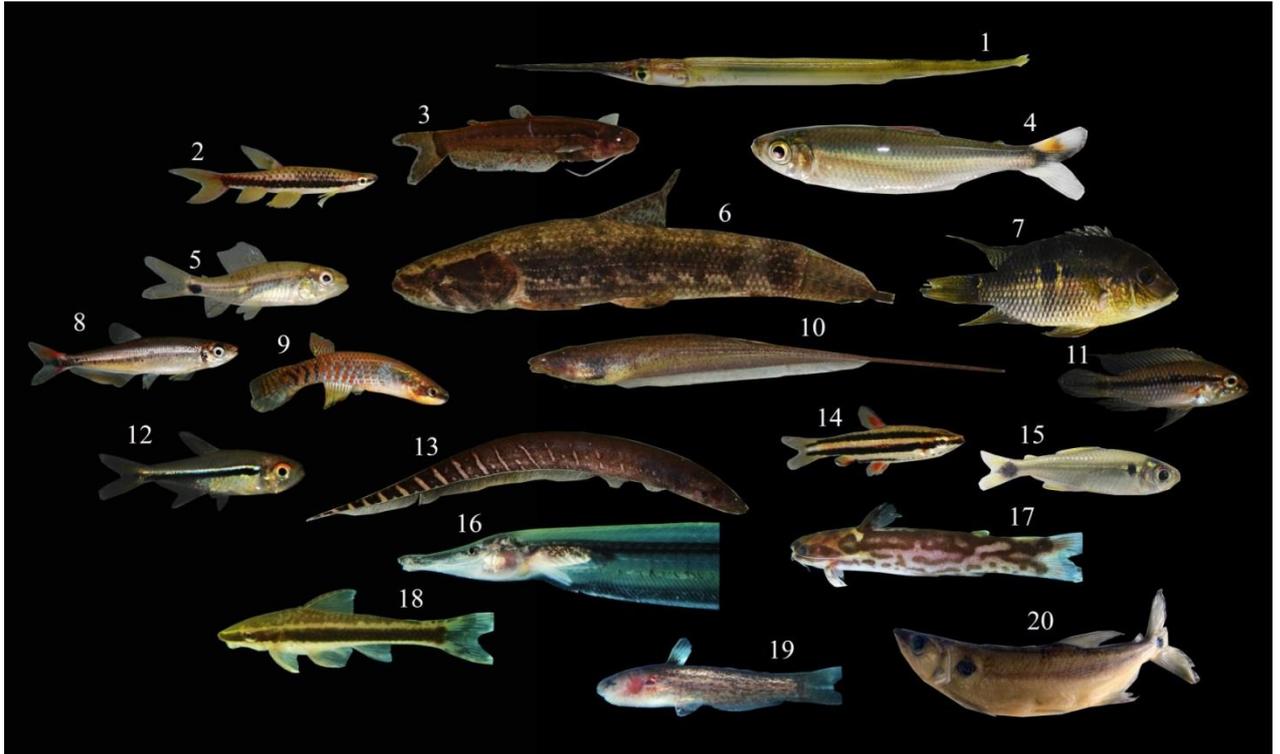


Fig. 2: Espécies registradas no presente estudo: 1- *Potamorrhaphis guianensis*; 2- *Copella nigrofasciata*; 3- *Helogenes marmoratus*, 4- *Bryconops giacopinii*; 5- *Crenuchus spilurus*; 6- *Hoplias malabaricus*; 7- *Aequidens tetramerus*; 8- *Iguanodectes variatus*; 9- *Rivulus dibaphus*; 10- *Microsternarchus bilineatus*; 11- *Apistogramma hippolytae*; 12- *Hyphessobrycon heterorhabdus*; 13- *Gymnotus anguillaris*; 14- *Nannostomus marginatus*; 15- *Hemigrammus vorderwinklery*; 16- *Gymnorhamphichthys petiti*; 17- *Tatia* aff. *dunni*; 18- *Otocinclus vittatus*; 19- *Denticetopsis* sp.; 20- *Acestrorhynchus falcatus*.

Tabela 2 – Composição e abundância da ictiofauna de três igarapés da região de Santarém-PA, baixo rio Tapajós.

Ordem/Família/Espécies	Ig. UDV	Ig. São Bráz	Ig. Sonrisal	N
BELONIFORMES				
BELONIDAE				
<i>Potamorhaphis guianensis</i> - Jardine, 1843		1		1
CHARACIFORMES				
ACESTRORHYNCHIDAE				
<i>Acestrorhynchus falcatus</i> - Bloch, 1794		1		1
CHARACIDAE				
<i>Bryconops giacopinii</i> - Fernández-Yépez, 1950		30	71	101
<i>Hemigrammus vorderwinclery</i> - Géry, 1963		47	4	51
<i>Hyphessobrycon heterorhabdus</i> - Ulrey, 1894	37	55	45	137
<i>Iguanodectes variatus</i> - Géry, 1993	24		87	111
CRENUCHIDAE				
<i>Crenuchus spilurus</i> - Günther, 1863	12	1	9	22
ERYTHRINIDAE				
<i>Hoplias malabaricus</i> - Bloch, 1794	3	3		6
LEBIASINIDAE				
<i>Copella nigrofasciata</i> - Meiken, 1952	54	51	55	160
<i>Nannostomus marginatus</i> - Eingemann, 1909	32	36		68
CYPRINODONTIFORMES				
RIVULIDAE				
<i>Rivulus dibaphus</i> - Myers, 1927	14	3		17
GYMNOTIFORMES				
HYPOPOMIDAE				
<i>Microsternarchus bilineatus</i> - Fernández-Yépez, 1968	10		17	27
GYMNOTIDAE				
<i>Gymnotus anguillaris</i> - Hoedeman, 1962	5		1	6
RHAMPHICHTHYIDAE				
<i>Gymnorhamphichthys petiti</i> - Géry & Vu-Tân-Tuê, 1964		3		3
PERCIFORMES				
CICHLIDAE				
<i>Aequidens tetramerus</i> - Heckel, 1840	56	15	7	78
<i>Apistogramma hippolytae</i> - Kullander, 1982	5		17	22
SILURIFORMES				
AUCHENIPTERIDAE				
<i>Tatia aff. dunnii</i> - Kner, 1858		2		2
CETOPSIDAE				
<i>Denticetopsis</i> sp.		2		2
<i>Helogenes marmoratus</i> - Günther, 1863	3	1		4

Tabela 2 – Continuação.

LORICARIIDAE*Otocinclus vittatus* - Regan, 1904

17

17

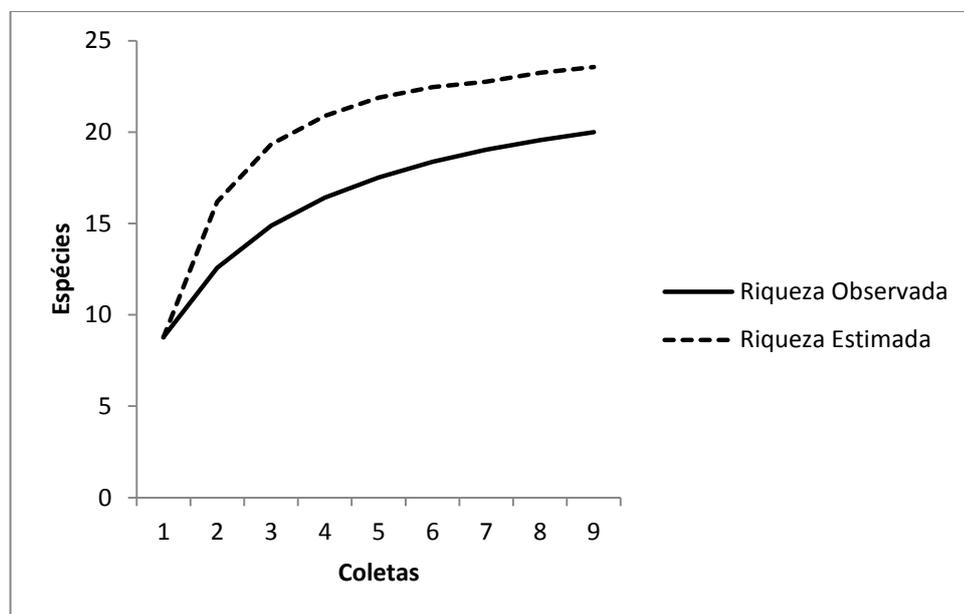


Fig. 3: Curva acumulativa de espécies em função de esforço amostral padronizado em três igarapés do baixo rio Tapajós. As amostras dos igarapés UDV, São Braz e Sonrisal foram agrupadas e a riqueza estimada pelo método Jackknife de 1ª ordem.

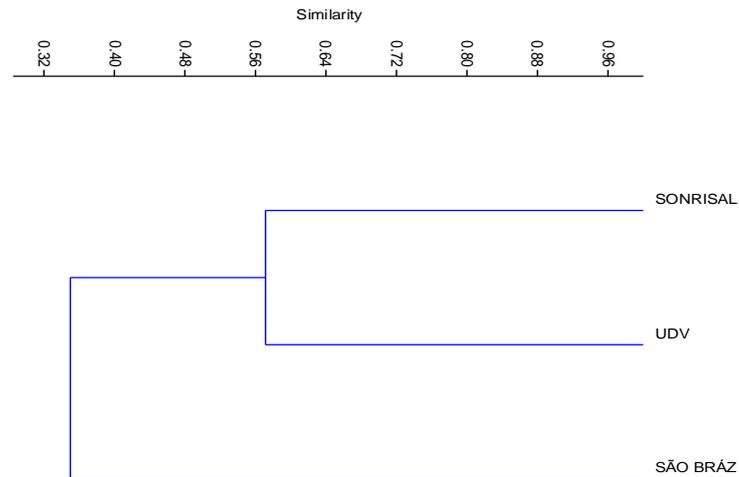


Fig. 4: Relações de similaridade com base na composição de espécies entre os igarapés UDV (1ª ordem) e Sonrisal (2ª ordem) e São Braz (3ª ordem).

Tabela 3: Medidas de riqueza e diversidade em três igarapés do baixo rio Tapajós, PA.

	Igarapés		
	UDV	São Bráz	Sonrisal
Espécies	12	16	10
Indivíduos	255	268	313
Índice de Simpson (1/D)	6.984	6.936	5.404

Os Characiformes apresentaram maior dominância com nove espécies, representando 45% do número total de espécies e 75.5% dos indivíduos coletados. Em sequência ficaram Siluriformes (4 espécies) e Gymnotiformes (3 espécies) como segundo e terceiro maiores grupos, respectivamente (Fig. 5).

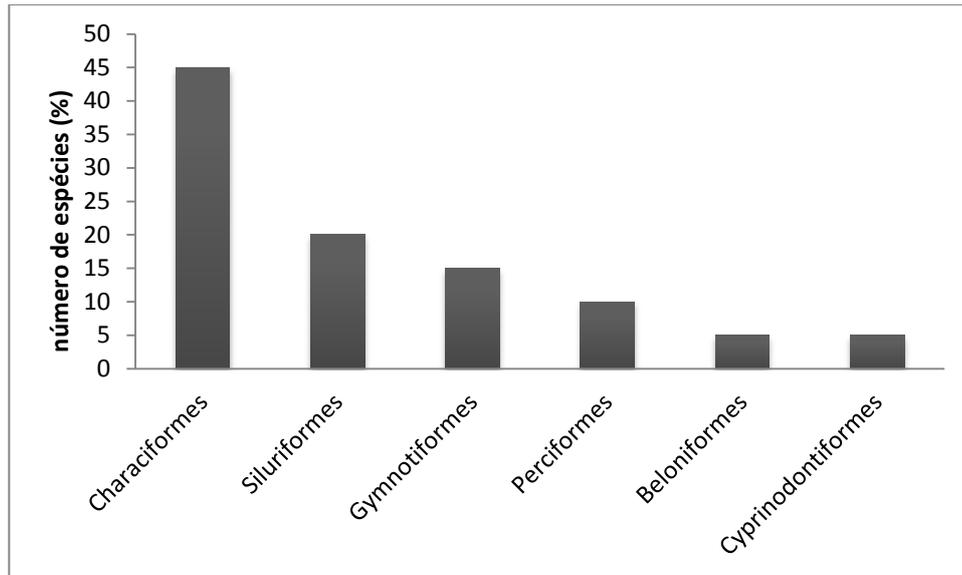


Fig. 5: Proporção do número de Espécies por Ordem da ictiofauna de três igarapés da região do baixo rio Tapajós, PA.

As espécies com maior abundância nos igarapés analisados foram *Hyphessobrycon heterorhabdus*, *Copella nigrofasciata*, *Iguanodectes variatus* e *Bryconops giacopinii*. Tais espécies representaram juntas quase 61% dos peixes coletados, sendo *Copella nigrofasciata* a espécie que apresentou maior abundância.

Apenas quatro espécies foram encontradas em todos os igarapés, *Hyphessobrycon heterorhabdus*, *Crenuchus spilurus*, *Copella nigrofasciata* e *Aequidens tetramerus*. Do total de espécies, seis foram encontradas exclusivamente no igarapé São Bráz, de terceira ordem. Essas espécies representam seis famílias de quatro ordens (Tabela 2). Os igarapés de 1ª e 2ª ordem (UDV e Sonrisal) não apresentaram espécies exclusivas. Ressalta-se ainda que, das

espécies mais abundantes, *Iguanodectes variatus* e *Bryconops giacopinii* ocorreram em apenas dois dos ambientes analisados. Como esperado para igarapés, grande parte dos espécimes apresentou tamanho reduzido (<10 centímetros), apenas um exemplar de *Hoplias malabaricus* e outro de *Acestrorhynchus falcatus* apresentaram tamanhos superiores.

Discussão

A riqueza observada nos igarapés da região de Santarém (20 espécies), presente estudo, foi menor do que tem sido registrado em igarapés de mesma ordem da Reserva Adolpho Ducke, que varia entre 40 e 50 espécies (Mendonça *et al.*, 2005; Espírito Santo *et al.*, 2011). Tal variação poderia indicar um grande contraste entre as assembleias de peixes entre igarapés da Amazônia central, região de Manaus e do baixo Amazonas, região de Santarém; porém, é importante considerar que a menor riqueza dos igarapés da região de Santarém pode ser explicada por outros fatores, tais como, o menor esforço amostral empregado e por estarem situados às proximidades de uma rodovia estadual e acessíveis a população local que os utiliza para diversas finalidades, tais como balneários e criação de peixes (tambaqui).

A riqueza observada nos igarapés presente estudo assemelha-se ao encontrado em igarapés da área urbana de Manaus (Anjos, 2008). Segundo o mesmo autor, o desmatamento e crescimento urbano desordenado são responsáveis por desencadear um complexo processo de alteração nos ecossistemas de igarapés que se estendem desde a modificação da estrutura física dos corpos d'água, alteração dos parâmetros físico-químicos da água e da estrutura das comunidades ictíicas, levando a diminuição da riqueza e possibilitando a introdução de espécies exóticas e invasoras.

Ao contrário do que foi observado em igarapés alterados da região de Manaus, em que houve grande diminuição de Characiformes e aumento de Siluriformes, os igarapés

analisados no presente estudo mostraram dominância de Characiformes; um padrão esperado para riachos neotropicais e também observado nos igarapés conservados da região de Manaus (Anjos, 2008). Portanto, embora haja evidências de alteração ambiental nos igarapés de Alter do Chão, presente estudo, os mesmos ainda apresentam características ecológicas da composição ictiofaunística que se assemelham ao padrão esperado em ambientes conservados.

É esperado que a composição da ictiofauna de tributários de primeira ordem seja diferente daquela dos riachos de maior ordem, ocorrendo maior riqueza em igarapés de maior ordem (Araújo-Lima *et al.*, 1999; Anjos & Zuanon *et al.*, 2007). Uma vez que os três igarapés receberam igual esforço de pesca, a variação do número de espécies observada entre o igarapé São Bráz (16 espécie) e os igarapés UDV e Sonrisal (12 e 10 espécies, respectivamente) é explicada em virtude da maior capacidade de suporte do primeiro, que se trata de um igarapé de 3ª ordem, em relação aos outros igarapés de menor ordem.

Mesmo sendo os mais distantes entre si, e pertençam a diferentes microbacias, os igarapés de menor ordem UDV e Sonrisal mostraram maior similaridade quanto à composição de espécies, enquanto que o igarapé São Bráz mostrou-se mais diferenciado. Esse padrão resultou do compartilhamento de oito espécies entre os igarapés de 1ª e 2ª ordem e pela ocorrência de seis espécies exclusivas do igarapé de 3ª ordem.

Em estudos realizados por Araújo-Lima *et al.* (1999), Mendonça (2002) e Anjos (2005) também foram observadas diferenças na ocorrência de espécies em relação ao tamanho estrutural dos igarapés, seja pela presença ou ausência das mesmas ou pela mudança em relação ao tamanho corporal destas em igarapés de maior ordem. Assim, a exclusividade das espécies observadas apenas no igarapé São Bráz pode ser explicada pela relação entre a ocorrência de maior riqueza de espécies em igarapés de maior ordem (Lowe-McConnell, 1999) e a possível limitação que as menores dimensões físicas dos riachos de menor ordem

podem impor sobre a ocorrência de peixes de maior porte (Anjos 2005) – como *Acestrorhyncus falcatus*, espécie observada apenas nesse igarapé.

Os igarapés são ambientes de água doce que possuem ictiofauna ricas e diferenciadas dos rios principais. Esses ambientes são susceptíveis a degradação devido a efeitos antropogênicos oriundos do desmatamento e urbanização desordenada (Silva, 1995; Anjos, 2008). Os igarapés investigados na região de Santarém mostraram sinais de perturbação na composição da comunidade de peixes local que podem estar associados a efeitos antrópicos do uso dos igarapés pelas populações locais. Estudos adicionais são necessários para se avaliar os impactos da alteração ambiental no entorno dos igarapés sobre a estrutura das comunidades ictíicas. Adicionalmente, enfatizamos a carência de dados sobre igarapés urbanos e periurbanos da região amazônica e a necessidade de políticas efetivas de monitoramento e proteção da biodiversidade nesses ambientes.

Agradecimentos

Ao ICMBio por permitir a realização das coletas (licença SISBIO-32653-1). A CAPES pela Bolsa de Mestrado concedida a MPAS (Prog. De Recursos Naturais da Amazônia – UFOPA). Aos amigos do LGBio pelo apoio nas coletas de campo. Aos membros da banca examinadora pelas valiosas contribuições para a melhoria do manuscrito.

Literatura citada

ARDURA, A. *et al.* DNA barcoding for conservation and management of Amazonian commercial fish. *Biological Conservation*. v. 143, p. 1438-1443, 2010.

- ANJOS, M.B. Estrutura de comunidades de peixes de igarapés de terra firme na Amazônia Central: composição, distribuição e características tróficas. Originalmente apresentada como dissertação de mestrado. INPA/UFAM, Manaus - Amazonas. 2005.
- ANJOS, M. B, ZUANON, J. Sampling effort and fish species richness in small *terra firme* forest streams of central Amazonia. Brasil. Neotropical Ichthyology, v. 5 (1), p. 45-52, 2007.
- ABELL, R. *et al.* Freshwater Ecoregions of the World: A new Map of Biogeographic Units for Freshwater Biodiversity Conservation. BioScience, v. 58(5), mai. 2008.
- BAYLEY, P.B. & M.PETREIRE JR, M. Amazon Fisheries: Assessment Methods, Current Status and Management Options. p.385-398. In: Dodge, D. P. (Ed). Proceedings of the International Large River Symposium. Can. Spec. Publ.Fish. Aquat. Sci. 106. 1989.
- BARBOSA, R.P.; FREITAS, C.E. de C. & SANTOS, S.M. dos. The fish community of na upland stream in the Central Amazon (Presidente Figueiredo – Amazonas - Brasil). Acta Limnologica Brasiliensis, v. 15(2), p. 37-41, 2003.
- BERTACO, V. A. & GARUTTI, V. New *Astyanax* from the upper rio Tapajós drainage, Central Brazil (Characiformes: Characidae). Neotropical Ichthyology, v. 5(1), p. 25-30, 2007.
- BIRINDELLI, J.L.O.; SOUSA, L.M. & PÉREZ, M.H.S. New species of thorny catfish, genus *Leptodoras* Boulenger (Siluriformes: Doradidae), from Tapajós and Xingu basins, Brasil. Neotropical Ichthyology, v. 6(3), p. 465-480, 2008.
- BÖHLKE, J.E.; WEITZMAN, H.S.; MENEZES, N.A. Estado atual da sistemática dos peixes de água doce da América do Sul. Acta Amazônica, v. 8, p. 657-677, 1978.
- BUHRNHEIM, C. M. & C. COX-FERNANDES. Structure of fish assemblages in Amazonian rain-forest streams: effects of habitats and locality. Copeia, v. 2. p.255-262, 2003.
- CASTRO, R. M. C. Evolução da ictiofauna de riachos sul-americanos: padrões gerais e possíveis processos causais, p. 139–155. In: CARAMASCHI, E. P.; MAZZONI, R.; PERES-NETO, P. R. (Eds.). Ecologia de Peixes de Riachos. Série Oecologia Brasiliensis, v. 6, Programa de Pós-graduação em Ecologia-Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil. 1999.
- COLWELL, R. K. EstimateS: Statistical estimation of species richness and shared species from samples. Version 8. Persistent URL<purl.oclc.org/estimates>. 2006.
- COSTA. W. J. E. M. *Rivulus kayabi*, a new killifish from the Tapajós river basin, southern Brazilian Amazon (Cyprinodontiformes: Rivulidae). Ichthyol. Explor. Freshwaters, v. 18(4), p. 345-350, 2007.
- ESPIRITO-SANTO, H. M. V. *et al.* Seasonal variation in the composition of fish assemblage in small Amazonian forest streams: evidence for predictable changes. Freshwater Biology, v. 54, p. 536-548, 2009.

FERREIRA, S.J.F. *et al.* Efeito da pressão antrópica sobre igarapés na Reserva Florestal Adolpho Ducke, área de floresta na Amazônia Central. *Acta Amazônica*, v. 42(4), p. 533-540, 2012.

GODOI, D. S. Diversidade e Hábitos Alimentares de Peixes de Afluentes do Rio Teles Pires, Drenagem do Rio Tapajós, Bacia amazônica. Originalmente apresentada como tese de doutorado. UNESP, Jaboticabal – São Paulo. 2008.

HAMMER, Ø., HARPER, D.A.T., and RYAN, P. D. PAST: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. *Palaeontologia Electronica*, v. 4(1), 2001.

JUNK, W. J. As águas da Região Amazônica, p. 45–100. In: SALATI, E. *et al.* (Eds). *Amazônia: Desenvolvimento, Integração e Ecologia*. Ed. Brasiliense. São Paulo, Brasil. 1983.

KULLANDER, S.O. & FERREIRA, E.J.G. A review of the South American cichlid genus *Cichla*, with descriptions of nine new species (Teleostei: Cichlidae). *Ichthyol. Explor. Freshwaters*, v. 17(4), p. 289-398, 2006.

LEVEQUE, C. *et al.* Global diversity of fish (Pisces) in freshwater. *Hydrobiologia*, v. 595: p 545-567, 2008.

LOWE-MCCONNELL, R.H. Estudos ecológicos de comunidades de peixes tropicais. (A.E.A.M. Vazzoler, A.A. Agostinho & P.T.M. Cunningham, trad.). EDUSP. São Paulo, 1999.

LUCENA, C. A. S. New characid fish, *Hyphessobrycon scutulatus* from the rio Teles Pires drainage, upper rio Tapajós system (Ostariophysi: Characiformes: Characidae). *Neotropical Ichthyology*, v. 1(2), p. 93-96, 2003.

LUCENA, Z.M.S. & MALABARBA, L.R. Descrição de nove espécies novas de *Phenacogaster* (Ostariophysi: Characiformes: Characidae) e comentários sobre as demais espécies do gênero. *Zoologia*, v. 27(2), p. 263-304, 2010.

LUNDBERG, J.G. *et al.* So many fishes, so little time: An overview of recente ichthyological discovery in Continental Waters. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, v. 87(1), 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. 751-764, 2005.

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE/SECRETARIA DE BIODIVERSIDADE E FLORESTAS. Avaliação e identificação de áreas e ações prioritárias para a conservação, utilização sustentável e repartição dos benefícios da biodiversidade nos biomas brasileiros. Brasília, 2002. 404 p.

MONTAG, L.F.A. *et al.* Os peixes da Floresta Nacional de Caxiunã (municípios de Melgaço e Portel, Pará - Brasil). *Bol. Mus. Para. Emílio Goeldi. Ciências Naturais*, Belém, v. 3(1), p. 11-34, jan-abr. 2008.

OLIVEIRA, R. R. de. *et al.* *Peckoltia compta*, a new species of catfish from the Brazilian Amazon, rio Tapajós basin (Siluriformes: Loricariidae). *Zootaxa*, v. 2534, p. 48-56, 2010.

PAZIN, V. F. V. Assembleias de peixes em poças temporárias marginais a riachos de terra, Amazônia Central. Originalmente apresentada como dissertação de mestrado. UFAM/INPA, Manaus – AM. 2004.

PAZIN, V.F.V.; MAGNUSSON, W.E.; ZUANON, J. & MENDONÇA, F.P. Fish assemblages in temporary ponds adjacent to ‘terra-firme’ streams in Central Amazonia. *Freshwater Biology*, v. 51(1), p. 1025-1037, 2006.

REZENDE, C. F. Estrutura da comunidade de macroinvertebrados associados ao folhiço submerso de remanso e correnteza em igarapés da Amazônia Central. *Biota Neotropica*, v. 7 (n2), 2007.

RIBEIRO, O. M. & ZUANON, J. Comparação da eficiência de dois métodos de coleta de peixes em igarapés de terra firme da Amazônia Central. *Acta Amazônica*, v. 36(3), p. 369-394, 2006.

ROBERTS, T. R. Ecology of fishes in the Amazon and Congo basins. *Bull. Mus. Comp. Zool. Harvard*. v. 143: p 117-147, 1972.

SANTOS, G. M., & FERREIRA, E. J. G. Peixes da Bacia Amazônica, p. 345–373. In: LOWE-MCCONNELL, R. H.. *Estudos Ecológicos de Comunidades de Peixes Tropicais*. Editora da Universidade de São Paulo. São Paulo, Brasil. 1999.

SILVA, C.P.D. Community structure of fish in urban and natural streams in the Central Amazon. *Amazoniana*, XIII (3/4): 221-236. 1995.

SIOLI, H. *Amazônia: Fundamentos da Ecologia da maior região de florestas tropicais*. Ed. Vozes. Petrópolis, Rio de Janeiro. 1985.

UIEDA, V.S. & CASTRO, R.M.C. Coleta e fixação de peixes de riachos. In: CARAMASCHI, E.P.; MAZZONI, R. & PERES-NETO, P.R. (eds). *Ecologia de Peixes de Riachos*. Série Oecologia Brasiliensis, v. 6. PPGE- UFRJ. Rio de Janeiro. Brasil. 1999.

Títulos das Tabelas

Tabela 1 – Valores médios de parâmetros ambientais em três igarapés do baixo rio Tapajós, PA. Largura (Larg), Profundidade (Prof.), velocidade da corrente (VC), taxas de oxigênio dissolvido (O₂), potencial hidrogeniônico (pH) e temperatura (Tmp).

Tabela 2 – Composição e abundância da ictiofauna de três igarapés da região de Santarém-PA, baixo rio Tapajós.

Tabela 3: Medidas de riqueza e diversidade em três igarapés do baixo rio Tapajós, PA.

Legendas das Figuras

Fig. 1: Mapa de localização da área de estudo na margem direita do rio Tapajós nas proximidades de Santarém e Alter do Chão, estado do Pará, Brasil. Áreas coloridas em amarelo correspondem as microbacias dos Igarapés UDV (1) e São Bráz (2) e do Igarapé Sonrisal (3). Os círculos em vermelho representam as áreas urbanas de Santarém (S) e Alter do Chão (AC). Linhas tracejadas indicam as rodovias principais.

Fig. 2: Espécies registradas no presente estudo: 1- *Potamorrhaphis guianensis*; 2- *Copella nigrofasciata*; 3- *Helogenes marmoratus*, 4- *Bryconops giacopinii*; 5- *Crenuchus spilurus*; 6- *Hoplias malabaricus*; 7- *Aequidens tetramerus*; 8- *Iguanodectes variatus*; 9- *Rivulus dibaphus*; 10- *Microsternarchus bilineatus*; 11- *Apistogramma hippolytae*; 12- *Hyphessobrycon heterorhabdus*; 13- *Gymnotus anguillar*; 14- *Nannostomus marginatus*; 15- *Hemigrammus vorderwinklery*; 16- *Gymnorhamphichthys petiti*; 17- *Tatia* aff. *dunni*; 18- *Otocinclus vittatus*; 19- *Denticetopsis* sp.; 20- *Acestrorhynchus falcatus*.

Fig. 3: Curva acumulativa de espécies em função de esforço amostral padronizado em três igarapés do baixo rio Tapajós. As amostras dos igarapés UDV, São Braz e Sonrisal foram agrupadas e a riqueza estimada pelo método Jackknife de 1ª ordem.

Fig. 4: Relações de similaridade com base na composição de espécies entre os igarapés UDV (1ª ordem) e Sonrisal (2ª ordem) e São Braz (3ª ordem).

Fig. 5: Proporção do número de Espécies por Ordem da ictiofauna de três igarapés da região do baixo rio Tapajós, PA.

Capítulo 2

***DNA barcoding* da ictiofauna de quatro igarapés da bacia do rio Tapajós, região de Santarém, Pará¹**

**Marcos Paulo Alho de Sousa
Luís Reginaldo Ribeiro Rodrigues**

¹ Manuscrito de artigo científico a ser submetido ao periódico Mitochondrial DNA (ISSN: 1940-1736)

Resumo

A ferramenta DNA *barcoding* é largamente utilizada na identificação taxonômica de espécies de peixes, sejam marinhos ou de água doce. O uso de DNA *barcoding* pode ser útil no avanço do conhecimento da ictiofauna em regiões altamente diversas, tais como a bacia Amazônica. No presente trabalho analisamos DNA *barcoding* (COI) de peixes de quatro igarapés da região do baixo rio Tapajós visando à caracterização molecular das espécies registradas. Das 28 espécies registradas foram obtidas 69 sequências de DNA *barcoding* representativas de 12 espécies. A distância intraespecífica variou de 0 a 18.2%. As espécies *Hyphessobrycon heterorhabdus*, *Bryconops giacopinii*, *Aequidens tetramerus* apresentaram distâncias intraespecíficas médias acima de 2%. Tal variação pode ser explicada por erro de identificação taxonômica com base na morfologia ou pela presença de espécies crípticas nas amostras.

Palavras-chave: bacia amazônica, igarapés, DNA *barcoding*, rio Tapajós

Introdução

A bacia amazônica possui uma complexa rede de pequenos riachos, localmente conhecidos como igarapés, que cortam as florestas e abrigam uma ictiofauna bem diferenciada, daquela encontrada nos canais principais. Nos igarapés observa-se a predominância de espécies endêmicas, de pequeno porte e que são bem menos conhecidas ou estudadas que as espécies amazônicas de maior valor comercial (Lowe-McConnell, 1999).

Em geral, a ictiofauna da bacia amazônica é dominada por representantes da superordem Ostariophysi, com 85% das espécies, das quais os Characiformes são o grupo mais abundante (43%), seguido por Siluriformes (39%) e Gymnotiformes (3%). Vários autores consideram deficiente o nível de conhecimento sobre a ictiofauna em ambientes fluviais de pequeno porte, como os igarapés (Castro, 1999; Anjos & Zuanon, 2007) e a cada ano, novas espécies de água doce estão sendo descritas para essa região (Oliveira *et al.*, 2010; Maxime *et al.*, 2011; Ribeiro *et al.*, 2011).

Os ecossistemas de água doce representam apenas 0.8% da superfície terrestre, mas abrigam uma enorme biodiversidade. Estima-se que proporcionalmente a perda de biodiversidade é maior nos ecossistemas de água doce em comparação com ecossistemas terrestres e oceânicos. Adicionalmente, ecossistemas de água doce têm recebido menores esforços de conservação em larga escala e um dos principais fatores diagnosticados como causadores desse quadro é o baixo nível de informação sistematizada sobre a distribuição das espécies de peixes (Abell *et al.*, 2008). Portanto, considerando-se que a bacia amazônica abriga um elevado número de espécies endêmicas, e que os atuais processos de alteração ambiental ocasionam riscos à biodiversidade aquática, as estratégias de conservação necessárias para proteger a biodiversidade e mitigar os impactos oriundos das atividades antropogênicas demandam por uma base primária de dados sobre a taxonomia e distribuição das espécies.

A identificação taxonômica de espécies biológicas com base em caracteres morfológicos, geralmente, é um processo lento que requer a análise por um especialista no táxon. Diante da necessidade de prover rapidamente informações básicas sobre a biodiversidade visando à conservação das espécies foi adotada a metodologia de identificação molecular baseada em um marcador genético denominada de DNA barcoding (Herbert *et al.*, 2003).

As análises de sequências de DNA têm sido usadas por 30 anos para auxiliar a identificação de espécies, no entanto, diferentes sequências são usadas em diferentes grupos taxonômicos e em diferentes laboratórios (Ward *et al.*, 2005). O DNA barcoding, proposto por Hebert *et al.* (2003), tem sido largamente utilizado como uma poderosa ferramenta padronizada para a identificação, tendo como principal pressuposto de sua eficácia a verificação de que a distância genética intraespecífica deve ser menor do que a distância genética interespecífica (WARD *et al.*, 2008). Em animais, a região que foi padronizada como etiqueta molecular é um segmento de 650 pares de bases da região 5' do gene mitocondrial da Citocromo Oxidase subunidade I (*COI*). Este marcador DNA barcoding já demonstrou alta eficiência na identificação taxonômica de diferentes grupos, como aves (Kerr *et al.*, 2007), mamíferos (Borisenko *et al.*, 2007), insetos (Hebert *et al.*, 2004) e peixes (Steinke *et al.*, 2009).

O Fish-BOL (Fish Barcode of Life Initiative) criado com o intuito de se estabelecer uma biblioteca de referências de *barcodes* de DNA para todas as espécies de peixes derivadas de espécimes testemunhos (*vouchers*) com confiável identificação taxonômica, apresenta em seu próprio website (acessado em 15.07.2013), um total de 88757 *barcodes* de espécimes realizados, sendo 9769 espécies com seus *barcodes* gerados, e dentre estas, 1935 são espécies que ainda não possuem uma descrição.

No presente trabalho utilizamos o DNA *barcoding* para investigar a diversidade taxonômica da ictiofauna de quatro igarapés da bacia do rio Tapajós, visando à caracterização molecular desse componente da biodiversidade amazônica e criando subsídios para a conservação das espécies de peixes de igarapé.

Materiais e métodos

Amostragem

No período de janeiro a setembro de 2012 foram realizadas oito coletas para captura de peixes em quatro igarapés da região do rio Tapajós (Figura 1). O igarapé São Bráz foi amostrado em três coletas, enquanto que os igarapés UDV e Sonrisal duas e o igarapé Branco uma. As coletas foram realizadas em parcelas aquáticas delimitadas em 50m e as capturas foram feitas com redes de cerco e peneiras seguindo protocolo descrito por Mendonça *et al.* (2005).

Os espécimes testemunho foram fixados em formol 10% e preservados em etanol a 70%. A identificação taxonômica foi executada por taxonomista especializado com o auxílio de chaves de identificação. De cada exemplar coletado foi obtida fotografia e amostras de tecido muscular preservadas em etanol 96GL. Os espécimes testemunho (vouchers) foram depositados na Coleção Ictiológica do Instituto de Ciência e Tecnologia das Águas – ICTA/UFOPA sob os números de acesso: UFOPA-I-336 a UFOPA-I-404.



Figura 1: Mapa de localização dos sítios de coleta de peixes de igarapés da bacia do rio Tapajós associados a sequências de DNA barcoding depositadas no BOLD.

Extração de DNA genômico, PCRs e sequenciamento de DNA barcodes

As amostras de tecido foram processadas com o kit PHIRE Animal Tissue Direct PCR (ThermoScientific) seguindo as instruções do fabricante.

O *DNA barcode*, fragmento 5' do gene mitocondrial *COI*, foi amplificado por reação em cadeia da polimerase (PCR) pelo método direct-PCR utilizando-se os *primers* FishF1-5'TCAACCAACCACAAAGACATTGGCAC3'; FishR1-5'TAGACTTCTGGGTGGCCAAAGAATCA3' (Ward *et al.*, 2005). As reações foram constituídas em volume de 20µl contendo: 6,6µl de água ultrapura, 1µl de DNA genômico,

10µl de tampão de PCR 2X PHIRE, 1µl de cada primer a 5µM, 0,4µl de PHIRE Hotstart DNA polimerase.

O programa de reação foi estabelecido como segue: 98°C de desnaturação inicial por 5 minutos, seguido de 40 ciclos de desnaturação a 98°C por 5 segundos, anelamento a 60°C por 5 segundos e extensão a 72°C por 20 segundos, e 1 ciclo de extensão final a 72°C por 1 minuto. Ao final da amplificação, os fragmentos de *COI* foram examinados em gel de Agarose 0.8% corados com GelRed (Biotium-Uniscience). Os produtos de reações positivas foram purificados usando-se o reagente Exosap-it (Invitrogen).

Na reação de sequenciamento usamos o primer FishF1, seguindo-se o método didesoxiterminal de Sanger utilizando-se o kit BigDye® Terminator v3.1 *Cycle Sequencing* (Applied Biosystems) e as sequencias foram analisadas por eletroforese capilar no sequenciador automático ABI3500XL (Applied Biosystems).

Análise de dados

As sequencias foram inspecionadas com auxílio do programa GeneiousPro 4.8.5 (Biomatter Ltd.) para seleção das reads com alta qualidade e descarte das sequencias de baixa qualidade. As sequencias foram alinhadas automaticamente com auxílio do programa ClustalW implementado no BioEdit (Hall, 1999) utilizando-se uma sequencia barcode padronizada de *Hoplias malabaricus* baixada do genbank (HM405124.1 – gi300198988). A ocorrência de inserções/deleções e códons de parada prematuros, assim como a correta caixa de leitura foram inspecionadas e editadas manualmente com auxílio do programa GeneiousPro.

As planilhas padronizadas de metadados, as fotografias dos vouchers, os trace files e as sequencias editadas foram depositadas no repositório BOLD (www.boldsystems.org) associadas ao projeto Peixes de igarapés da bacia do Tapajós (IGTAP). As sequencias foram analisadas com auxílio das ferramentas do BOLD (*Taxon IDTree*, *Distance Summary e Barcode Gap analysis*). Para a reconstrução filogenética e cálculo das distâncias genéticas utilizamos o modelo evolutivo Kimura-2-parâmetros. As demais análises foram realizadas através do programa MEGA versão 5 (Tamura *et al.*, 2011) usando o modelo Kimura-2-parâmetros com método bootstrap em 1000 réplicas.

Resultados

Foram obtidos 69 *COI barcodes* de 12 espécies representantes de oito famílias. Todas as sequências amplificadas foram maiores que 600 nucleotídeos e não se observou inserções/deleções ou códons de parada (*stop codons*). As tentativas de amplificação em amostras de *Nannostomus marginatus* foram mal sucedidas. Das 12 espécies analisadas somente três já possuíam DNA *barcodes* depositadas em repositórios públicos, *Aequidens tetramerus*, *Hoplias malabaricus* e *Otocinclus vittatus*.

Todas as espécies formaram grupos bem delimitados pelo método de agrupamento de vizinhos, com exceção de *Hyphessobrycon heterorhabdus* que incluiu um indivíduo de *Hemigrammus* sp.n. As espécies mostraram ramos pouco profundos exceto em *Bryconops giacopinii*, *Aequidens tetramerus* e *H. heterorhabdus* (Figura 2). A distância intraespecífica foi avaliada em 10 espécies (n=67) e mostrou o valor mínimo de 0.0 em *Iguanodectes variatus*, *Gymnotus coropinae* e *Microsternarchus bilineatus*, valor médio de 4.78% e máximo de 18.229%, o erro padrão foi de 0.02% em 330 comparações. A análise de *barcoding gap* revelou três espécies com distâncias intraespecíficas médias acima de 2%, sendo que entre elas apenas *H. heterorhabdus* mostrou ausência de *barcoding gap* em relação ao vizinho mais próximo (*Hemigrammus* sp. n.) visto que a distância intraespecífica máxima em *H. heterorhabdus* (17.16%) superou a distância para o vizinho mais próximo (14.98%), Tabela 1.

Tabela 1: Espécies com distâncias intraespecíficas médias e máximas >2% no marcador DNA barcode *COI* em peixes de igarapé da bacia do Tapajós. D=distância, NE=espécie vizinha mais próxima, NN=indivíduo vizinho mais próximo.

Família	Espécie	Dintra (med)%	Dintra (max)%	D (NN)%	NE	NN
Characidae	<i>Bryconops giacopinii</i>	7.38	18.23	19.68	<i>Hoplias malabaricus</i>	IGTAP065-13
Characidae	<i>Hyphessobrycon heterorhabdus</i>	7.67	17.16	14.98	<i>Hemigrammus</i> sp. n	IGTAP060-13
Cichlidae	<i>Aequidens tetramerus</i>	6.09	12.05	21.24	<i>Gymnotus coropinae</i>	IGTAP062-13

O grupo *Hyphessobrycon heterorhabdus*, incluindo *Hemigrammus* sp.n, evidencia quatro linhagens claramente divergentes com elevada distância genética (Tabela 2); uma delas é formada pelo espécime único de *Hemigrammus* sp.n, enquanto que as outras três são constituídas por indivíduos do igarapé São Bráz, do igarapé Branco e o último clado resultou da associação de indivíduos dos igarapés Sonrisal e UDV (Figura 2). A comparação do grupo

Hyphessobrycon-Hemigrammus com sequencias barcode de *Hyphessobrycon santae*, *H. bifasciatus*, *H. eques* obtidas do genbank/BOLD (HM405126; HM422469; AAC1024, AAC7094, AAO6235, ABY4383, AAX1888, AAC8988, AAX1886, respectivamente) resultou uma topologia semelhante ao padrão de agrupamento observado na figura 2, indicando uma clara divergência entre esse grupo e as espécies de referência.

Tabela 2: Distâncias genéticas médias entre as linhagens evidenciadas no grupo *Hyphessobrycon-Hemigrammus*.

Grupo	Distância (K2P)			
Branco				
Sonrisal	0.090			
<i>Hemigrammus</i> sp. n	0.133	0.138		
São Bráz	0.145	0.149	0.133	
UDV	0.086	0.005	0.139	0.150

O clado formado pelos espécimes de *Bryconops giacopinii* mostra uma nítida separação entre indivíduos do igarapé Sonrisal e do igarapé São Bráz cuja distância média foi de 15.7%. Uma comparação das sequencias DNA barcode de *B. giacopinii*, presente estudo, com sequencias de *B. affinis* e *Bryconops* sp. obtidas do genbank (HM405071; HM562853, respectivamente) mostrou que os espécimes do igarapé Sonrisal agruparam com *B. affinis*, enquanto que os do igarapé São Bráz associaram-se com *Bryconops* sp. (Figura 3).

Os DNA *barcodes* de indivíduos identificados como *Aequidens tetramerus* foram comparados com sequencias de *A. tetramerus* e *A. diadema*, obtidas do genbank (EU888037; GU817291, respectivamente). Dos quatro exemplares analisados no presente trabalho, apenas um (LGB#P-115) mostrou maior afinidade filogenética com *A. tetramerus*, enquanto que os demais (LGB#P-114, 116 e 117) agruparam mais próximo de *A. diadema* (Figura 4).

Discussão

A utilização do *barcoding* como ferramenta de identificação é bem sucedida em diversos trabalhos com peixes, sejam marinhos (Ward *et al*, 2009) ou de água doce (Ortiz, 2010), com grande eficiência na associação entre a identificação morfológica e a molecular, sendo a ocorrência do *barcoding gap* uma das premissas dessa técnica para a determinação da identificação de uma espécie, onde a distancia intraespecífica deve ser menor que a

interespecífica. A distância intraespecífica mínima de 3,5% em peixes, segundo Ward *et al.*, (2009), também é adotada na delimitação de espécies.

A elevada divergência intraespecífica observada nas espécies *Bryconops giacopinii*, *Aequidens tetramerus* e *Hyphessobrycon heterorhabdus* poderia ser explicada por três hipóteses: 1) as linhagens são muito antigas e teriam acumulado uma alta variação molecular; 2) o padrão observado poderia ter resultado de erro de identificação taxonômica a partir dos caracteres morfológicos e 3) esses grupos poderiam incluir representantes de espécies novas ainda desconhecidas da ciência.

Apesar da metodologia *DNA barcoding* apresentar uma elevada taxa de acerto quando confrontada com o método tradicional baseado em morfologia, divergências entre a identificação morfológica e a molecular tem sido observados e são relatados em outros trabalhos (Rock *et al.*, 2008; Ortiz, 2010; Lara *et al.*, 2011).

Considerando que os peixes de igarapés amazônicos são pouco conhecidos e que novas espécies estão sendo descritas a cada ano, grupos cuja taxonomia é bastante discutida, tal como Characiformes, devem passar por revisões taxonômicas modernas levando em conta a variabilidade molecular (Oliveira *et al.*, 2013).

As divergências observadas entre as sequências de *Bryconops giacopinii* dos igarapés São Brás e Branco/Sonrisal sugerem nova revisão na morfologia desses espécimes para que ocorra maior certeza na identificação dos mesmos, visto que a partir dos resultados apresentados aqui, há grande possibilidade de que as sequências tratam espécies diferentes de *Bryconops*. Da mesma maneira, a similaridade entre as espécies de *Aequidens tetramerus* com as demais sequências obtidas no genbank e os dois clado formados, sugerem a ocorrência de mais de uma espécie.

Em *H. heterorhabdus*, os resultados apresentaram alta separação entre os indivíduos analisados, de acordo com os locais onde foram coletados, demonstrando alta variação nucleotídica dentro dessa mesma espécie. Os espécimes do São Brás apresentaram ainda maior similaridade com a espécie *Hemigrammus sp.n.* Análises mais detalhadas devem ser realizadas nesse grupo, afim de que haja maior certeza se verdadeiramente tratam-se de diferentes espécies ou se *Hyphessobrycon heterorhabdus* pode ser considerada uma espécie com alta variação nucleotídica nos ambientes analisados.

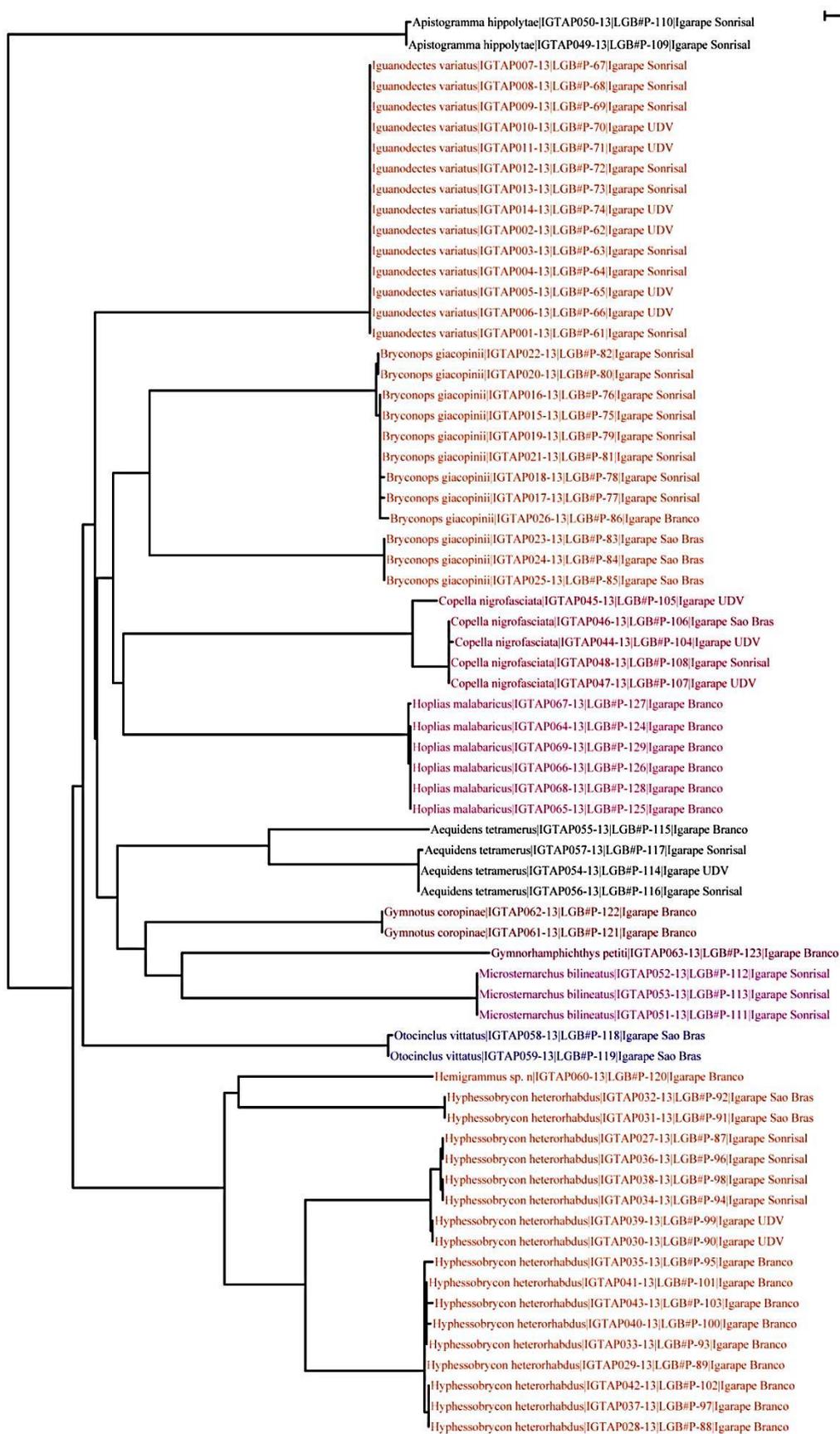


Figura 2: Árvore *Neighbour-Joining* das sequências de *COI* das 12 espécies obtidas, gerada a partir da ferramenta *Taxon IDTree*. As cores indicam diferentes agrupamentos familiares.

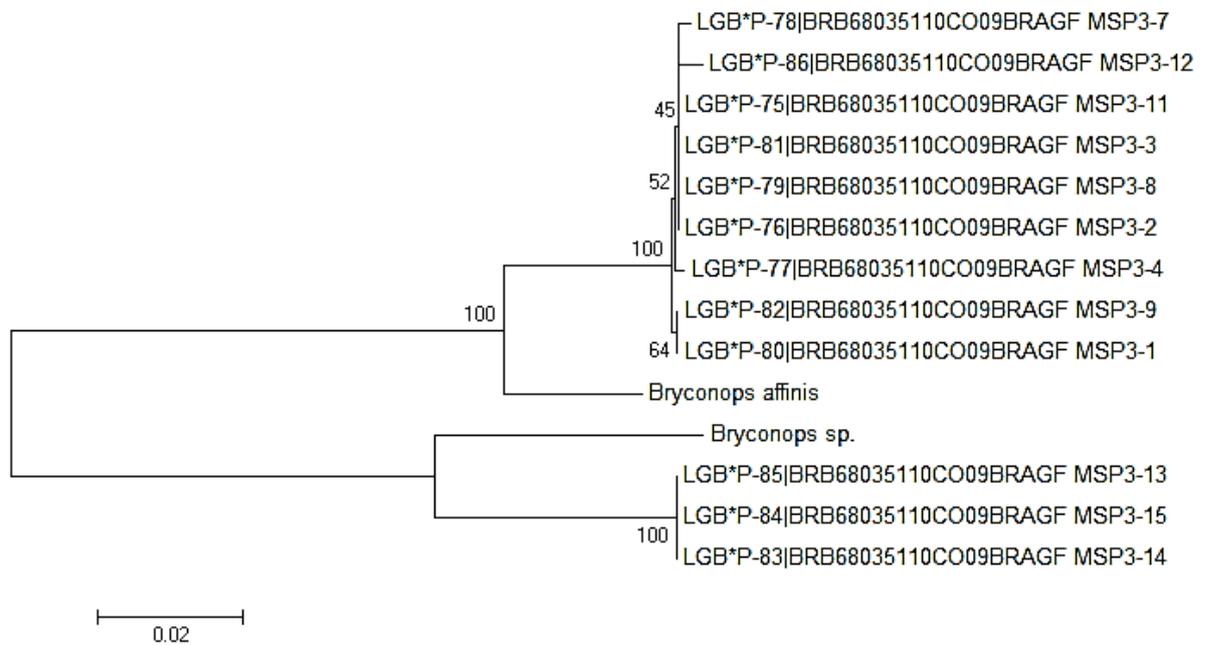


Figura 3: Árvore *Neighbour-Joining* do grupo *Bryconops giacopinii* comparado com espécies congêneres cujas sequencias DNA *barcoding* foram obtidas do Genbank. Os valores nos ramos indicam o suporte de *Bootstrap*.

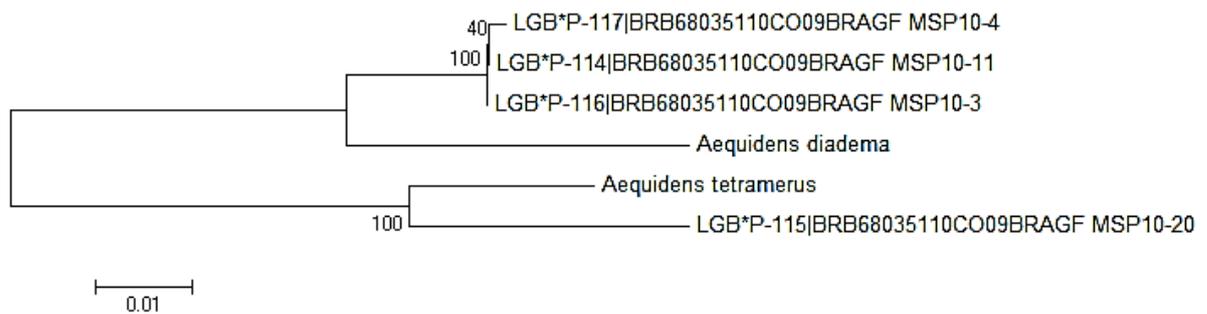


Figura 4: Árvore *Neighbour-Joining* do grupo *Aequidens tetramerus* comparado com espécies congêneres cujas sequencias DNA *barcoding* foram obtidas do Genbank. Os valores nos ramos indicam o suporte de *Bootstrap*.

O número de espécies e de indivíduos analisados impedem conclusões mais precisas e maiores inferências nos grupos analisados, no entanto, servem de base para posteriores estudos nesse grupo de animais nos mesmos ou em ambientes similares, visto que, os dados aqui apresentados demonstram a riqueza de informações obtidas em ambientes pouco analisados.

O uso de *DNA barcoding* no estudo da ictiofauna brasileira encontra-se em sua fase inicial a partir da implantação da rede BrBOL (www.brbol.org.br). Espera-se que nos próximos anos ocorra um rápido avanço do conhecimento sobre a diversidade ictiofaunística do Brasil em função da adoção dos métodos baseado em identificação molecular. Para maior clareza do status taxonômico dos exemplares aqui relatados nos grupos *Bryconops*, *Aequidens* e *Hyphessobrycon* são necessárias à ampliação da base de dados moleculares (DNA barcodes) assim como a criteriosa revisão dos caracteres diagnósticos de cada grupo.

Conclusão

Das espécies analisadas, apenas *Bryconops giacopinii*, *Hyphessobrycon heterorhabdus* e *Aequidens tetramerus* não se apresentaram como uma única espécie através da identificação molecular por meio do barcoding. Tais espécies necessitam ser averiguadas com maior acurácia tanto em sua identificação morfológica quanto em relação às análises moleculares, no caso, por meio do barcoding.

Agradecimentos

Aos amigos do LGBio que auxiliaram na realização deste trabalho. Ao ICMBio pela licença concedida (SISBIO 32653-1). Aos colegas do Laboratório de Genética UFPA/Bragança e LTBM - INPA. A CAPES pela bolsa de mestrado a MPAS, PPG Recursos Naturais da Amazônia/UFOPA (Turma2011). Parte deste trabalho foi subsidiada pelo projeto Rede de DNA barcoding da Ictiofauna do Brasil (BrBOL), subprojeto 09.

BIBLIOGRAFIA

- ABELL, R. *et al.* (2008). Freshwater Ecoregions of the World: A new Map of Biogeographic Units for Freshwater Biodiversity Conservation. **BioScience**, v. 58(5).
- ANJOS, M. B, ZUANON, J. (2007). Sampling effort and fish species richness in small *terra firme* forest streams of central Amazonia. Brasil. **Neotropical Ichthyology**. V. 5 (1). p. 45-52.
- BAYLEY, P.B. & M.PETREIRE JR, M. (1989). Amazon Fisheries: Assessment Methods, Current Status and Management Options. p.385-398. In: Dodge, D. P. (Ed). **Proceedings of the International Large River Symposium**. Can. Spec. Publ.Fish. Aquat. Sci. 106.
- BORISENKO, A.V.; LIM, B.K.; IVANOVA, N.V.; HANNER, R.H.; HEBERT, P.D.N. (2007). DNA barcoding in surveys of small mammal communities: a field study in Suriname. **Molecular Ecology Resources**, v 8(3), p. 471–479.
- BROWER, A.V.Z. (2006). Problems with DNA barcodes for species delimitation: ‘ten species’ of *Astrartes fulgerator* reassessed (Lepdoptera: Hesperidae). **Systematics and Biodiversity**, v 4 (2), p. 127-132.
- CASTRO, R. M. C. (1999). Evolução da ictiofauna de riachos sul-americanos: padrões gerais e possíveis processos causais, p. 139–155. In: CARAMASCHI, E. P.; MAZZONI, R.; PERES-NETO, P. R. (Eds.). **Ecologia de Peixes de Riachos**. Série Oecologia Brasiliensis, v. 6, Programa de Pós-graduação em Ecologia-Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil.
- GALTIER, N.; NABHOLZ, B.; GLÉMIN, S.; HURST, G.D.D. (2009). Mitochondrial DNA as a marker of molecular diversity: a reappraisal. **Molecular Ecology**, v 18, p. 4541-4550.
- HEBERT, P.D.N.; CYWINSKA, A.; BALL, S.L.; DEWAARD, J.R. (2003). Biological identifications through DNA barcodes. **Philosophical transactions of The Royal Society B**. v. 270, p 313-321.
- HEBERT, P.D.N. *et al.* (2004). Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astrartes fulgerator*. **PNAS**, v. 101(41), p. 14812-14817.
- HICKERSON, M.J.; MEYER, C.P.; MORITZ, C. (2006). DNA Barcoding Will Often Fail to Discover New Animal Species over Broad Parameter Space. **Syst. Biol.**, v 55(5), p. 729– 739.
- KERR, K.C.R.; STOECKLE, M.Y.; DOVE, C.J.; WEIGT, L.A.; FRANCES, C.M.; HEBERT, P.D.N. (2007). Comprehensive DNA barcode coverage of North American birds. **Molecular Ecology Notes**.
- LARA A.; PONCE DE LEÓN, J.L.; RODRIGUEZ, R.; CASANE, D.; CÔTÉ, G.; BERNATCHEZ, L.; MACHADO, G. (2010). DNA barcoding of Cuban freshwater fishes: evidence for cryptic species and taxonomic conflicts. **Molecular Ecology Resources**, v 10, p. 421-430.

- LIPSCOMB, D.; PLATNICK, N.; WHEELER, Q. (2003). The intellectual content of taxonomy: a comment on DNA taxonomy. **Trends in Ecology and Evolution**, v. 18(2).
- LOWE-McCONNELL, R.H. (1999). **Estudos ecológicos de comunidades de peixes tropicais**. (A.E.A.M. Vazzoler, A.A. Agostinho & P.T.M. Cunnhingham, trad.). EDUSP. São Paulo.
- MAXIME, E.L.; LIMA, F.C.T.; ALBERT, J.S. (2011). A new Species of Gymnotus (Gymnotiformes: Gymnotidae) from Rio Tiquié in Northern Brazil. **Copeia**, n° 1, p. 77-81.
- OLIVEIRA, R. R. de. *et al.* (2010). Peckoltia compta, a new species of catfish from the Brazilian Amazon, rio Tapajós basin (Siluriformes: Loricariidae). **Zootaxa**, v. 2534, p. 48-56.
- ORTIZ, M. F. (2010). **Validação do DNA Barcode como identificador de espécies: um estudo de ampla amostragem com o gênero Pseudoplatystoma (Siluriformes, Pimelodidae) na Amazônia**. Originalmente apresentada como dissertação de mestrado, INPA.
- RATNASINGHAM, S.; & HEBERT, P. (2007). BOLD: The Barcode of Life Data System (www.barcoding.life.org). **Molecular Ecology Notes**.
- RIBEIRO, F.R.V.; PEDROZA, W.S.; RAPP PY-DANIEL, L.H. (2011). A new species of *Nemuroglanis* (Siluriformes: Heptapteridae) from the rio Guariba, rio Madeira basin, Brazil. **Zootaxa**, v. 2799, p. 41-48.
- ROCK, J. *et al.* (2008). DNA barcodes of fish of the Scotia Sea, Antarctica indicate priority groups for taxonomic and systematics focus. **Antarctic Science**, v. 20(3), p. 253-262.
- STEINKE, D.; ZEMLAK, T. S.; BOUTILLIER, J.A.; HEBERT, P.D.N. (2009). DNA barcoding of Pacific Canada's fishes. **Mar Biol.** v. 156, p. 2641-2647.
- TAMURA, K.; PETERSON, D.; PETERSON, N.; STECHER, G.; NEI, M.; & KUMAR, S. (2011). Molecular Evolutionary Genetics Analysis Using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Method. **Molecular Biology and Evolution**, v. 28, p. 2731-2739.
- WARD, R.D.; ZEMLAK, T.S.; INNES, B.H.; LAST, P.R.; HEBERT, P.D.N. (2005). DNA barcoding Australia's fish species. **Philosophical transactions of The Royal Society B**, v. 360, p. 1847-1857.
- WARD, R.D. *et al.* (2008). DNA barcoding of shared fish species from the North Atlantic and Australia: minimal divergence for most taxa, but *Zeus faber* and *Lepidopus caudatus* each probably constitute two species. **Aquatic Biology**. v. 3, p. 71-78.
- WARD, R.D.; HANNER, R.; HEBERT, P.D.N. (2009). The campaign to DNA barcode all fishes, FISHBOL. **Journal of Fish Biology**, v. 74, p. 329-356.
- WIEMERS, M.; FIEDLER, K. (2007). Does the DNA barcoding gap exist? — a case study in blue butterflies (Lepidoptera: Lycaenidae). **Front. Zool.** v. 4: 8.

Material suplementar: Relação das amostras de tecido e voucher espécimes de peixes de igarapés da bacia do rio Tapajós associadas a sequencias de DNA barcode depositadas no BOLD.

No.	Sample ID	Field ID	Museum ID	Espécies	Exact Site
1	LGB#P-61	Msp 1-5	UFOPA-I-336	Iguanodectes variatus	Igarapé Sonrisal
2	LGB#P-62	Msp 1-15	UFOPA-I-337	Iguanodectes variatus	Igarapé UDV
3	LGB#P-63	Msp 1-8	UFOPA-I-338	Iguanodectes variatus	Igarapé Sonrisal
4	LGB#P-64	Msp 1-9	UFOPA-I-339	Iguanodectes variatus	Igarapé Sonrisal
5	LGB#P-65	Msp 1-14	UFOPA-I-340	Iguanodectes variatus	Igarapé UDV
6	LGB#P-66	Msp 1-19	UFOPA-I-341	Iguanodectes variatus	Igarapé UDV
7	LGB#P-67	Msp 1-3	UFOPA-I-342	Iguanodectes variatus	Igarapé Sonrisal
8	LGB#P-68	Msp 1-10	UFOPA-I-343	Iguanodectes variatus	Igarapé Sonrisal
9	LGB#P-69	Msp 1-11	UFOPA-I-344	Iguanodectes variatus	Igarapé Sonrisal
10	LGB#P-70	Msp 1-13	UFOPA-I-345	Iguanodectes variatus	Igarapé UDV
11	LGB#P-71	Msp1-18	UFOPA-I-346	Iguanodectes variatus	Igarapé UDV
12	LGB#P-72	Msp 1-2	UFOPA-I-347	Iguanodectes variatus	Igarapé Sonrisal
13	LGB#P-73	Msp 1-4	UFOPA-I-348	Iguanodectes variatus	Igarapé Sonrisal
14	LGB#P-74	Msp 1-12	UFOPA-I-349	Iguanodectes variatus	Igarapé UDV
15	LGB#P-75	Msp 3-11	UFOPA-I-350	Bryconops giacopinii	Igarapé Sonrisal
16	LGB#P-76	Msp 3-2	UFOPA-I-351	Bryconops giacopinii	Igarapé Sonrisal
17	LGB#P-77	Msp 3-4	UFOPA-I-352	Bryconops giacopinii	Igarapé Sonrisal
18	LGB#P-78	Msp 3-7	UFOPA-I-353	Bryconops giacopinii	Igarapé Sonrisal
19	LGB#P-79	Msp 3-8	UFOPA-I-354	Bryconops giacopinii	Igarapé Sonrisal
20	LGB#P-80	Msp 3-1	UFOPA-I-355	Bryconops giacopinii	Igarapé Sonrisal
21	LGB#P-81	Msp 3-3	UFOPA-I-356	Bryconops giacopinii	Igarapé Sonrisal
22	LGB#P-82	Msp 3-9	UFOPA-I-357	Bryconops giacopinii	Igarapé Sonrisal
23	LGB#P-83	Msp 3-14	UFOPA-I-358	Bryconops giacopinii	Igarapé São Brás
24	LGB#P-84	Msp 3-15	UFOPA-I-359	Bryconops giacopinii	Igarapé São Brás
25	LGB#P-85	Msp 3-13	UFOPA-I-360	Bryconops giacopinii	Igarapé São Brás
26	LGB#P-86	Msp 3-12	UFOPA-I-361	Bryconops giacopinii	Igarapé Branco
27	LGB#P-87	Msp 4-1	UFOPA-I-362	Hyphessobrycon heterorhabdus	Igarapé Sonrisal
28	LGB#P-88	Msp 4-34	UFOPA-I-363	Hyphessobrycon heterorhabdus	Igarapé Branco
29	LGB#P-89	Msp 4-40	UFOPA-I-364	Hyphessobrycon heterorhabdus	Igarapé Branco
30	LGB#P-90	Msp 4-17	UFOPA-I-365	Hyphessobrycon heterorhabdus	Igarapé UDV
31	LGB#P-91	Msp 4-26	UFOPA-I-366	Hyphessobrycon heterorhabdus	Igarapé São Brás
32	LGB#P-92	Msp 4-27	UFOPA-I-367	Hyphessobrycon heterorhabdus	Igarapé São Brás
33	LGB#P-93	Msp 4-39	UFOPA-I-368	Hyphessobrycon heterorhabdus	Igarapé Branco
34	LGB#P-94	Msp 4-2	UFOPA-I-369	Hyphessobrycon heterorhabdus	Igarapé Sonrisal
35	LGB#P-95	Msp 4-32	UFOPA-I-370	Hyphessobrycon heterorhabdus	Igarapé Branco
36	LGB#P-96	Msp 4-7	UFOPA-I-371	Hyphessobrycon heterorhabdus	Igarapé Sonrisal
37	LGB#P-97	Msp 4-36	UFOPA-I-372	Hyphessobrycon heterorhabdus	Igarapé Branco
38	LGB#P-98	Msp 4-9	UFOPA-I-373	Hyphessobrycon heterorhabdus	Igarapé Sonrisal
39	LGB#P-99	Msp 4-20	UFOPA-I-374	Hyphessobrycon heterorhabdus	Igarapé UDV
40	LGB#P-100	Msp 4-33	UFOPA-I-375	Hyphessobrycon heterorhabdus	Igarapé Branco

41	LGB#P-101	Msp 4-35	UFOPA-I-376	Hypheobrycon heterorhabdus	Igarapé Branco
42	LGB#P-102	Msp 4-41	UFOPA-I-377	Hypheobrycon heterorhabdus	Igarapé Branco
43	LGB#P-103	Msp 4-42	UFOPA-I-378	Hypheobrycon heterorhabdus	Igarapé Branco
44	LGB#P-104	Msp 5-20	UFOPA-I-379	Copella nigrofasciata	Igarapé UDV
45	LGB#P-105	Msp 5-13	UFOPA-I-380	Copella nigrofasciata	Igarapé UDV
46	LGB#P-106	Msp 5-27	UFOPA-I-381	Copella nigrofasciata	Igarapé São Brás
47	LGB#P-107	Msp 5-15	UFOPA-I-382	Copella nigrofasciata	Igarapé UDV
48	LGB#P-108	Msp 5-14	UFOPA-I-383	Copella nigrofasciata	Igarapé UDV
49	LGB#P-109	Msp 6-9	UFOPA-I-384	Apistogramma hippolytae	Igarapé Sonrisal
50	LGB#P-110	Msp 6-10	UFOPA-I-385	Apistogramma hippolytae	Igarapé Sonrisal
51	LGB#P-111	Msp 8-3	UFOPA-I-386	Microsternarchus bilineatus	Igarapé Sonrisal
52	LGB#P-112	Msp 8-4	UFOPA-I-387	Microsternarchus bilineatus	Igarapé Sonrisal
53	LGB#P-113	Msp 8-2	UFOPA-I-388	Microsternarchus bilineatus	Igarapé Sonrisal
54	LGB#P-114	Msp 10-11	UFOPA-I-389	Aequidens tetramerus	Igarapé UDV
55	LGB#P-115	Msp 10-20	UFOPA-I-390	Aequidens tetramerus	Igarapé Branco
56	LGB#P-116	Msp10-3	UFOPA-I-391	Aequidens tetramerus	Igarapé Sonrisal
57	LGB#P-117	Msp 10-4	UFOPA-I-392	Aequidens tetramerus	Igarapé Sonrisal
58	LGB#P-118	Msp 16-11	UFOPA-I-393	Otocinclus vitatus	Igarapé São Brás
59	LGB#P-119	Msp 16-6	UFOPA-I-394	Otocinclus vitatus	Igarapé São Brás
60	LGB#P-120	Msp 27-2	UFOPA-I-395	Hemigrammus sp.n.	Igarapé Branco
61	LGB#P-121	Msp 30-2	UFOPA-I-396	Gymnotus coropinae	Igarapé Branco
62	LGB#P-122	Msp 30-1	UFOPA-I-397	Gymnotus coropinae	Igarapé Branco
63	LGB#P-123	Msp 15-1	UFOPA-I-398	Gymnorhamphichthys petiti	Igarapé Branco
64	LGB#P-124	IGB-1	UFOPA-I-399	Hoplias malabaricus	Igarapé Branco
65	LGB#P-125	IGB-2	UFOPA-I-400	Hoplias malabaricus	Igarapé Branco
66	LGB#P-126	IGB-3	UFOPA-I-401	Hoplias malabaricus	Igarapé Branco
67	LGB#P-127	IGB-4	UFOPA-I-402	Hoplias malabaricus	Igarapé Branco
68	LGB#P-128	IGB-5	UFOPA-I-403	Hoplias malabaricus	Igarapé Branco
69	LGB#P-129	IGB-6	UFOPA-I-404	Hoplias malabaricus	Igarapé Branco

2. SÍNTESE INTEGRADORA

O estudo de ecossistemas amazônicos é tido como prioritário para o conhecimento e conservação da biodiversidade. A quantidade de informações disponíveis atualmente sobre tal região ainda é considerada pequena dada a grande extensão territorial que a Amazônia possui e a heterogeneidade dos diversos ambientes ali encontrados. Os peixes são o maior grupo de vertebrados existentes, com grande dispersão nos mais variados ambientes e constituem uma das principais fontes de alimentação e renda de parte da população da Amazônia. O que torna imprescindível o estudo desse grupo altamente abundante e diversificado.

No presente estudo verificou-se que a fauna de peixes em igarapés da região de Santarém, no baixo rio Tapajós é diversificada com mais de 20 espécies representativas de 6 ordens, 14 famílias e 20 gêneros. Esse componente da biodiversidade ainda é pouco estudado e à medida que os ecossistemas de igarapés vêm sendo alterados por diferentes fatores antrópicos as populações de peixes tornam-se vulneráveis aos processos de modificação da paisagem e processos demográficos/genéticos que podem comprometer a conservação das espécies.

Entre as doze espécies analisados por DNA *barcoding* verificou-se que em três grupos (*Aequidens*, *Bryconops* e *Hyphessobrycon*) surgiram dúvidas em relação a identificação taxonômica clássica baseada na morfologia. As medidas de distancias genéticas intraespecíficas sugerem a possibilidade de diversidade críptica nesses grupos. Estudos adicionais são necessários para melhor caracterizar a taxonomia desses grupos. Nove das 12 espécies analisadas tiveram suas sequencias de DNA *barcoding* depositadas pela primeira vez em repositório público (www.boldsystems.org) com acesso livre, dessa forma contribuindo para avançar os esforços empreendidos no conhecimento da diversidade molecular dos peixes amazônicos.

Considerando a imensa malha hídrica representada pelos igarapés da Amazônia e a susceptibilidade desses ecossistemas frente aos processos de perturbação ambiental recomenda-se fortemente a continuidade de pesquisas dessa natureza, com o foco na diversidade taxonômica e molecular da ictiofauna de igarapés.

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABELL, R. *et al.* Freshwater ecoregions of the world: a new map of biogeographic units for freshwater biodiversity conservation. **BioScience**, v. 58, p. 403–414, 2008.

ALLCOCK, A.L. *et al.* Cryptic speciation and the circumpolarity debate: A case study on endemic Southern Ocean octopuses using the COI barcode of life. **Deep-Sea Research II**, v 58, p. 242-249, 2010.

ANJOS, M. B, ZUANON, J. Sampling effort and fish species richness in small *terra firme* forest streams of central Amazonia. Brasil. **Neotropical Ichthyology**. V. 5 (1). p. 45-52, 2007.

ARAÚJO-LIMA, C.A.R.M. *et al.* Relação entre o número de espécies de peixes, complexidade de hábitat e ordem do riacho nas cabeceiras de um tributário do rio Urubu, Amazônia Central. **Acta Limnologica Brasiliensia**, v. 11(2), p. 127-135, 1999.

ARDURA, A. *et al.* DNA barcoding for conservation and management of Amazonian commercial fish. **Biological Conservation**, v. 143, p. 1438-1443, 2010.

AVISE, J.C. **Molecular markers, natural history and evolution**. Ed. 2. Chapman and Hall, New York. 2004.

BARBOSA, R.P.; FREITAS, C.E. de C. & SANTOS, S.M. dos. The fish community of an upland stream in the Central Amazon (Presidente Figueiredo – Amazonas - Brasil). **Acta Limnologica Brasiliensia**, v. 15(2), p. 37-41, 2003.

BARBUTO, M. *et al.* DNA barcoding reveals fraudulent substitutions in shark seafood products: The Italian case of “palombo” (*Mustelus* spp.). **Food Research International**, v 43, p. 376-381, 2010.

BARTHEM, R.B., FABRÉ, N.N. Biologia e Diversidade dos Recursos Pesqueiros da Amazônia. In: RUFFINO, M. L. (Ed.). **A pesca e os recursos pesqueiros na Amazônia brasileira**. Manaus: Ibama/ProVárzea. 2004.

BATISTA, V. S.; ISAAC, V. J.; VIANA, J. P. Exploração e manejo dos recursos pesqueiros da Amazônia. In: RUFFINO, M. L. (Ed.). **A pesca e os recursos pesqueiros na Amazônia brasileira**. Manaus: Ibama/ProVárzea. 2004.

BAYLEY, P.B. & M.PETREIRE JR, M. Amazon Fisheries: Assessment Methods, Current Status and Management Options. p.385-398. In: Dodge, D. P. (Ed). **Proceedings of the International Large River Symposium**. Can. Spec. Publ. Fish. Aquat. Sci. 106. 1989.

BERTACO, V. A. & GARUTTI, V. New *Astyanax* from the upper rio Tapajós drainage, Central Brazil (Characiformes: Characidae). **Neotropical Ichthyology**, v. 5(1), p. 25-30, 2007.

BLAXTER, M.L. The promise of a DNA taxonomy. **Philosophical transactions of The Royal Society B**, v 359, p 669-679, 2004.

- BÖHLKE, J.E.; WEITZMAN, H.S.; MENEZES, N.A. Estado atual da sistemática dos peixes de água doce da América do Sul. **Acta Amazônica**, v. 8, p. 657-677, 1978.
- BORISENKO, A.V.; LIM, B.K.; IVANOVA, N.V.; HANNER, R.H.; HEBERT, P.D.N. DNA barcoding in surveys of small mammal communities: a field study in Suriname. **Molecular Ecology Resources**, v 8(3), p. 471–479, 2007.
- BREJÃO, G. L., GERHARD, P., ZUANON, J. Functional trophic composition of the ichthyofauna of forest streams in eastern Brazilian Amazon. **Neotropical Ichthyology**, v. 11 (2): p. 361-373, 2013.
- BRITTO, M.R.; WOSIACKI, W.B.; MONTAG, L.F.A. A new species of Corydoradinae Catfish (Ostariophysi: Siluriformes: Callichthyidae) from Rio Solimões Basin, Brazil. **Copeia**, nº 4, p. 684-689, 2009.
- BROWN, K.H. Fish mitochondrial genomics: sequence, inheritance and functional variation. **Journal of Fish Biology**, v. 72, p. 355-374, 2008.
- BUHRNHEIM, C. M. & C. COX-FERNANDES. Structure of fish assemblages in Amazonian rain-forest streams: effects of habitats and locality. **Copeia**, v. 2. p.255-262, 2003.
- BURGESS, K.S. *et al.* Discriminating plant species in a local temperate flora using the *rbcL* + *matK* DNA barcode. **Methods in Ecology and Evolution**. 2011.
- CARVALHO, D.C. *et al.* Identificação molecular de peixes: o caso Surubim (*Pseudoplatystoma* spp.). **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 32(4), p. 215-219, out. 2008.
- CARVALHO-COSTA, L. F. *et al.* Molecular systematics of the neotropical shovelnose catfish genus *Pseudoplatystoma* Bleeker 1862 based on nuclear and mtDNA markers. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 59, p. 177-194, 2011.
- CASTRO, R. M. C. Evolução da ictiofauna de riachos sul-americanos: padrões gerais e possíveis processos causais, p. 139–155. In: CARAMASCHI, E. P.; MAZZONI, R.; PERES-NETO, P. R. (Eds.). **Ecologia de Peixes de Riachos**. Série Oecologia Brasiliensis, v. 6, Programa de Pós-graduação em Ecologia-Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil. 1999.
- CLARE, E.L. *et al.* DNA barcoding of Neotropical bats: species identification and Discovery within Guyana. **Molecular Ecology Notes**, v. 7, p. 184-190, 2007.
- COSTA, W. J. E. M. *Rivulus kayabi*, a new killifish from the Tapajós river basin, southern Brazilian Amazon (Cyprinodontiformes: Rivulidae). **Ichthyol. Explor. Freshwaters**, v. 18(4), p. 345-350, 2007.
- ESPIRITO SANTO, H. M. V. *et al.* Seasonal variation in the composition of fish assemblage in small Amazonian forest streams: evidence for predictable changes. **Freshwater Biology**, v. 54, p. 536-548, 2009.

ESPIRITO-SANTO, H. M. V.; MAGNUSSON, W. E.; ZUANON, J.; EMILIO, T. Short-term Impacts of Fish Removal from Small Amazonian Forest Streams. **Biotropica**, v. 43(5), p. 529-532, 2011

FERREIRA, S.J.F. *et al.* Efeito da pressão antrópica sobre igarapés na Reserva Florestal Adolpho Ducke, área de floresta na Amazônia Central. **Acta Amazônica**, v. 42(4), p. 533-540, 2012.

FINK, W. L. & FINK, S. V. Central Amazonia and its fishes. **Comparative Biochemistry & Physiology**, v. 62A, p. 13-29, 1979.

FREDERICO, R.G. *et al.* Phylogeography and conservation genetics of the Amazonian freshwater stingray *Paratrygon aiereba* Müller & Henle, 1841 (Chondrichthyes: Potamotrygonidae). **Neotropical Ichthyology**, v. 10(1), p. 71-80, 2012.

GALTIER, N.; NABHOLZ, B.; GLÉMIN, S. & HURST, G.D.D. Mitochondrial DNA as a marker of molecular diversity: a reappraisal. **Molecular Ecology**, v. 18, p. 4541-4550, 2009.

GÉRY, J. **Characoids of the world**. T.F.H. Publications, Neptune City, p. 672. 1977.

GODOI, D. S. **Diversidade e Hábitos Alimentares de Peixes de Afluentes do Rio Teles Pires, Drenagem do Rio Tapajós, Bacia amazônica**. Originalmente apresentada como tese de doutorado. UNESP, Jaboticabal – São Paulo. 2008.

GOULDING, M. **The fishes and the forest, exploration in Amazonian natural history**. University of California Press, Berkeley/Los Angeles/London. 1980.

HEBERT, P.D.N.; CYWINSKA, A.; BALL, S.L.; DEWAARD, J.R. Biological identifications through DNA barcodes. **Philosophical transactions of The Royal Society B**, v. 270, p 313-321, jan. 2003.

HEBERT, P.D.N. *et al.* Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astraptes fulgerator*. **Proceeds of National Academy of Science**, v. 101(41), p. 14812-14817, out. 2004.

HENRIQUES, J.M. **Identificação molecular (DNA BARCODE) dos peixes da bacia do Rio Ribeira de Iguape e dos Rios Costeiros do Estado de São Paulo**. Originalmente apresentada como dissertação de mestrado. UNESP, Botucatu – São Paulo. 2010.

HUBERT, N. *et al.* Identifying Canadian Freshwater Fishes through DNA Barcodes. **Plos One**, v. 3, jun. 2008.

IVANOVA, N. V. *et al.* Universal primer cocktails for fish DNA barcoding. **Molecular Ecology Notes**. 2007.

JUNK, W. J. As águas da Região Amazônica, p. 45–100. In: SALATI, E. *et al.* (Eds). **Amazônia: Desenvolvimento, Integração e Ecologia**. Ed. Brasiliense. São Paulo, Brasil. 1983.

JUNK, W. J.; BARLEY, P.B.; SPARKS, R.E. **The flood-pulse concept in river-floodplain systems**. *Can Spec Publ Fish Aquat Sci* 106. p. 110–127. 1989.

JUNK, W.J. & PIEDADE, M. T. F. Introduction to South american Wetland Forests: Distribution, Definitions and General Characterization. In: JUNK, W.J.; PIEDADE, M. T. F.; PAROLIN, J. S. P. (Eds.). **Amazonian Floodplain Forests: Ecophysiology, Biodiversity and Sustainable Management**. Ecological Studies 210. 2010.

JUNK, W. J. *et al.* A Classification of Major Naturally-Occurring Amazonian Lowland Wetlands. **Wetlands**. v. 31, p. 623-640, jul. 2011.

KERR, K.C.R.; STOECKLE, M.Y.; DOVE, C.J.; WEIGT, L.A.; FRANCES, C.M.; HEBERT, P.D.N. Comprehensive DNA barcode coverage of North American birds. **Molecular Ecology Notes**, 2007.

KRESS, W.J.; WURDACK, K.J.; ZIMMER, E.A.; WEIGT, L.A.; JANZEN, D.H. Use of DNA barcodes to identify flowering plants. **Proceeds of National Academy of Science**, v 102, n 23, p 8369-8374, jun. 2005.

KRESS, W.J. & ERICKSON, D.L. DNA Barcodes: Methods and Protocols. In: **Methods in Molecular Ecology**, v. 858. Springer Science + Business Media, LLC. 2012.

LARA A.; PONCE DE LEÓN, J.L.; RODRIGUEZ, R.; CASANE, D.; CÔTÉ, G.; BERNATCHEZ, L.; MACHADO, G. DNA barcoding of Cuban freshwater fishes: evidence for cryptic species and taxonomic conflicts. **Molecular Ecology Resources**, v 10, p. 421-430, 2010

LAUTEDROU, A.C. *et al.* Molecular taxonomy and identification within the Antarctic genus *Trematomus* (Notothenioidei, Teleostei): How valuable is barcoding with COI?. **Polar Science**. v. 4, p 333-352, 2010.

LEVEQUE, C. *et al.* Global diversity of fish (Pisces) in freshwater. **Hydrobiologia**, v. 595, p 545-567, 2008.

LIPSCOMB, D.; PLATNICK, N.; WHEELER, Q. The intellectual content of taxonomy: a comment on DNA taxonomy. **Trends in Ecology and Evolution**, v. 18(2), fev. 2003.

LOWE-McCONNELL, R.H. **Estudos ecológicos de comunidades de peixes tropicais**. (A.E.A.M. Vazzoler, A.A. Agostinho & P.T.M. Cunningham, trad.). EDUSP. São Paulo. 1999.

LUCENA, C. A. S. New characid fish, *Hyphessobrycon scutulatus* from the rio Teles Pires drainage, upper rio Tapajós system (Ostariophysi: Characiformes: Characidae). **Neotropical Ichthyology**, v. 1(2), p. 93-96, 2003.

LUNDBERG, J.G. *et al.* The Stage for Neotropical Fish Diversification: A History of tropical South American Rivers. In: MALABARBA, L.R.; REIS, R.E.; VARI, R.P.; LUCENA, Z.R.; LUCENA, C.A.S. (Eds). **Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes**, Edipucrs. Porto Alegre, p. 603, 1998.

MAIA, C.R.; & ALVES-GOMES, J.A. Utilização do Código de Barras de DNA na estimativa da diversidade de peixes elétricos do gênero *Microsternarchus* (Ostariophysi: Gymnotiformes) na bacia do Rio Negro, Amazonas. In: SOUZA, L.A.G. de.; & CASTELLÓN, E.G. **Projeto Fronteira: Desvendando as fronteiras do conhecimento na região amazônica do alto Rio Negro**. INPA. 2012

MAXIME, E.L.; LIMA, F.C.T.; ALBERT, J.S. A new Species of Gymnotus (Gymnotiformes: Gymnotidae) from Rio Tiquié in Northern Brazil. **Copeia**, nº 1, p. 77-81, 2011.

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. 751-764, 2005.

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE/SECRETARIA DE BIODIVERSIDADE E FLORESTAS. **Avaliação e identificação de áreas e ações prioritárias para a conservação, utilização sustentável e repartição dos benefícios da biodiversidade nos biomas brasileiros**. Brasília, 2002. 404 p.

OLIVEIRA, R. R. de. *et al.* Peckoltia compta, a new species of catfish from the Brazilian Amazon, rio Tapajós basin (Siluriformes: Loricariidae). **Zootaxa**, v. 2534, p. 48-56, 2010.

ORTIZ, M. F. **Validação do DNA Barcode como identificador de espécies: um estudo de ampla amostragem com o gênero Pseudoplatystoma (Siluriformes, Pimelodidae) na Amazônia**. Originalmente apresentada como dissertação de mestrado, INPA. 2010.

PAZIN, V.F.V.; MAGNUSSON, W.E.; ZUANON, J. & MENDONÇA, F.P. Fish assemblages in temporary ponds adjacent to 'terra-firme' streams in Central Amazonia. **Freshwater Biology**, v. 51(1), p. 1025-1037, 2006.

PERES, C.A. Why we need Megareserves in Amazonia. **Conservation Biology**, v 19(3), p. 728-733, jun. 2005.

RATNASINGHAM, S.; & HEBERT, P. BOLD: The Barcode of Life Data System (www.barcoding.life.org). **Molecular Ecology Notes**. 2007.

REID, W.V. Biodiversity hotspots. **Tree**, v.13(7), jul. 1998.

REZENDE, C. F. Estrutura da comunidade de macroinvertebrados associados ao folhicho submerso de remanso e correnteza em igarapés da Amazônia Central. **Biota Neotropica**, v. 7(2), 2007.

RIBEIRO, O. M. & ZUANON, J. Comparação da eficiência de dois métodos de coleta de peixes em igarapés de terra firme da Amazônia Central. **Acta Amazônica**, v. 36(3), p. 369-394, 2006.

ROBERTS, T. R. Ecology of fishes in the Amazon and Congo basins. **Bull. Mus. Comp. Zool.** Harvard. v. 143, p. 117-147, 1972.

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(3), p. 253-262, 2008.

RUFFINO, M. L.; ISAAC, V. J. & MILSTEIN, A. Fisheries Ecology in the lower Amazon: A typical artisanal practice in the tropics. **Ecotropica**, v. 4, p. 99-114, 1998.

RUFFINO, M. L. Sistema integrado de estatística pesqueira para a Amazônia. **Pan-American Journal of Aquatic Sciences**, v. 3, p. 193-204, 2008.

SANTOS, G. M., & FERREIRA, E. J. G. Peixes da Bacia Amazônica, p. 345–373. In: LOWE-MCCONNELL, R. H. (Ed). **Estudos Ecológicos de Comunidades de Peixes Tropicais**. Editora da Universidade de São Paulo. São Paulo, Brasil. 1999.

SANTOS, G. M.; FERREIRA, E. J. G.; ZUANON, J. A. S. **Peixes comerciais de Manaus**. Manaus: Ibama/AM. ProVárzea. 2006.

SCHOCH, C.L. *et al.* Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for *Fungi*. **Proceeds of National Academy of Science**. Early edition. fev. 2012.

SIOLI, H. **Amazônia: Fundamentos da Ecologia da maior região de florestas tropicais**. Ed. Vozes. Petrópolis, Rio de Janeiro. 1985.

SMERMAN, W. **Ictiofauna de riachos formadores do rio Teles Pires, drenagem do rio Tapajós, Bacia Amazônica**. Originalmente apresentada como dissertação de mestrado. UNESP. Centro de aquicultura. Jaboticabal – São Paulo. 2007.

SMITH, M.A.; FISHER, B.L.; HEBERT, P.D.N. DNA barcoding for effective biodiversity assessment of a hyperdiverse arthropod group: the ants of Madagascar. **Philosophical transactions of The Royal Society B**. 2005.

STEINKE, D.; ZEMLAK, T. S.; BOUTILLIER, J.A.; HEBERT, P.D.N. DNA barcoding of Pacific Canada's fishes. **Mar Biol**, v. 156, p. 2641-2647, 2009.

STOECKLE, M.; WAGGONER, P. E.; AUSUBEL. J.H. **Barcoding life, illustrated. Goals rationale, results**. www.barcoding.si.edu. 2005. Consultado em 02/08/2013.

TAYLOR, H. R. & HARRIS, W.E. An emergent Science on the brink of irrelevance: a review of the past 8 years of DNA barcoding. **Molecular Ecology Resources**, v. 12, p. 377-388, 2012.

TOFFOLI, D. *et al.* A test of the utility of DNA barcoding in the radiation of the freshwater stingray genus *Potamotrygon* (Potamotrygnidae, Myliobatiformes). **Genetics and Molecular Biology**, v. 31, p. 324-336, 2008.

UIEDA, V.S. & CASTRO, R.M.C. Coleta e fixação de peixes de riachos. In: CARAMASCHI, E.P.; MAZZONI, R. & PERES-NETO, P.R. (eds). **Ecologia de Peixes de Riachos**. Série Oecologia Brasiliensis, v. 6. PPGE- UFRJ. Rio de Janeiro. Brasil. 1999.

USING DNA BARCODES TO IDENTIFY AND CLASSIFY LIVING THINGS, disponível em <http://www.dnabarcoding101.org/files/using-dna-barcodes.pdf>, acessado em 06 de agosto de 2013, às 14:31h.

VENCES, M. *et al.* Comparative performance of the 16S rRNA gene in DNA barcoding of amphibians. **Frontiers in Zoology**, v. 2, p. 1-12, 2005.

WARD, R.D.; ZEMLAK, T.S.; INNES, B.H.; LAST, P.R.; HEBERT, P.D.N. DNA barcoding Australia's fish species. **Philosophical transactions of The Royal Society B**, v. 360, p. 1847–1857, set. 2005.

WARD, R.D. *et al.* DNA barcoding of shared fish species from the North Atlantic and Australasia: minimal divergence for most taxa, but *Zeus faber* and *Lepidopus caudatus* each probably constitute two species. **Aquatic Biology**, v. 3, p. 71-78, 2008.

WARD, R.D. DNA barcode divergence among species and genera of birds and fishes. **Molecular Ecology**, v. 9(4), p. 1077-1085, 2009.

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

WINSTON, J.E. **Describing Species: practical taxonomic procedure for biologists**, Columbia University Press. Nova York. 1999.

ANEXOS

ANEXO A: Instruções aos autores, Neotropical Ichthyology (ISSN-1679-6225)

INSTRUÇÕES AOS AUTORES – NEOTROPICAL ICHTHYOLOGY

Fevereiro 2013

Escopo e política editorial

A revista *Neotropical Ichthyology* publica artigos originais sobre peixes neotropicais de água doce e marinhos nas áreas de Biologia, Ecologia, Etologia, Fisiologia, Genética e Biologia Molecular e Sistemática.

Os manuscritos submetidos deverão ser contribuições relevantes dentro de sua área de investigação específica, devendo apresentar clara fundamentação teórica do tema, descrição dos objetivos e/ou hipóteses em análise, além de desenho amostral e analítico condizentes com a proposta. Trabalhos descritivos originais de elevada qualidade e relevância serão considerados para publicação. Observações casuais, notas científicas ou estudos meramente descritivos sem associação com questões teóricas relevantes não serão considerados para análise. O Editor e os editores de área avaliarão previamente o manuscrito submetido, a fim de determinar se seu conteúdo é adequado para publicação na revista *Neotropical Ichthyology*.

A revista está aberta para submissões a todos os pesquisadores da ictiofauna Neotropical. O pagamento dos custos de publicação pode ser requerido se nenhum dos autores for membro da Sociedade Brasileira de Ictiologia.

Submissão de manuscritos

Manuscritos devem ser submetidos como arquivos digitais no site <http://mc04.manuscriptcentral.com/nis-science>

Na submissão do manuscrito, os autores devem incluir uma carta com uma declaração de que se constitui em pesquisa original não submetida a outro periódico.

Nos manuscritos com múltiplos autores, o autor responsável pela submissão deve declarar na carta de submissão que todos os co-autores estão cientes e de acordo com a submissão do manuscrito.

Todos os co-autores e respectivos e-mails devem ser registrados nos formulários indicados durante a submissão do manuscrito.

Durante a submissão, indicar a área da revista (Bioquímica e Fisiologia, Biologia, Ecologia, Etologia, Genética e Biologia Molecular, Sistemática) a que o manuscrito se refere.

Durante a submissão, indique três possíveis referees (nome, instituição, país e email) para a análise do manuscrito.

Manuscritos submetidos fora do formato requerido nas instruções aos autores serão devolvidos.

Manuscritos submetidos com uso inapropriado da língua inglesa serão devolvidos sem revisão. O uso adequado da língua inglesa é um requisito para a revisão e publicação.

Forma e preparação de manuscritos

Texto deve ser em Word for Windows ou arquivos rtf.

Figuras e tabelas devem ser carregadas separadamente como arquivos individuais.

Não duplique informações no texto, nas figuras e nas tabelas. Apresente apenas figuras e tabelas que são estritamente necessárias.

Formato

Texto deve ser apresentado em inglês.

O manuscrito deve conter os seguintes itens, nesta ordem:

Título

- Título em minúsculas da seguinte forma: "*Lobruerichthys epakmos*, a new species of loricariid catfish from the rio Ribeira de Iguape basin, Brazil (Teleostei: Siluriformes)".

- Taxons subordinados devem ser separados por dois-pontos, como segue: "(Siluriformes: Loricariidae)".

Autor (es) nome (s)

- Só as iniciais devem ser em letras maiúsculas. Nunca abrevie o primeiro nome.

Endereços

- Não apresente os endereços em nota de rodapé.

- Use números arábicos sobrescritos¹ para identificação no caso de múltiplos autores e endereços.

- Listar endereços completos e email de todos os autores.

Abstract

- Em inglês.

Resumo

- Em Português ou espanhol. Deve ter o mesmo conteúdo do *Abstract* em inglês.

Palavras-chave

- Cinco palavras-chave em inglês, não repetir palavras ou expressões do título.

Introdução

Material e Métodos

Resultados

Discussão

Agradecimentos

Literatura citada

Tabela (s)

Legenda(s) da(s) Figura(s)

Em trabalhos taxonômicos Verifique também: [Neotropical Ichthyology taxonomic contribution style sheet](#).

Texto

- Páginas de texto não podem incluir cabeçalhos, rodapés, ou notas de rodapé (exceto o número de página) ou qualquer formato de parágrafo. Texto deve ser alinhado à esquerda.

- Usar Times New Roman, fonte tamanho 12.

- Não hifenizar o texto.

- Usar a fonte "symbol" para representar os caracteres a seguir:

χ μ θ ω ε ρ τ ψ υ ι ο π α σ δ φ γ η κ λ ε β ν α ⊕ Ω Σ Δ Φ

- Espécies, gêneros e termos em Latim (*et al.*, *in vitro*, *in vivo*, *vs.*) devem ser em itálico.

- Termos em Latim apresentados entre os nomes genéricos e específicos - *cf.*, *aff.* (por exemplo, *Hoplias cf. malabaricus*) não devem ser em itálico.

- Não abreviar o nome do gênero no início de uma frase ou parágrafo.

- Não sublinhar palavras.

- Os títulos a seguir devem ser apresentados em negrito: **Introduction, Material and Methods, Results, Discussion, Acknowledgments, Literature Cited.**

- Listar abreviaturas utilizadas no texto em Material e Métodos, exceto para aqueles de uso comum (por exemplo, *min.*, *km*, *mm*, *kg*, *m*, *s*, *h*, *ml*, *L*, *g*).

- As medidas devem usar o sistema métrico.
- Manuscritos devem conter as siglas institucionais e os números de catálogo de espécimes-testemunho.
- Descritores geográficos (rio, igarapé, arroio, córrego) devem ser em letras minúsculas, exceto quando se refere a um nome de localidade (e.g., municipality of Arroio dos Ratos, State of Rio Grande do Sul).
- Agradecimento(s) deve(m) ser conciso(s).

Nomenclatura

- Nomes científicos devem ser citados de acordo com o ICZN (1999).
- A autoria de nomes científicos é necessária apenas em trabalhos taxonômicos e na primeira referência de uma espécie ou gênero. Não inclua autoria no resumo e abstract.
- Verifique a ortografia, nomes válidos e autoria de espécies no *Catalog of Fishes* em <http://research.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/fishcatmain.asp>

Tabelas

- Tabelas devem ser numeradas sequencialmente de acordo com a sua ordem de citação no texto, usando os seguintes formatos: Table 1, Tables 1-2, Tables 1, 4.
- A palavra **Table** e o respectivo número devem ser grifados em negrito nas legendas das Tabelas.
- Tabelas devem ser construídas usando linhas e colunas; não use tabulações e espaços.
- Tabelas não podem conter linhas verticais ou notas de rodapé. Arquivos digitais de tabelas devem ser formatados em células. Arquivos digitais de tabelas com colunas separadas por tabulação ou espaço não serão aceitas.
- Legendas devem ser incluídas no final do manuscrito, no seguinte formato:

Table 1. Monthly variation of the gonadosomatic index in *Diapoma specuiferum* ...
- Os locais aproximados onde as tabelas devem ser inseridas devem ser indicados ao longo da margem do texto.

Figuras

- Figuras devem ser numeradas sequencialmente de acordo com a sua ordem de citação no texto, usando os seguintes formatos: Fig. 1, Figs. 1-2, Fig. 1a, Figs. 1a-b, Figs. 1a, c.
- A palavra **Fig.** e respectivo número devem ser apresentado em negrito nas legendas.
- Figuras devem ser de alta qualidade e definição.
- Texto incluído em gráficos e imagens deve ter tamanho de fonte compatível com reduções à largura da página (175 mm) ou largura da coluna (85 mm). Gráficos serão impressos preferencialmente com a largura de uma coluna (85 mm).
- Fotos coloridas serão aceitas somente se necessário e o custo da impressão poderá ser cobrado dos autores.
- Figuras compostas devem ser preparadas a fim de ajustar-se à largura da página (175 mm) ou largura da coluna (85 mm).
- Ilustrações devem incluir uma escala ou uma referência para o tamanho do item ilustrado na legenda da figura.
- Nunca inclua objetos ou ilustrações na legenda da figura. Substituir por texto (e.g., "triângulo preto") ou representar seu significado na própria figura.
- Uma lista de legendas das figuras deve ser apresentada no final do arquivo do manuscrito.

Literatura Citada

- Use os seguintes formatos de citação no texto: Eigenmann (1915, 1921) ou (Eigenmann, 1915, 1921; Fowler, 1945, 1948) ou Eigenmann & Norris (1918) ou Eigenmann *et al.* (1910a, 1910b).
- Não inclua resumos e relatórios técnicos na literatura citada.
- Evite referências desnecessárias a teses ou dissertações.
- Nunca use tabulação ou espaço para formatar referências.
- A literatura citada deve ser ordenada em ordem alfabética. Referências com dois ou mais autores devem ser listadas na ordem alfabética do sobrenome do primeiro autor e, em seguida, do sobrenome do segundo autor e assim sucessivamente.
- Não abreviar nomes dos periódicos.
- Não use itálico ou negrito para títulos de livros e revistas.
- As citações no texto devem corresponder às referências em Literatura Cited.
- Use os seguintes formatos:

Livros:

Campos-da-Paz, R. & J. S. Albert. 1998. The gymnotiform "eels" of Tropical America: a history of classification and phylogeny of the South American electric knifefishes (Teleostei: Ostariophysi: Siluriformes). Pp. 419-446. In: Malabarba, L. R., R. E. Reis, R. P. Vari, Z. M. S. Lucena & C. A. S. Lucena (Eds.). *Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes*. Porto Alegre, Edipucrs.

Teses/Dissertações:

Langeani, F. 1996. Estudo filogenético e revisão taxonômica da família Hemiodontidae Boulenger, 1904 (*sensu* Roberts, 1974) (Ostariophysi, Characiformes). Unpublished Ph.D. Dissertation, Universidade de São Paulo, São Paulo, 171p.

Artigos:

Lundberg, J. G., F. Mago-Leccia & P. Nass. 1991. *Exallodontus aguanai*, a new genus and species of Pimelodidae (Teleostei: Siluriformes) from deep river channels of South America and delimitation of the subfamily Pimelodinae. *Proceedings of the Biological Society of Washington*, 104: 840-869.

Artigos no prelo:

Burns, J. R., A. D. Meisner, S. H. Weitzman & L. R. Malabarba. (in press). Sperm and spermatozeugma ultrastructure in the inseminating catfish, *Trachelyopterus lucenai* (Ostariophysi: Siluriformes: Auchenipteridae). *Copeia*, 2002: 173-179.

Recursos da Internet:

Author. 2002. Title of website, database or other resources, Publisher name and location (if indicated), number of pages (if known). Available from: <http://xxx.xxx.xxx/> (Date of access).

Informações adicionais

Contate o editor em neoiichth@ufrgs.br

ANEXO B: Instrução aos autores, Mitochondrial DNA (ISSN: 1940-1736)

Mitochondrial DNA Instructions for Authors

[About the Journal](#)

Aims and Scope
Editorial Contacts

[Manuscript Submission](#)

[Manuscript Preparation](#)

File preparation and types
Title Page
Abstract
Main Text
Acknowledgments
Declaration of Interest Statement
References
Tables
Illustrations
Supplemental Material
Manuscript Style and Notation
Nucleotide Depositing

[Editorial Policies](#)

Authorship
Submission
Peer Review
Ethics and Consent
Copyright and Permissions
Declaration of Interest
NIH and Public Access Policy

[Additional Information](#)

Proofs
Reprints
Color figure charges
Contact the Publisher

About the Journal

[Aims and Scope](#)

Previously published under the title *DNA Sequence* (Vols 1-19.3), *Mitochondrial DNA* accepts original high-quality reports based on mapping, sequencing and analysis of mitochondrial DNA and RNA. Descriptive papers on DNA sequences from mitochondrial genomes, and also analytical papers in the areas of population genetics, medical genetics, phylogenetics and human evolution that use mitochondrial DNA as a source of evidence for studies will be considered for publication. The editorial board will also consider manuscripts that examine population genetic and systematic theory that specifically address the use of mitochondrial DNA sequences, as well as papers that discuss the utility of mitochondrial DNA information in medical studies and in human evolutionary biology.

Mitochondrial DNA publishes WebFirst. WebFirst is a method of publishing where a journal is made available as multiple online issues throughout the year, with a single print archive copy of the entire volume being published at the end of the year. Access to the online version is included in all subscriptions.

Editorial Contacts

Editor-in-Chief

[Dr. Rob DeSalle](#)

American Museum of Natural History
79th Street at Central Park W
New York, NY 10024

Managing Editor

[Dr. Sergios-Orestis Kolokotronis](#)

American Museum of Natural History
79th Street at Central Park W
New York, NY 10024

Manuscript Submission

All submissions should be made online at *Mitochondrial DNA's* [ScholarOne site](#). New users should first create an account. Once a user is logged onto the site, submissions should be made via the Author Center. If you experience any problems with your submission or with the site, please contact ScholarOne support through the ["get help now"](#) link.

All submissions to the journal must include full disclosure of all financial, consulting, and personal relationships that could be viewed as presenting a potential conflict of interest. Please see our full [Declaration of Interest Policy](#) for further information.

Articles Types Considered by *Mitochondrial DNA* (See below for more details)

- Original articles
- Review articles
- Letters to the editor
- Commentaries
- Book reviews
- Mitocommunications
- Mitogenome announcements

Manuscript Preparation

File preparation and types

Manuscripts are preferred in Microsoft Word format (.doc files). Documents must be double-spaced, with margins of one inch on all sides. Tables and figures should not appear in the main text. Specific instructions for their submission are given below. References should be given in Harvard style (see References section for example).

Manuscripts should be compiled in the following order: title page; abstract; table of contents; main text; acknowledgments; declaration of interest statement; appendices (as appropriate); references; tables with captions (on separate pages); figures; figure captions (as a list).

Title Page

A title page should be provided comprising the manuscript title plus the full names and affiliations of all authors involved in the preparation of the manuscript. One author should be clearly designated as the corresponding author and full contact information, including phone number and email address, provided for this person.

Key Words

Three to six key terms that are not in the title should also be included on the title page. The keywords will assist indexers in cross indexing your article.

Abstract

All articles should start with an abstract of 100-150 words, summarising the central core of knowledge that is the focus of the paper. It should be written in an informative style permitting its use, without revision, by abstracting services, give essential details of research findings without further reference to the text, and avoid generalisations and nonessential information.

Main Text

- **Original articles**

The body of the article should include the following distinct sections: Introduction; methods; results; discussion; conclusions.

Introduction: This section should state the relevance and background to the study, and its rationale and purpose.

Methods: This section should include only information that was available at the time the plan or protocol for the study was being written. Please identify the methods, apparatus and procedures in sufficient detail to allow others to reproduce the results, and describe statistical methods with enough detail to enable a knowledgeable reader with access to the original data to verify the reported results. *Mitochondrial DNA* requires that studies involving animals be approved by an institutional review board, in accordance with approved published guidelines, prior to actually performing the research and publishing the data. This approval should be explicitly stated in the introduction and/or the methods section.

Results: Present your results in logical sequence in the text, tables, and illustrations.

Discussion: This should include implications of the findings and their limitations, with reference to all other relevant studies and the possibilities these suggest for future research.

Conclusions: This must summarize the main paper. Ensure that extrapolations are reasonable and that conclusions are justified by the data presented, and indicate if the study design can be generalized to a broader study population.

Declaration of Interest section: Please see below ("Acknowledgments and Declaration of Interest Sections") for more information.

- **Reviews**

The body of a review article should be a comprehensive, scholarly evidence-based review of the literature, accompanied by critical analysis and leading to reasonable conclusions. Wherever appropriate details of the literature search methodology should be provided, i.e. the databases searched, the search terms and inclusive dates, and any selectivity criteria imposed.

Wherever possible, use primary resources, avoiding "Data on File", "Poster" or other unpublished references.

- **Letters to the Editor**

Letters to the Editor will be considered for publication subject to Editor approval and provided that the content relates to articles published in *Mitochondrial DNA*. Letters should be received shortly after publication of the original work in question. Each letter will be submitted to the author of the original paper in order that any reply may be published simultaneously with the letter.

- **Commentaries**

Commentaries should be knowledge-based or consensus-type articles (e.g. working group statement) expressing defensible opinions, experiences or perspectives on an important area related to *Mitochondrial DNA*.

- **Book Reviews**

Mitochondrial DNA considers a limited number of book reviews. Book review ideas must be checked with the Editor prior to submission

- **Mitocommunications**

These summary articles are concise pieces (no more than 300 words) that synthesize published research or meeting summaries relevant to the subject of mitochondrial genomics and genetics. Any interest in authoring a mitocommunication should be discussed with the Editor-in-chief or the Managing Editor of the Journal prior to submission as these articles are done on an invitation-only basis.

- **Mitogenome announcement**

In 2009, *Mitochondrial DNA* initiated a fast-track rapid communications section called Mitogenome Announcements. This category is for short, newsworthy reports on whole mitochondrial DNA genomes. The length of these announcements should be no more than 500 words, with only one figure or table. Announcements should be checked with the Editor-in-chief or the Managing Editor prior to submission.

Acknowledgments and Declaration of Interest Sections

Acknowledgments and declaration of interest sections are different, and each has a specific purpose. The Acknowledgments section is optional, but the Declaration of Interest section is mandatory for all submissions. Articles not containing Declaration of Interest sections are considered incomplete and will not be published.

Acknowledgments Section

The Acknowledgments section details special thanks, personal assistance, and dedications. Contributions from individuals who do not qualify for [authorship](#) should also be acknowledged here. Acknowledgments should be included in a separate headed section at the end of the manuscript preceding any appendices, and before the Declaration of Interest Section. Please do not incorporate acknowledgments into notes or biographical notes. Some authors may elect not to include any acknowledgments.

Declaration of Interest Section

The Declarations of Interest Section should disclose any financial, consulting, and personal relationships with other people or organizations that could influence (bias) the author's work. Within this section also belongs disclosure of scientific writing assistance (use of an agency or freelance writer), grant support and numbers (including NIH/Wellcome-funded papers), and statements of employment.

All declarations of interest must be outlined under the heading 'Declaration of Interest' after the text. When submitting a paper via ScholarOne Manuscripts, the 'Declaration of Interest' field is compulsory.

Please see our full [Declaration of Interest Policy](#) for further information.

References

References (both in-text and works cited) should be given in the Harvard style (for Endnote users, please select the "Harvard" style template). Citation in the text is by author and date (Smith, 2001). The list of references appears alphabetically by primary author's last name. Examples:

- **Journal:** Iyengar BS, Dorr RT, Remers WA. (2004). Chemical basis for the biological activity of Imexon and related cyanaziridines. *J Med Chem* 47:218–223.
- **Book:** Vyas SP, Khar RK. (2001). Targeted and Controlled Drug Delivery. New Delhi, India: CBS Publisher and Distributor.
- **Contribution to a Book:** Chandrasekaran SK, Benson H, Urquhart J. (1976). Methods to achieve controlled drug delivery: The biochemical engineering approach. In: Robinson JR, ed. Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems. New York: Marcel Dekker, 557–593.
- **Electronic Resources:** Lin A-S, Shibano M, Nakagawa-Goto K, Tokuda H, Itokawa H, Morris-Natschke, SL, Lee K-H, (2007). Cancer Preventive Agents. 7. Antitumor-Promoting Effects of Seven Active Flavonolignans from Milk Thistle (*Silybum marianum*) on Epstein-Barr Virus Activation. *Pharm Biol* [Online] Available at: <http://www.informahealthcare.com/doi/abs/10.1080/13680200701585592>. Accessed on 12 April 2009

Periodical abbreviations should follow the style given by Index Medicus.

Supplementary Material (Appendices, etc)

Please query the editor regarding the possibility of including supplementary material with the article. All supplementary material should be submitted according to journal format with the article through Scholar One's Manuscript Central portal, and clearly labeled "Supplementary Material". This material is also subject to peer review. Ensure that there is reference to the material in the submitted article's text.

Appendices should appear before the references section and after any acknowledgments section. The style of the title is shown by the following example:

"Appendix C: The random network generator".

Tables

Tables should be used only when they can present information more efficiently than running text. Care should be taken to avoid any arrangement that unduly increases the depth of a table, and the column heads should be made as brief as possible, using abbreviations liberally. Lines of data should not be numbered nor run numbers given unless those numbers are needed for reference in the text. Columns should not contain only one or two entries, nor should the same entry be repeated numerous times consecutively. Tables should be grouped at the end of the manuscript on separate pages. If Tables are in Microsoft Word format, they can be submitted at the end of the text in the same file as the text. However, if any of the Tables are in formats other than Microsoft Word, such as in Excel, the Tables must be submitted separately.

Illustrations

Illustrations (line drawings, halftones, photos, photomicrographs, etc.) should be submitted as digital files for highest quality reproduction and should follow these guidelines:

- 300 dpi or higher
- Sized to fit on journal page
- EPS, JPG, TIFF, or PSD format only
- All illustrations should be submitted as separate files, not embedded in the text
- Legends or captions for figures should be listed on a separate page, double spaced

For information on submitting animations, movie files and sound files or any additional information including indexes and calendars please click [here](#).

For information on color figures and charges please click [here](#).

Manuscript Style and Notation

General Style

1. Authors should write in clear, concise US English. Language and grammar should be consistent with Fowler's English Usage; spelling and meaning of words should conform to Webster's Dictionary. If English is not your native language, please ensure the manuscript has been reviewed by a native speaker. **Please note: extensive rewriting of the text will not be undertaken by the editorial staff.** Manuscripts requiring significant language editing will be returned without review.
2. All pages should be numbered.
3. Please do not divide your article into numbered sections.
4. SI Units should be used throughout.
5. Latin terminology, including microbiological and species nomenclature, should be italicized.
6. Proprietary brands should be eschewed in favor of generic drug names. If authors use proprietary brand names alongside generic drug names, please include them in parentheses.
7. Use standard convention for human and animal genes and proteins: italics for genes and regular font for proteins, and upper case for human products and lower case for animal products.
8. Upper case characters in headings and references should be used sparingly, e.g. only the first word of paper titles, subheadings and any proper nouns begin upper case; similarly for the titles of papers from journals in the references and elsewhere.
9. Numbers in text should take the following forms: 300, 3000, 30 000 (not 30,000). Spell out numbers under 10 unless used with a unit of measure, e.g. nine pupils but 9 mm (do not use full stops (periods) within units). For decimals, use the form 0.05 (not .05, x 05 or 0x 05). "%" (not "per cent") should be used in typescripts.
10. If abbreviations are used in the text, either they should be defined in the text where first used, or a list of abbreviations can be provided, which should precede the authors' contributions and acknowledgements.
11. Figures and tables within appendices should continue the sequence of numbering from the main body of the text. Sections within appendices should be numbered, for example, C.1, C.2. Equations in appendices should be numbered, for example, (C 1), (C 2). If there is only one appendix, it is referred to as "the appendix" and not called "Appendix A".

Mathematics

Please click [here](#) for more information on the presentation of mathematical text.

Footnotes

Footnotes are not to be used except for designation of the corresponding author of the paper or current address information for an author (if different from that shown in the affiliation). Information concerning grant support of reviews should appear in a separate [Declaration of Interest section](#) at the end of the paper. Acknowledgments of the assistance of colleagues or similar notes of appreciation belong in a separate Acknowledgments section.

Footnotes to tables should be typed directly below the table and are indicated by the following symbols: * (asterisk or star), † (dagger), ‡ (double dagger), ¶ (paragraph mark), § (section mark), || (parallels), # (number sign). Reinitialize symbol sequence within tables. Greek and other special characters may be included. If you are unable to reproduce a particular special character, please type out the name of the symbol in full. Please ensure that all special characters used are embedded in the text.

Genetic Notation

For gene notation, please use the genetic notation and symbols approved by the HUGO Gene Nomenclature Committee (HGNC). Nomenclature guidelines are available and the

Gene Name Proposal form may be completed on the HGNC Web page (http://www.genenames.org/cgi-bin/hgnc_request.pl).

Nucleotide Depositing

In general, the journal recommends authors refer to the [MIBBI](#) Portal for prescriptive checklists for reporting biological and biomedical research. Any novel nucleotide sequences that are mentioned in submission require depositing with the [DNA Data Bank of Japan \(DDBJ\)](#), [European Molecular Biology Laboratory \(EMBL/EBI\) Nucleotide Sequence Database](#), or [GenBank](#) (National Center for Biotechnology Information). Please use GenBank accession numbers and be sure to include them in the final version of the manuscript.

Single nucleotide polymorphisms that require nomenclature should be submitted to the NCBI SNP (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/>) database. Please include ID numbers in the manuscript.

Editorial Policies

Authorship

According to the International Committee on Medical Journal Ethics (ICMJE), an author is defined as one who has made substantial contributions to the conception and development of a manuscript. Informa Healthcare adheres to the ICMJE guidelines (<http://www.icmje.org/#author>), which state that "authorship credit should be based on all of the following: 1) substantial contributions to conception and design, acquisition of data, or analysis and interpretation of data; 2) drafting the article or advising it critically for important intellectual content; and 3) final approval of the version to be published"¹. All other contributors should be listed as acknowledgments.

All submissions are expected to comply with the above definition. Changes to the authorship list after submission will result in a query from the publisher requesting written explanation.

Submission

Mitochondrial DNA considers all manuscripts on the strict condition that they have been submitted only to *Mitochondrial DNA*, that they have not been published already, nor are they under consideration for publication or in press elsewhere. Informa Healthcare adheres to the Code of Conduct and Best Practice Guidelines set forth by the [Committee on Publication Ethics \(COPE\)](#). As per these guidelines, failure to adhere to the above conditions will result in the editor and Informa publishing an appropriate correction, a statement of retraction, or enacting a withdrawal of the article. In extreme cases, offending authors may be banned from submitting to Informa Healthcare journals in the future, or reported to their institution's ethics committee.

Peer Review

All manuscripts will be subjected to confidential peer review by experts in the field and, on the basis of reviewers' feedback, papers will be accepted unconditionally, accepted subject to revision or rejected.

Ethics and Consent

- Do not use patients' names, initials, or hospital numbers, especially in illustrative material. Identifying information should not be published in written descriptions.

¹ Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals: Writing and Editing for Biomedical Publication. Available at: <http://www.icmje.org/>

photographs, and pedigrees unless the information is essential for scientific purposes and the patient (or parent or guardian) gives written informed consent for publication. Informed consent for this purpose requires that the patient be shown the manuscript to be published.

- To comply with FDAAA legislation, Informa Healthcare requires trial registration as a condition of publication for all studies involving clinical trials. Trial registration numbers should be included in the abstract, with full details provided in the methods section.
- Papers including animal experiments or clinical trials must be conducted with approval by the local animal care or human subject committees, respectively. All manuscripts, except reviews, must include a statement in the Introduction or Methods section that the study was approved by an Investigational Review Board (Animal Care and Use Committee), if applicable.
- When a product has not yet been approved by an appropriate regulatory body for the use described in the manuscript, the author must specify that the product is not approved for the use under discussion or that the product is still under investigation.

Further information on Ethics and Consent can be found by clicking [here](#).

Copyright

It is a condition of publication that authors assign copyright or license the publication rights in their articles, including abstracts, to Informa UK Ltd. This enables us to ensure full copyright protection and to disseminate the article, and the Journal, to the widest possible readership in print and electronic formats as appropriate. Authors may, of course, use the article elsewhere after publication without prior permission from Informa UK Ltd., provided that acknowledgement is given to the Journal as the original source of publication, and that Informa Healthcare is notified so that our records show that its use is properly authorised. Authors retain a number of other rights under the Informa UK Ltd. rights policies documents.

Authors are required to sign an agreement for the transfer of copyright to the publisher. All accepted manuscripts, artwork, and photographs become the property of the publisher. A copyright agreement form can be downloaded by corresponding authors of accepted manuscripts with proofs. This should be signed and returned to Informa Healthcare.

Authors are themselves responsible for obtaining permission to reproduce copyright material from other sources.

Further information on Permissions can be found by clicking [here](#).

Declaration of Interest

It is the policy of all Informa Healthcare, to adhere in principle to the [Conflict of Interest policy](#) recommended by the ICMJE. All authors must disclose any financial and personal relationships with other people or organizations that could influence (bias) their work. It is the sole responsibility of authors to disclose any affiliation with any organization with a financial interest, direct or indirect, in the subject matter or materials discussed in the manuscript (such as consultancies, employment, paid expert testimony, honoraria, speakers bureaus, retainers, stock options or ownership, patents or patent applications or travel grants) that may affect the conduct or reporting of the work submitted. All sources of funding (including NIH and NSF grants) are to be explicitly stated. If uncertain as to what might be considered a potential conflict of interest, authors should err on the side of full disclosure.

Declarations of Interest should be stated at the point of submission (within the manuscript, after the main text, under a subheading "Declaration of Interest", and within the appropriate field on the journal's ScholarOne site). Manuscript submission cannot be completed unless a declaration of interest statement is included. Declaration of Interest statements will be made available to reviewers and will appear in the published article. If any potential conflicts of

interest are found to have been withheld following publication, the journal will proceed according to [COPE guidance](#).

The intent of this policy is not to prevent authors with any particular relationship or interest from publishing their work, but rather to adopt transparency such that reviewers, editors, the publisher, and most importantly readers can make objective judgements concerning the work product.

NIH/Wellcome Public and Open Access Policies

In consideration of the National Institutes of Health (NIH) and Wellcome Public and Open Access Policies, Informa Healthcare acknowledges that the broad and open dissemination of NIH/Wellcome-funded research results may benefit future scientific and medical research. Because we value the current and future contributions our journals make to the scientific body of knowledge, we have made certain that our policies accommodate those authors who wish to submit to PubMed Central.

As part of our author services program, Informa Healthcare will deposit to PubMed Central (PMC) and UK PubMed Central (UKPMC) author manuscripts reporting NIH or Wellcome Trust funded research.

This service will help authors to comply with the NIH and Wellcome Trust revised 'Public Access Policy' and 'Open Access Policy', respectively.

NIH policy

NIH-funded authors must submit to PMC, or have submitted on their behalf, at the point of acceptance, their peer-reviewed author manuscripts, to appear on PMC no later than 12 months after final publication.

Click [here](#) for more information.

Wellcome Trust policy

Wellcome-funded authors must submit to UKPMC, or have submitted on their behalf, at the point of acceptance, their peer-reviewed author manuscripts, to appear on UKPMC no later than 6 months after final publication.

Click [here](#) for more information.

Informa Healthcare will deliver to PMC/UKPMC the final peer-reviewed manuscript, which was accepted for publication and that reflects any author-agreed changes made in response to the peer review. We will also authorise the author manuscript's public access posting 12 months (NIH) or 6 months (Wellcome Trust) after final publication in print or electronic form (whichever is the sooner). Following the deposit, authors will receive further communications from the NIH Manuscript Submission System/UK Manuscript Submission System with respect to the submission.

Under our Author Rights policy, authors also have the right to post their version of the submitted author manuscript (pre-print), or their version of the final published article (post-print) on their personal or institutional web site. Post-print web postings are subject to an embargo of 12 months. Please note that authors should not post manuscripts directly to PMC/UKPMC or other third party sites for any systematic external distribution by a third party (e.g., to a listserv or database connected to a public access server).

Additional Information

Proofs

Usual practice will involve corresponding authors receiving email notification with a password and web address from which to download a PDF. Hard copies of proofs will not be mailed. To avoid delays in publication, corrections to proofs must be returned within 48 hours, by electronic transmittal, fax or mail. Authors will be charged for excessive correction at this stage of production. If authors do not return page proofs promptly, the Publisher reserves the choice to either delay publication to a subsequent issue or to proceed to press without author corrections. The Publisher reserves the right to proceed to press without submitting page proofs to the author.

Reprints

Each corresponding author will receive a PDF file of the final version of their article. Reprints of individual articles are available for order at the time authors review page proofs. A discount on reprints is available to authors who order before print publication. Copies of the journal can be purchased at the author's preferential rate of \$25/£15 per copy.

Further information on Reprints can be found by clicking [here](#).

Color figure charges

Any figure submitted as a color original will appear in color in the Journal's online edition free of charge. Print copy color reproduction will only be considered on condition that authors bear the associated costs. The charge for the first page with color is US \$1010/£500, each subsequent page is charged at US \$515/£250. There are no charges for non-color pages.

Contact the publisher

Click [here](#) for contact details for the Publisher.