

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA DE AMBIENTES AQUÁTICOS
CONTINENTAIS

GUSTAVO HENRIQUE ZAIA ALVES

**Isótopos de carbono e nitrogênio explicam diferenças em fontes de energia e
segregação trófica de peixes em planícies de inundação Neotropicais**

Maringá
2015

GUSTAVO HENRIQUE ZAIA ALVES

Isótopos de carbono e nitrogênio explicam diferenças em fontes de energia e segregação trófica de peixes em planícies de inundação Neotropicais

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia de Ambientes Aquáticos Continentais do Departamento de Biologia, Centro de Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Maringá, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Ciências Ambientais.
Área de concentração: Ciências Ambientais

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Evanilde Benedito
Coorientador: Prof. Dr. David Joseph Hoeninghaus

Maringá
2015

"Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)"
(Biblioteca Setorial - UEM. Nupélia, Maringá, PR, Brasil)

A474i Alves, Gustavo Henrique Zaia, 1986-
Isótopos de carbono e nitrogênio explicam diferenças em fontes de energia e
segregação trófica de peixes em planícies de inundação Neotropicais / Gustavo Henrique
Zaia Alves. -- Maringá, 2015.
62 f. : il. (algumas color.).

Tese (doutorado em Ecologia de Ambientes Aquáticos Continentais)--Universidade
Estadual de Maringá, Dep. de Biologia, 2015.
Orientadora: Prof.^a Dr.^a Evanilde Benedito.
Coorientador: Prof. Dr. David Joseph Hoeninghaus.

1. Isótopos estáveis - Fluxo energético - Biogeoquímica - Planícies de inundação -
Brasil. 2. Teia alimentar - Espécies não-nativas - Nicho trófico - Planícies de inundação -
Brasil. 3. Interação trófica - Competição - Planícies de inundação - Brasil. I.
Universidade Estadual de Maringá. Departamento de Biologia. Programa de Pós-
Graduação em Ecologia de Ambientes Aquáticos Continentais.

CDD 23. ed. -577.130981
NBR/CIP - 12899 AACR/2

GUSTAVO HENRIQUE ZAIA ALVES

Isótopos de carbono e nitrogênio explicam diferenças em fontes de energia e segregação trófica de peixes em planícies de inundação Neotropicais

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia de Ambientes Aquáticos Continentais do Departamento de Biologia, Centro de Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Maringá, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Ciências Ambientais pela Comissão Julgadora composta pelos membros:

COMISSÃO JULGADORA

Prof.^a Dr.^a Evanilde Benedito
Nupélia/Universidade Estadual de Maringá (Presidente)

Prof. Dr. Rômulo Diego de Lima Behrend
Centro Universitário de Maringá (UniCesumar)

Prof.^a Dr.^a Norma Segatti Hahn
Nupélia/Universidade Estadual de Maringá

Dr. Luiz Felipe Machado Velho
Nupélia/Universidade Estadual de Maringá

Prof. Dr. Sidinei Magela Thomaz
Nupélia/Universidade Estadual de Maringá

Aprovada: em 18 de agosto de 2105.

Local da defesa: Anfiteatro Prof. “Kesiyu Nakatani”, Nupélia, Bloco G-90, *campus* da Universidade Estadual de Maringá.

Dedico este trabalho à minha avó,
Oneide Zaia (*in memoriam*), exemplo
de pessoa e de humildade, com quem
aprendi o gosto da leitura.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus, por ter me dado a perseverança e perspicácia para concluir mais esta etapa da minha vida acadêmica.

Aos meus pais, Ricardo e Maria Isabel, minha eterna gratidão! Obrigado Pai e Mãe por sempre estarem ao meu lado, me apoiando, confiando e acreditando em mim. Obrigado por sempre me incentivarem em todas as minhas decisões e por nunca deixarem a “peteca” cair nos momentos mais difíceis. Sem vocês nada disso seria possível, amo vocês!

À minha irmã Marília, obrigado pelo apoio e por compartilhar todos os momentos de angústias e alegrias. Valeu Má, por sempre estar ao meu lado! Te amo!

Agradeço imensamente à minha namorada, Juliana. Anjo, você foi peça fundamental para que essa etapa da minha vida acontecesse! Obrigado por segurar as pontas durante o período que fiquei fora e por apoiar as minhas decisões. Obrigado por sempre me ouvir, me aconselhar e abrir minha mente para enxergar sempre o melhor das coisas. Você é demais! Te amo!

Agradeço minha orientadora, Prof. Dr^a. Evanilde Benedito, por sempre acreditar no meu trabalho. Obrigado por todos os ensinamentos e por nunca medir esforços para que nossas ideias fossem colocadas em prática. Sou grato por tudo!

Special thanks for my co-advisor, Dr. David Hoeinghaus, who helped me a lot to frame my thesis and always made me think further. I appreciate all your suggestions and questioning. I learned a lot with you and it made me a better researcher.

Agradeço à todos os colegas de laboratório: Gislaine, Vivian (Xuxa), Patrícia, Laryssa, Bruno, Lucas Milani, Lucas Lolis, Leandro, Fabinho, Ju, Érica, Ana Lúcia, Ricardo, Regiane, Gabriel, Bia e Rosana pela convivência e por terem ajudado com todas minhas milhares de amostras e coletas, vocês foram fundamental para que esse trabalho fosse realizado com sucesso!

Um agradecimento especial para a Dr^a. Gislaine Manetta, amiga de todas as horas que nunca mediu esforços para a conclusão desse trabalho, contribuindo sempre. Obrigado Gi, você é muito especial!

Obrigado ao meu amigo-irmão Dr. Raffael Tófoli, que sempre esteve ao meu lado tanto para assuntos pessoais quanto profissionais. Valeu Bino, por tudo!

Agradeço meus amigos Gilberto, Rodrigo Pessin e Marcelo (vulgo Morcegão) pelos momentos de descontração e por sempre me apoiarem.

I also would like to thank all my friends from University of North Texas (Denton, TX), specially Cagney, Luke and Jessica for being so nice with me. Ya'll are awesome and made me feel at home over there! Thank you!

Obrigado à todos os integrantes do laboratório de Limnologia (em especial à Maria do Carmo Roberto – Du), por forcener os resultados das análises limnológicas, sem os quais este trabalho seria impossível de ser realizado.

Ao Núcleo de Pesquisas em Limnologia, Ictiologia e Aquicultura – Nupélia, pela estrutura e logística para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia de Ambientes Continentais (PEA).

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Ecologia de Ambientes Aquáticos Continentais (PEA), pelas aulas, pela acessibilidade, pelos ensinamentos e pela amizade.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão de bolsa de estudos de doutorado e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão de bolsa de doutorado “sanduíche”.

A todos envolvidos no projeto “Biodiversidade e ecologia de diferentes comunidades aquáticas em quatro importantes planícies de inundação brasileiras - SISBIOTA”, que não mediram esforços para que todas as amostragem fossem realizadas com sucesso.

Obrigado também às instituições parceiras desse projeto (INPA, UFMT e UnB), em especial aos professores Dr. Ludgero Vieira e Dr^a. Sidineia Amadio dos Santos, por proporcionarem toda a logística e infraestrutura para a realização das coletas.

À Aldenir e Jocemara, da secretaria do Programa de Pós-graduação em Ecologia de Ambientes Aquáticos Continentais (PEA), sempre muito atenciosas e prestativas.

Aos bibliotecários da biblioteca setorial do Nupélia: Maria Salete Ribelatto Arita e João Fábio Hildebrandt, sempre muito prestativos e atenciosos.

Agradeço ao Designer Gráfico do Nupélia, Jaime Luis Lopes Pereira, pela confecção dos mapas.

Agradeço antecipadamente à todos os integrantes da banca (titulares e suplentes) por dispenderem tempo para ler e avaliar esta tese.

E, por fim, para não cometer nenhuma injustiça, agradeço a todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho e para a minha formação profissional e pessoal.

Isótopos de carbono e nitrogênio explicam diferenças em fontes de energia e segregação trófica de peixes em planícies de inundação Neotropicais

RESUMO

As análises de isótopos estáveis têm se tornado uma ferramenta bastante popular entre os ecólogos. Isótopos estáveis de carbono, nitrogênio, hidrogênio e enxofre são atualmente utilizados para examinar uma série de atributos ecológicos de populações, comunidades e ecossistemas. Os isótopos estáveis mais comumente empregados por ecólogos de água doce são os de carbono ($\delta^{13}\text{C}$) e de nitrogênio ($\delta^{15}\text{N}$), os quais são utilizados como “marcadores” naturais de moléculas bióticas e abióticas, que são aplicadas para reconstruir processos ecológicos ou para traçar atividades ecológicas. Dentre os inúmeros ecossistemas de água doce, os sistemas rio-planície de inundação chamam a atenção por se tratar de ecossistemas extremamente complexos, com alta biodiversidade e elevada heterogeneidade de habitat, o que torna esses ambientes adequados para elucidar padrões e processos através da análise de isótopos estáveis. Dessa forma, é de suma importância reconhecer os fatores que afetam a variabilidade de isótopos de C e N, já que o mapeamento isotópico de ambientes naturais (paisagem isotópica - *isoscapes*) tem se mostrado uma ótima ferramenta para elucidar padrões de movimento de animais migradores, de origem e destino da matéria orgânica, inclusive, aquela de origem antropogênica. Além das paisagens isotópicas, a elucidação de nichos tróficos através de isótopos estáveis (e.g. nicho isotópico) também tem sido bastante utilizada, especialmente no que tange a competição por recursos tróficos entre espécies nativas e não-nativas. Dessa forma, o uso de isótopos estáveis vai além da aplicação de teorias ecológicas, constituindo-se em uma importante ferramenta para a tomada de decisões quando incorporados fatores antrópicos às análises. Assim, este trabalho aborda dois temas: o primeiro avalia os fatores que afetam a variação de $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$ de fontes de carbono em quatro planícies neotropicais (Paraná, Pantanal, Araguaia e Amazonas), destacando padrões locais (fatores limnológicos) e regionais (identidade de bacia). O segundo avalia a interação trófica da população de uma espécie de peixe invasora (*Serrasalmus marginatus*) e de uma espécie nativa (*S. maculatus*), através da análise de isótopos estáveis, em duas planícies de inundação, (Pantanal, em que as duas espécies são nativas; Paraná, em que *S. marginatus* é não nativa e potencial competidora de *S. maculatus*). Destaca-se que, devido a maior heterogeneidade dentro *versus* entre os ecossistemas abordados, deve-se explicitamente considerar a escala espacial para o controle heterogeneidade das fontes de carbono. Considerando a interação trófica das piranhas, não foram encontradas evidências de sobreposição de nicho entre as espécies estudadas, o que indica que a coexistência das espécies no ambiente de coocorrência não nativo é modulado pela segregação de nicho.

Palavras-chave: Biogeoquímica. Produtores primários. Espécies não-nativas. Nicho isotópico. *Serrasalmus*.

Carbon and nitrogen stable isotopes explain differences in energy sources and trophic segregation of fishes in Neotropical floodplains

ABSTRACT

Stable isotopes analyses have become a popular tool among ecologists. Carbon, nitrogen, hydrogen and sulfur stable isotopes are used to analyze many ecological attributes of populations, communities and ecosystems. The more commonly employed isotopes by freshwater ecologists are $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$, which are utilized as natural “markers” of biotic and abiotic molecules and are applied to reconstruct ecological processes or to trace ecological activities. Among the numerous freshwater ecosystems, river-floodplain systems are remarkable for being extremely complex ecosystems, with high biodiversity and high habitat heterogeneity, which makes these environments suitable to elucidate patterns and processes with stable isotopes. Thus, it is extremely important to recognize the factors that affect the variability of C and N isotopes, since the isotopic mapping of natural environments (isotopic landscape/isoscapes) has proven to be a great tool to elucidate migratory animal movement patterns, as well as the origin and fate of organic matter, including that of anthropogenic origin. Besides the isotopic landscapes, the elucidation of trophic niches through stable isotopes (e.g. isotopic niche) has also been widely used, especially when it comes to competition for food resources between native and non-native species. Therefore, the use of stable isotopes goes beyond the application of ecological theories, thus becoming an important tool for decision making when incorporated anthropogenic factors to the analysis. That being said, this thesis is divided into two themes: the first one assesses the factors that affect the variation of $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ of carbon sources in four Neotropical floodplains (Paraná, Pantanal, Amazon and Araguaia), highlighting local (limnological factors) and regional (basin identity) patterns. The second evaluates the trophic interactions of the population of an invasive fish species (*Serrasalmus marginatus*) and a native species (*S. maculatus*), through the analysis of stable isotopes in two floodplains (Pantanal, wherein the two species are native; and Paraná, where *S. marginatus* is non-native and potential competitor of *S. maculatus*). Due to the relatively greater heterogeneity within versus among systems in our study highlights that the spatial scale of sampling for control of baseline heterogeneity should be explicitly considered. As for the piranhas’ trophic interactions, we found no evidence of niche overlap between the species, indicating that the coexistence of the species in the non-native co-occurrence environment is modulated by the niche segregation.

Keywords: Geochemistry. Primary producers. Non-native species. Isotopic niche. *Serrasalmus*.

Tese formatada conforme as as normas das revistas científicas *Freshwater Biology*, disponível em: <
[http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1111/\(ISSN\)1365-2427](http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1111/(ISSN)1365-2427) >, e *Journal of Fish Biology*, disponível em <
[http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1111/\(ISSN\)1095-8649](http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1111/(ISSN)1095-8649) >.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL	10
REFERÊNCIAS	12
2 NUTRIENT AVAILABILITY AND BASIN IDENTITY EXPLAIN VARIATION IN CARBON AND NITROGEN STABLE ISOTOPE VALUES OF CARBON SOURCES IN FOUR NEOTROPICAL FLOODPLAINS.....	15
ABSTRACT	15
2.1 INTRODUCTION	16
2.2 MATERIAL AND METHODS.....	18
2.2.1 Study systems and river classifications	18
2.2.2 Sampling	20
2.2.3 Data analysis	23
2.3 RESULTS	23
2.4 DISCUSSION.....	31
REFERENCES	36
Appendix A	43
Appendix B	44
3 A SEGREGAÇÃO DE NICHOS ISOTÓPICOS EXPLICA A COEXISTÊNCIA DE DUAS ESPÉCIES DE PIRANHAS	ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
RESUMO.....	46
3.1 INTRODUÇÃO.....	47
3.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	49
3.2.1 Área de estudo	49
3.2.2 Amostragem.....	51
3.2.3 Análise dos dados	52
3.3 RESULTADOS	53
3.4 DISCUSSÃO	55
REFERÊNCIAS	58

1 INTRODUÇÃO GERAL

Em ambientes aquáticos continentais, as planícies de inundação associadas a grandes rios são excelentes sistemas para investigar os potenciais organizadores da biodiversidade para uma variedade de escalas espaciais. Os sistemas rio-planície de inundação incorporam muitos afluentes tendo cada um deles grande diversidade de habitats, que inclui ambientes como o próprio rio, canais e lagoas abertas a este conectado e lagoas fechadas (Thomaz et al., 1997). Outra importante característica de planícies de inundação é a ocorrência de pulsos de inundação regulares, períodos em que o nível da água aumenta, algumas vezes em vários metros, por um período de tempo, retornando, posteriormente, aos níveis iniciais (Junk et al., 1989). Assim, muitas comunidades bióticas são estruturadas e dependem diretamente da ocorrência regular de tais pulsos, como por exemplo, a bentônica, fitoplanctônica, zooplanctônica, de peixes e de macrófitas aquáticas (Twombly & Lewis, 1989; Oliveira & Calheiros, 2000; Agostinho et al., 2004; Higuti, 2004; Lansac-Tôha et al., 2004; Train & Rodrigues, 2004; Thomaz et al., 2004).

Vários aspectos fazem das planícies de inundação regiões de grande importância para pesquisas, em especial as abordadas nesse estudo. A área da planície de inundação do alto rio Paraná constitui o último trecho livre de represamento desse rio com importância fundamental na manutenção da biodiversidade. Por ser considerada uma área estratégica, várias unidades de Conservação têm sido criadas, incluindo a Área de Preservação Permanente (APA) das Ilhas e Várzeas do rio Paraná, APA de Ilha Grande e o Parque Estadual do Ivinheima, incluída como Reserva da Biosfera pela UNESCO. O Pantanal mato-grossense é uma das maiores áreas úmidas contínuas do planeta, sendo um bioma único caracterizado por alta produtividade biológica que se reflete em grande abundância de vida selvagem. Em 2000, o Pantanal recebeu dois títulos internacionais da UNESCO ao ser decretado Reserva da Biosfera e Patrimônio da Humanidade. Apesar deste grande valor socioeconômico e científico, bem como as evidências de impactos antropogênicos crescentes (Ferreira et al., 1994; Por, 2000; Swarts, 2000), poucos trabalhos ecológicos tem sido realizados nesta região.

Também, a bacia do rio Araguaia possui cerca de 76% da área de drenagem coberta pelo bioma Cerrado, que é considerado, segundo Myers et al. (2000), um dos 25 *hotspots* de biodiversidade do planeta. Além disso, parte da sua área ainda compreende uma região de transição da floresta tropical úmida da Amazônia. Esta última concentra boa parte da biodiversidade do planeta (Morais, 2002) e infelizmente, devido em parte a sua dimensão,

carece de informações sobre o papel funcional dos diferentes compartimentos ecológicos com vistas ao uso e conservação.

Dentro dos ecossistemas supracitados, as lagoas marginais são caracterizadas por ocuparem as depressões laterais do rio e apresentarem comunicação constante (lagoas abertas) ou intermitente (lagoas fechadas) com o rio (Souza Filho & Stevaux, 1995). Estas áreas são consideradas importantes locais para a manutenção e integridade da biodiversidade, proporcionando abrigo para peixes (Welcomme, 1979; Agostinho et al., 1993; Nakatani et al., 1997) e sendo utilizadas como berçário e locais de crescimento e recuperação da ictiofauna adulta (Agostinho et al., 1993). Esses ambientes também são locais preferenciais de espécies de peixes sedentárias e de pequeno, médio e grande porte, que passam todo seu ciclo de vida nestas áreas (Nakatani et al. 1997). Além disso, as lagoas que fazem parte das planícies de inundação, pelo fato de constituírem ambientes lênticos durante a maior parte do ciclo hidrológico, apresentam condições propícias para o desenvolvimento de comunidades fitoplanctônicas, perifíticas e de macrófitas aquáticas, o que se reflete em altas taxas de produtividade primária destes ecossistemas (Bonetto et al. 1984). Entretanto, alterações antrópicas, como a construção de reservatórios à montante destes ambientes, despejo de efluentes não tratados e introdução de espécies não nativas, podem influenciar de maneira negativa a estrutura das comunidades que vivem nesse ambiente (Thornton, 1990; Henry & Nogueira, 1999). Essas modificações podem acarretar alterações bióticas nestes ecossistemas com reflexo nas teias alimentares e na concentração de nutrientes disponíveis aos produtores primários (Briand & Cohen, 1987).

Uma das maneiras de se avaliar a tomada de nutrientes por parte dos produtores primários e as interações tróficas presentes em ecossistemas aquáticos é através da análise de isótopos estáveis (AIE, West et al., 2006). Os isótopos estáveis mais comumente empregados por ecólogos de água doce são os isótopos de carbono ($\delta^{13}\text{C}$) e de nitrogênio ($\delta^{15}\text{N}$) (utilizados como “marcadores” naturais de moléculas bióticas e abióticas). Dentre os muitos exemplos das aplicações de AIE, as razões isotópicas de carbono ($\delta^{13}\text{C}$) de plantas, algas e outras fontes de carbono registram os efeitos fisiológicos e ambientais na fotossíntese (Lopes et al., 2006), mostram o espectro de utilização de recursos por parte de consumidores (Benedito-Cecilio et al., 2000; Layman et al., 2007; Philippsen et al., 2015) e captam padrões biogeoquímicos em grande e pequena escala (Jepsen & Winemiller, 2007; Brosi et al., 2009); as razões isotópicas de nitrogênio ($\delta^{15}\text{N}$) demonstram informações da dieta e nível trófico em animais, fixação de nitrogênio em simbiose de plantas-micróbios (Post et al., 2002; Manetta et al., 2003; Pereira et al., 2007) e captam o enriquecimento de nitrogênio nos produtores

primários em ambientes poluídos e/ou eutrofizados (Cabana & Rasmussen, 1996; DeBruyn & Rasmussen, 2002; Bouillon et al., 2008; Schubert et al., 2013; Rožič et al., 2015).

Considerando toda esta gama de utilização desta ferramenta, planícies de inundação neotropicais são ambientes adequados para examinar diversos fatores que afetam as razões isotópicas de C e N. Estes ambientes apresentam alta biodiversidade (tanto de consumidores como de fontes de carbono), heterogeneidade ambiental e interações bióticas complexas, as quais só poderiam ser elucidadas com o auxílio da AIE. Dessa forma, esta tese encontra-se dividida em dois capítulos com o intuito de avaliar algumas dimensões dos fatores que regem a dinâmica de isótopos estáveis em planícies de inundação. O primeiro capítulo avalia os fatores que afetam a variação de $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$ de fontes de carbono em quatro planícies neotropicais, destacando padrões locais (fatores limnológicos) e regionais (identidade de bacia). O segundo capítulo trata da influência da população de uma espécie de peixe invasora no nicho isotópico de uma espécie congênere nativa em planícies de inundação e demonstra como isótopos podem ser utilizados na determinação das relações tróficas de populações de peixes.

REFERÊNCIAS

- Agostinho, A. A.; Júlio Jr, H. F.; Gomes, L. C.; Bini, L. M. & Agostinho, C. S. (1997) Composição, abundância e distribuição espaço-temporal da ictiofauna. In: Vazzoler, A. E. A. M.; Agostinho, A. A. & Hahn, N. S. (Eds.). *A planície de inundação do rio Paraná: aspectos físicos, biológicos e socioeconômicos*. Eduem/Nupélia, Maringá, pp.179-208
- Agostinho, A. A.; Vazzoler, A. E. E. M.; Gomes; L.C. & Okada, E. K. (1993) Estratificación y comportamiento de *Prochilodus scrofa* em distintas fases del ciclo de vida, em la planície de inundación del alto rio Paraná y embalse de Itaipu, Paraná, Brasil. *Revista de Hydrobiologia Tropical*, **26(1)**: 79-90.
- Agostinho, A. A.; Bini, L. M.; Gomes, L. C.; Júlio Jr., H. F.; Pavanelli, C. S.; Agostinho, C. S. (2004) Fish assemblages. In: Thomaz, S. M., Agostinho, A. A. & Hahn, N. S. (eds). *The upper Paraná River and its floodplain: physical aspects, ecology and conservation*. Leiden: Backhuys Publishers, 223-246.
- Benedito-Cecilio, E.; Araujo-lima, C. A. R. M.; Forsberg, B. R.; Bittencourt, M. M. & Martinelli, L. C. (2000) Carbon sources of Amazonian fisheries. *Fisheries Management and Ecology*, **7**: 305–315.
- Bonnetto, C. A.; Zalocar, Y. & Lancelle, H. G. (1984) A limnological study of an oxbow-lake covered by *Eichhornia crassipes* in the Paraná River. *Internationale Vereinigung für Theoretische und Angewandte Limnologie*, **22**: 1315-1318.
- Bouillon, S.; Connolly, R. M. & Lee, S. Y. (2008) Organic matter exchange and cycling in mangrove ecosystems: Recent insights from stable isotope studies. *Journal of Sea Research*, **59**: 44-58.

- Briand, F. & Cohen, J. E. (1987) Environmental correlates of food chain length. *Science*, **238**: 956-960.
- Brosi, B. J.; Daily, G. C.; Chamberlain, C. P. & Mills, M. (2009) Detecting changes in habitat-scale bee foraging in a tropical fragmented landscape using stable isotopes. *Forest Ecology and Management*, **258**: 1846-1855.
- Cabana, G. & Rasmussen, J. B. (1996) Comparison of aquatic food chains using nitrogen isotopes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **93**: 10844-10847
- DeBruyn, A. M. H. & Rasmussen, J. B. (2002) Quantifying assimilation of sewage organic matter by riverine benthos. *Ecological Applications*, **12**: 511-520.
- Ferreira, C. J. A.; Soriano, B. M. A.; Galdino, S. & Hamilton, S. K. (1994) Anthropogenic factors affecting waters of the Pantanal wetland and associated rivers in the Upper Paraguay River Basin of Brazil. *Acta Limnologica Brasiliensia*, **5**: 135-148.
- Henry, R. & Nogueira, M. G. (1999) A represa de Jurumirim: primeira síntese sobre o conhecimento limnológico e uma proposta preliminar de manejo ambiental. In Henry, R. (Ed.). *Ecologia de reservatórios: ecologia, funções e aspectos sociais*. Botucatu: FAPESP; FUNDIBIO. pp. 653-685.
- Higuti, J. (2004) Composition, density and habitats of benthic chironomid larvae. In: Thomaz, S. M.; Agostinho, A. A. & Hahn, N. S. (eds). *The upper Paraná River and its floodplain: physical aspects, ecology and conservation*. Leiden: Backhuys Publishers, 209-221.
- Jepsen, D. B. & Winemiller, K. O. (2007) Basin geochemistry and isotopic ratios of fishes and basal production sources in four neotropical rivers. *Ecology of Freshwater Fish* **16**: 267-281.
- Junk, W. J.; Bayley, P. B. & Sparks, R. E. (1989) The flood pulse concept in river-floodplain systems. In: Dodge, D. P. (ed.), *Proceedings of the International Large River Symposium (LARS)*. Canadian Special Publication of Fisheries and Aquatic Sciences, Ottawa: 110-127.
- Lansac-Tôha, F. A.; Bonecker, C. C. & Velho, L. F. M. (2004) Composition, species richness and abundance of the zooplankton community. In: Thomaz, S. M.; Agostinho, A. A. & Hahn, N. S. (eds). *The upper Paraná River and its floodplain: physical aspects, ecology and conservation*. Leiden: Backhuys Publishers, 145-190.
- Layman, C. G.; Arrington, D. A.; Montaña, C. G. & Post, D. M. (2007) Can stable isotope ratios provide for community-wide measures of trophic structure? *Ecology* **88**: 42-48.
- Lopes, C. A.; Benedito-Cecilio, E.; Martinelli, L. A. & Souza, M. C. (2006) Variability of $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ in Terrestrial and Aquatic Sources in The Upper Paraná River Basin, Paraná, Brazil. *Acta Limnologica Brasiliensia*, **18(3)**: 281-292.
- Manetta, G. I.; Benedito-Cecilio, E. & Martinelli, M. (2003) Carbon sources and trophic position of the main species of fishes of Baía River, Paraná River floodplain, Brazil. *Brazilian Journal of Biology*, **63(2)**: 283-290.
- Morais, A. C. R. (2002) *Meio ambiente e ciências humanas*. 3a edição. Hucitec São Paulo.
- Myers, N.; Mittermeier, R. A.; Mittermeier, C. G.; Fonseca, G. A. B. & Kent, J. (2000) Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature*, **403**: 853-858.
- Nakatani, K.; Baumgartner, G. & Cavicchioli, M. (1997) Ecologia de ovos e larvas de peixes. In: A. E. A de M. Vazzoler, A. A. Agostinho & N. S. Hahn (eds.) *A planície de inundação do alto rio Paraná: aspectos físicos, biológicos e socioeconômicos*. EDUEM, Maringá, pp. 281-306.

- Oliveira, M. D. & Calheiros, D. F. (2000) Flood pulse influence on phytoplankton communities of the south Pantanal floodplain, Brasil. *Hydrobiologia*, **427**: 101-112.
- Pereira, A. L.; Benedito, E. & Sakuragui, C. M. (2007) Spatial variation in the stable isotopes of ^{13}C and ^{15}N and trophic position of *Leporinus friderici* (Characiformes, Anostomidae) in Corumbá Reservoir, Brazil. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, **79**(1): 41-49.
- Philippsen, J. S.; Hauser, M. & Benedito, E. (2015) Isotopic niches of sympatric native and exotic fish species in a Neotropical floodplain. *Annals of the Brazilian Academy of Sciences* **87**, 825-833
- Por, F. D. (2000) The Pantanal (Mato Grosso, Brazil) and other “hemiendorheic” basins - paradigms for their conservation. *Verhandlungen des Internationalen Verein Limnologie*, **27**: 752-755.
- Post, D. M. (2002) Using Stable Isotopes to Estimate Trophic Position: Models, Methods, and Assumptions. *Ecology* **83**: 703–718.
- Rožič, R. P.; Dolenc, T.; Lojen, S.; Kniewald, G. & Dolenc, M. (2014) Use of stable isotope composition variability of particulate organic matter to assess the anthropogenic organic matter in coastal environment (Istra Peninsula, Northern Adriatic). *Environmental Earth Sciences*, **73**: 3109-3118.
- Schubert, P. R.; Karez, R., Reusch, T. B. H. & Dierking, J. (2013) Isotopic signatures of eelgrass (*Zostera marina* L.) as bioindicator of anthropogenic nutrient input in the western Baltic Sea. *Marine Pollution Bulletin*, **72**: 64-70.
- Souza Filho, E. E. & Stevaux, J. C. (1995) Geologia e geomorfologia fluvial. In: FINEP. *Estudos ambientais da planície de inundação do Rio Paraná, no trecho compreendido entre a foz do Rio Paranapanema e o Reservatório de Itaipu*: Relatório final de projeto. Maringá: FUEM-Nupelia; São Paulo:FINEP. pp. 205-235.
- Swarts, F. A. (2000) *The Pantanal: Understanding and preserving the world's largest wetland*. St. Paul: Paragon House.
- Thomaz, S. M.; Roberto, M. C. & Bini, L.M. (1997) Caracterização limnológica dos ambientes aquáticos e influência dos níveis fluviométricos. In: Vazzoler, A. E. A. M.; Agostinho, A. A. & Hahn, N. S. (eds.). *A planície de inundação do alto rio Paraná: aspectos físicos, biológicos e socioeconômicos*. Eduem/Nupélia, Maringá, pp. 73-102.
- Thomaz, S. M.; Bini, L. M.; Pagioro, T. A.; Murphy, K. J.; Santos, A. M. & Souza, D. C. (2004) Aquatic macrophytes: diversity, biomass and decomposition. In: Thomaz, S. M.; Agostinho, A. A. & Hahn, N. S. (eds). *The upper Paraná River and its floodplain: physical aspects, ecology and conservation*. Leiden: Backhuys Publishers, pp. 331-352.
- Thomnton, K. W. (1990) Sedimentary processes. In: Kimmel, B. L. & Payne, F. E. (eds.). *Reservoir limnology: ecological perspectives*. New York: John Wiley and Sons. pp. 43-69.
- Train, S. & Rodrigues, L. C. (2004) Phytoplanktonic assemblages. In: Thomaz, S. M.; Agostinho, A. A. & Hahn, N. S. (eds). *The upper Paraná River and its floodplain: physical aspects, ecology and conservation*. Leiden: Backhuys Publishers, pp. 103-124.
- Twombly, S. & Lewis, W. M. (1989) Factors regulating cladoceran dynamics in a Venezuelan floodplain lake. *Journal of Plankton Research*, **11**: 317-333.
- Welcomme, R. L. (1979) *Fisheries ecology of floodplain rivers*. London, Longman, 317 p.
- West, J. B.; Bowen, G. J.; Cerling, T. E. & Ehleringer, J. R. (2006) Stable isotopes as one of nature's ecological recorders. *TRENDS in Ecology and Evolution*, **21**(7): 408-414.

2 NUTRIENT AVAILABILITY AND BASIN IDENTITY EXPLAIN VARIATION IN CARBON AND NITROGEN STABLE ISOTOPE VALUES OF CARBON SOURCES IN FOUR NEOTROPICAL FLOODPLAINS

ABSTRACT

Tropical river floodplain ecosystems are well suited for examining factors affecting stable isotope values of carbon sources, due to high species and functional diversity of carbon sources and consumers and spatial heterogeneity. Thus, the objective of this study was to examine variation in stable carbon and nitrogen isotope values of six carbon sources in four Neotropical floodplain river systems (Amazon, Araguaia, Pantanal and Paraná) and determine if geological formation (i.e. basin identity) and local limnological conditions (e.g. pH, turbidity, nutrient concentrations) can predict among- and within-floodplain differences in isotopic values of $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$. Basal carbon sources were sampled at multiple locations within each floodplain and corresponding local limnological conditions were quantified. Regression trees used geologic formation and limnological conditions to predict carbon and nitrogen isotope values of each source. We did not detect biogeographic or biochemical patterns for our four floodplain study systems. Only very minor differences in $\delta^{15}\text{N}$ values of sources were observed among basins, and $\delta^{13}\text{C}$ did not differ among basins for any source. Although $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ values exhibited significant correlations with some limnological factors, those relationships were generally weak and the patterns differed among carbon sources. When considering basin identity and local limnological conditions together, regression trees for both $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ for all sources depicted complex and in some cases nested relationships, and only very limited similarity was observed among trees for different carbon sources. Our findings indicate a strong effect of local limnological conditions on $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$, regardless of basin. That being said, it is worth to highlight that there is a complex picture of the effects of local conditions versus landscape differences on the carbon and nitrogen isotope values of production sources. At the landscape scale, $\delta^{13}\text{C}$ of carbon sources was relatively conserved across systems, which is good news for comparing patterns of carbon flow, but $\delta^{15}\text{N}$ differed among systems as well as among sources within systems (in some cases more than the expected effect of trophic fraction), which is a significant concern when studying trophic interactions. Such variability in the $\delta^{15}\text{N}$ baseline is often accounted for by using primary consumers as indicators of baseline values. The relatively greater heterogeneity within versus among systems in our study highlights that the spatial scale of sampling for control of baseline heterogeneity should be explicitly considered.

Keywords: geochemistry, food webs, isoscape, isotopic baseline, primary productivity.

2.1 INTRODUCTION

Carbon is the currency of ecosystems. Recent studies in freshwater ecosystems are seeking to improve understanding of carbon flow in food webs by testing general conceptual models such as the River Continuum Concept (RCC; Vannote et al., 1980), Flood Pulse Concept (FPC; Junk et al., 1989), Riverine Productivity Model (RPM; Thorp & Delong, 1994), and River Wave Concept (RWC; Humphries et al., 2014). Stable isotopes, particularly of carbon and nitrogen, have been influential in this work (Bunn et al., 2003; Doi et al., 2007; Hoeinghaus et al., 2007; Medeiros & Arthington, 2011; Pingram et al., 2012; Fellman et al., 2013; Roach, 2013, Costas & Pardo, 2014). One major issue with testing the aforementioned models using stable isotope analyses (SIA) is the ability of the isotopes to reliably distinguish among potential sources and/or size fractions within and among ecosystems. This is often complicated by the diverse suite of potential carbon sources (both autochthonous and allochthonous) in freshwater ecosystems, and the spatially and temporally dynamic nature of their availability (e.g. Hoeinghaus et al., 2008; Zeug & Winemiller, 2008; Hadwen et al., 2010).

In freshwater ecosystems, the substrate for autochthonous photosynthesis is dissolved carbon dioxide or bicarbonate (grouped as dissolved inorganic carbon – DIC). The dominant form of DIC present in aquatic ecosystems is determined by pH and alkalinity (Stumm & Morgan, 1981; Gray et al., 2011) which also influence the ratio of heavy to light isotopes of carbon ($\delta^{13}\text{C}$) of the DIC (Bade et al., 2004). The $\delta^{13}\text{C}$ of the DIC can also be affected by salinity or nutrient limitation (Lin & Sternberg, 1992; McKee et al., 2002), pressure of CO_2 as a result of terrestrial respiration of organic material (Striegl et al., 2001), ecosystem area and metabolism (Finlay, 2003; Bade et al., 2004), geology and hydrology (Bullen & Kendall, 1998), and basin geochemistry (Jepsen & Winemiller, 2007). Subsequently, the factors that determine the $\delta^{13}\text{C}$ of primary producers are complex because of the influences of spatial heterogeneity at multiple scales, such as local habitat, reach, watershed, hydrology and geochemistry (Doi et al., 2007; Casey & Post, 2011; Costas & Pardo, 2014).

Similarly, $\delta^{15}\text{N}$ of basal carbon sources can vary according to many factors, including salinity, basin geochemistry, level of eutrophication and preference for the form of dissolved inorganic nitrogen by plants (NH_4^+ or NO_3^- ; Cabana & Rasmussen, 1996; Finlay & Kendall, 2007; Yu et al., 2014; Viana & Bode, 2015). Pollution from urban sewage or agriculture is an important factor affecting $\delta^{15}\text{N}$ (DeBruyn & Rasmussen, 2002; Bouillon et al., 2008;

Winemiller et al., 2011; Schubert et al., 2013; Rožič et al., 2015), and areas with human wastewater inputs are consistent with high amounts of dissolved inorganic nitrogen and elevated $\delta^{15}\text{N}$ in the sediment and organisms (Cabana & Rasmussen, 1996; Lake et al., 2001; Rožič et al., 2015). For this reason, nitrogen stable isotope composition is a useful tracer of biogeochemical processes in the water column and of nutrients derived from multiple sources (e.g. animal wastes, septic systems, sewage treatment plants; Sieglo & Macko, 2002; Sarà et al., 2010; Chen et al., 2014; Kumar et al., 2014; Rožič et al., 2015).

Tropical river floodplain ecosystems are well-suited for examining factors affecting stable isotope values of carbon sources, due to high species and functional diversity of carbon sources and consumers, spatial heterogeneity, importance for freshwater biodiversity, and historical use in testing river ecosystem concepts (e.g. Hoeinghaus et al., 2007, 2008). Furthermore, evidence from previous studies in floodplain ecosystems (e.g. Lewis et al., 2001; Bunn et al., 2003; Fellerhoff et al., 2003; Jepsen & Winemiller, 2007) has helped to frame the discussion of potential drivers of variability in isotopic values of sources. For example, Jepsen & Winemiller (2007) found that basin geochemistry (i.e. whitewater vs. blackwater) determined between-river isotopic differences in sources and consumers in tropical rivers of Venezuela, allowing for isotope values to be used as tracers of fish movement between systems (Winemiller & Jepsen, 2004). Understanding the factors that affect variability in stable isotope values of sources within and among floodplains is important for tests of the aforementioned river ecosystem concepts. Furthermore, if local limnological conditions distinguish source values within floodplains in a predictable manner, those differences may yield a spatially and seasonally relevant isotopic landscape enabling stable isotopes to be used as tracers of organism movement among patches within floodplains [e.g. Brosi et al. (2009) for bees in a fragmented tropical landscape].

The objective of this study was to examine variation in stable carbon and nitrogen isotope values of six carbon sources in four Neotropical floodplain river systems and determine if geological formation (i.e. basin identity) and local limnological conditions (e.g. pH, turbidity, nutrient concentrations) can predict among- and within-floodplain differences in isotopic values of $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$. The Amazon, Araguaia, Pantanal and Paraná study systems capture continental-scale differences in geological formations as well as include significant within-basin heterogeneity of local limnological conditions. Basal carbon sources were sampled at multiple locations within each floodplain and corresponding local

limnological conditions were quantified. Regression trees used geologic formation and limnological conditions to predict carbon and nitrogen isotope values of each source.

2.2 MATERIAL AND METHODS

2.2.1 Study systems and river classifications

This study was conducted in four Brazilian river-floodplain ecosystems: Upper Paraná River floodplain (Paraná, Baía and Ivinheima rivers), Pantanal floodplain (Paraguai and Miranda rivers), Araguaia River floodplain and Amazon floodplain (Solimões and Amazonas rivers) (Figure 1). All of these systems have regular flooding periods during the rainy season of the Neotropics (Junk et al., 1989), and support high biodiversity of organisms, including fishes, invertebrates and carbon sources. Rivers can be generally classified as whitewater, clearwater or blackwater (Sioli, 1984), based on conditions in the catchment area that affect water color, load of suspended solids, pH, and load of dissolved minerals. Applied to our study systems, only the Solimões/Amazon is whitewater (Sioli, 1975), and the remainder may be primarily considered clearwater (see descriptions of the ecosystems below). That being said, Sioli's (1984) classification of large clearwater rivers includes pH values ranging between 6 and 6.7, and combined with the distribution of clearwater rivers over diverse geological zones, demonstrates that 'clearwater' is a chemically (and biologically) heterogeneous classification with only a poorness in suspended particles as a common character (Sioli, 1984). Furthermore, floodplain ecosystems have a wide range of the aforementioned parameters due to their inherent spatial heterogeneity (e.g. among channels and floodplain lakes of various size and connectivity), and not all location environments fit nicely into the same general classification applied at the landscape scale.

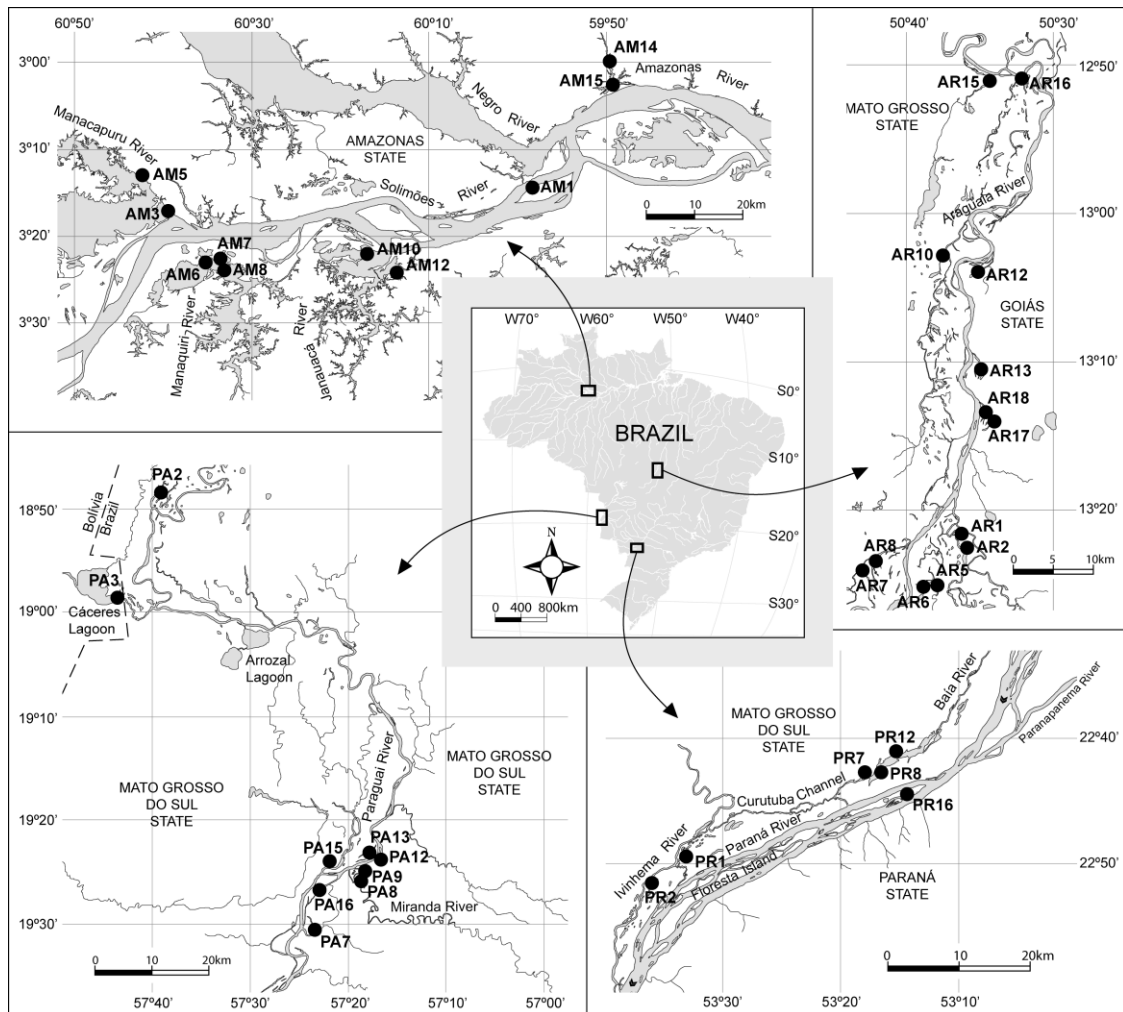


Figure 1. Map of the samples stations. Each point in the map (●) represents a lake where the carbon sources, as well as the limnological parameters, were sampled. PR = Paraná, PA = Pantanal, AR = Araguaia and AM = Amazon.

The Paraná River is the tenth largest river in the world in annual discharge ($5.0 \times 10^8 \text{ m}^3 \text{ y}^{-1}$) and fourth in drainage area ($2.8 \times 10^6 \text{ km}^2$). The Upper Paraná River is one of the most extensively dammed river basins in the world, with over 130 major reservoirs (dam height $\geq 10 \text{ m}$) on the eastern side, among which 20% are larger than 10,000 ha (Gomes & Miranda, 2001; Agostinho et al., 2007). The hydrology of the Paraná River is strongly influenced by an upstream cascade of reservoirs that retains sediment and nutrients, resulting in clear oligotrophic water in the main channel by the time it reaches the floodplain (Souza Filho, 2009). The floodplain is a mosaic of lakes and channels belonging to three main affluents (Paraná, Baía and Ivinheima rivers) with watercolor from clear to greenish to light brown, pH from 6.16 to 6.93, and watersheds comprised by a mix of forest, pasture and urban areas.

The Pantanal is one of the world's largest tropical wetlands, occupying an area of approximately 450 by 250 km ($140,000 \text{ km}^2$). The main tributary of the Pantanal ecosystem is

the Paraguai River, which runs from north to south along the western side of the Pantanal, collecting water from the various tributaries and non-channelized floodplain flow paths (Hamilton, 2002). The flood regime inside the Pantanal is variable (Junk et al., 2006); due to slight declivity of the terrain ($2\text{--}3\text{ cm}\cdot\text{km}^{-1}$ North to South and $5\text{--}25\text{ cm}\cdot\text{km}^{-1}$ East to West), the flood pulse in the northern region coincides with the rainy season but there is a time lag of approximately three months between the rainy season and flooding in the southern region (Alvarenga et al., 1984; Junk et al., 2006). Watercolor across the sampled region ranges between green (Paraguai River) and brown (Miranda River), with abundant aquatic vegetation and pH ranging from 6.04 to 7.44, and a primarily grassland and forested watershed.

The Araguaia River is a $385,000\text{ km}^2$ watershed in the eastern Amazon region with average discharge of approximately $6,500\text{ m}^3/\text{s}$. The middle Araguaia (1,160 km extending from the city of Registro do Araguaia to Conceição do Araguaia) is characterized by a well-developed alluvial plain with a drainage area of $320,290\text{ km}^2$ (Latrubesse & Stevaux, 2002). Approximately 85% of the Araguaia watershed is savannah (locally known as *Cerrado*). The Cerrado ecoregion is considered a hotspot for biodiversity (Myers et al., 2000) and is the headwater region of the major rivers of eastern South America. Rivers located in the Cerrado are usually classified as clearwater, and our study locations had light brown to greenish water color and pH from 6.33 to 7.37.

Wetlands on the alluvial floodplains of the Amazon River and tributaries in Brazil are believed to cover over $300,000\text{ km}^2$ (Klinge et al., 1990). The Brazilian Amazon floodplain comprises three major rivers, the Negro, Solimões and Amazonas. The Solimões and Amazonas rivers are classic representatives of Amazonian whitewater rivers, with water that is turbid and loamy due to high content of suspended mineral solids primarily originated from the Andes Mountains, rich in nutrients and electrolytes, and pH neutral ($6.2\text{--}7.2$; Sioli, 1984; Furch & Junk, 1997). Limnological conditions among floodplain lakes in our study (some of which were isolated from the main channel) were heterogeneous, including a range of pH from 5.02 to 8.83.

2.2.2 Sampling

Sampling was conducted in floodplain lakes during the dry season for each floodplain (Figure 1). At each location (six in Paraná, nine in Pantanal, thirteen in Araguaia and ten in Amazon), temperature, dissolved oxygen concentration, turbidity, electrical conductivity, and pH were measured using handheld probes. Transparency was measured with a black and

white Secchi disk. Water samples were collected at subsurface limnetic region and packaged in polyethylene gallon for laboratory analysis of phosphorous and nitrogen concentrations (Table 1).

The water samples were stored in an ice chest and taken to the nearest field station, where they were filtered through GF 52-C membranes (<10 hours after sampling) and immediately frozen ($-20\text{ }^{\circ}\text{C}$) for further analyses of dissolved nutrients. Water was also frozen at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ before filtering to measure total nitrogen and total phosphorus. Total-N was analyzed with the persulfate method with oxidations of all nitrogenous compounds to N-nitrate (Bergamin et al., 1978). This ion was determined in a spectrophotometer after reducing N-nitrite in the presence of cadmium, using a flow-injection system (Giné et al., 1980). N-ammonium was quantified by the indophenol blue method, also read in a spectrophotometer (Mackereth et al., 1978). Total and reactive dissolved P were measured in a spectrophotometer, according to Golterman et al. (1978).

Primary carbon sources collected for this study included C_3 riparian vegetation, C_3 aquatic macrophytes, C_4 plants, periphyton, phytoplankton, and particulate organic carbon (POC). Three to five samples of each were collected from each site, where available. Riparian vegetation and aquatic macrophytes consisted of leaves of the most common and abundant vascular plants in each sample site, separated by species, dried and grounded. Periphyton was obtained by gently scraping the stem of aquatic plants (or, when aquatic plants were absent, from any material colonized by periphyton). Phytoplankton was sampled in the littoral and limnetic zones of each sample site using a $15\mu\text{m}$ plankton net horizontally dragged twice in each zone for about 3 minutes on the subsurface water, constituting 4 samples per lake. Each sample of phytoplankton was stored in a 500ml bottle for further filtering. POC was obtained by filtering water collected directly from the subsurface of littoral and limnetic zones in each lake, in a 500ml bottle. The periphyton and all the volume of water samples with phytoplankton and POC were filtered and retained on pre-combusted (400°C for 4 hours) 47mm glass fiber filters (Whatman GFC).

All samples were dried in an oven at 60°C for 72h hours and macerated to obtain a fine and homogeneous powder. Samples of approximately 3-4mg were stored in tin capsule and sent to the University of California at Davis Stable Isotope Facility for determination of carbon and nitrogen isotope ratios. Results are expressed in delta notation (parts per thousand deviation from a standard material): $\delta^{13}\text{C}$ or $\delta^{15}\text{N} = [(R_{\text{sample}}/R_{\text{standard}}) - 1] * 1000$; where $R = {}^{13}\text{C}/{}^{12}\text{C}$ or ${}^{15}\text{N}/{}^{14}\text{N}$. The standard material for carbon is Pee Dee Belemnite (PDB) limestone,

and the nitrogen standard is atmospheric nitrogen. Standard deviations of $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ for five different replicate analyses of internal standards were between 0.04‰ and 0.13‰ and 0.09 ‰ and 0.22 ‰, respectively.

2.2.3 Data analysis

Principal coordinate analysis (PCoA) was performed to reduce the dimensionality of the limnological data, and the broken-stick criteria (Peres-Neto et al. 2005) was used to determine the relevant number of axes for interpretation. Multivariate analysis of variance (MANOVA) was subsequently applied using PC loadings to test for differences among basins. ANOVA was used to test for differences in isotopic values (separately for $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$) of each source among basins, with a Tukey HSD *post hoc* test for distinguishing pairwise relationships among basins following a significant main effect. Pearson's correlations were performed between all limnological parameters as well as between isotope values ($\delta^{13}\text{C}$ or $\delta^{15}\text{N}$) and those parameters.

Regression trees were used to predict isotope values (separately for $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$) based on limnological parameters and basin identity (i.e. as a surrogate for geologic formation). Classification and regression trees are powerful nonparametric approaches to modeling complex ecological data and provide a flexible alternative to linear and additive models (De'ath & Fabricius, 2000). Tree generation involves successively partitioning the response variable into increasingly homogeneous subsets based on fit with predictor variables, including an ability to identify and express non-linear, nested and non-additive relationships. This is particularly appealing in situations where hierarchical interactions are present, and relationships between the response variable and some predictor variables are conditional on the values of other predictors (Joel et al., 1994). We used the Gini index to minimize impurity of non-parent nodes, the minimum number of observations at a node in order for a split to be attempted (*minsplit*) was set at 10, and maximum tree depth (*maxdepth*) was set at 4. The optimum size of the regression trees (*pruning*) was determined by selecting the tree size with the smallest model error based on repeated cross-validation of the data. The remainder of parameters were retained at the default settings.

All analyses were conducted using R (R Core Team, 2014). Specifically, regression trees were performed using the package Rpart (Therneau et al., 2014) and the other analyses were performed using the packages Stats (R Core Team, 2014) and Vegan (Oksanen et al., 2014). Significance of statistical tests was assessed at $\alpha=0.05$.

2.3 RESULTS

The first two PCoA axes explained 59% of the variation in limnological conditions among sites (Figure 2). The first axis separated the sample sites based on turbidity and nutrient concentrations (primarily TN and TP) at positive values, and water clarity (i.e. Secchi depth) at negative values. Secchi depth and ammonia concentration were associated with positive values on PC2, whereas pH, conductivity and phosphate concentration were the primary variables associated with negative values on PC2. Although sampling locations in Amazonas had, on average, higher nutrient concentrations and turbidity (Table 1), substantial within basin heterogeneity resulted in broadly overlapping distributions of basins in the PCoA and a non-significant MANOVA (Figure 2; Pillai=0.32; $F_{3,34}=2.14$; $p=0.06$). Similar to the pattern of axis loadings in the PCoA, several limnological parameters were highly correlated in pairwise comparisons (Figure 3). Specifically, strong positive correlations were observed among turbidity, TN, TP and NH_4 , and between pH and conductivity, whereas Secchi depth was negatively correlated with TP and PO_4 (Figure 3).

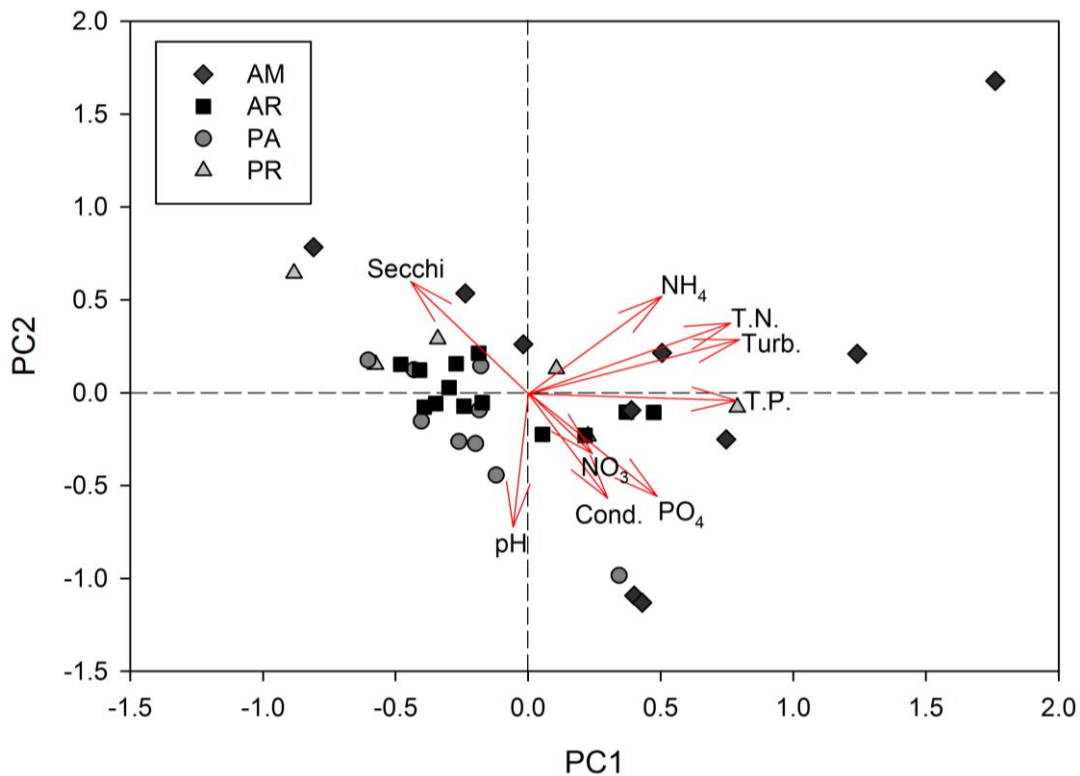


Figure 2. PCoA of limnological conditions among sampling locations and basins. AM=Amazonas; AR=Araguaia; PA=Pantanal; PR=Paraná.

Table 1. Mean (\pm standard deviation) limnological parameters for each basin. TN=Total Nitrogen; TP=Total Phosphorous; Turb=Turbidity; Cond=Conductivity; n=number of sample sites.

Floodplain (n)	Paraná (6)	Pantanal (9)	Araguaia (13)	Amazonas (10)
Secchi (m)	0.65(\pm 0.54)	0.51(\pm 0.14)	0.49(\pm 0.15)	0.41(\pm 0.35)
Turb (NTU)	42.50(\pm 39.35)	19.79(\pm 16.09)	31.40(\pm 20.25)	78.01(\pm 75.87)
pH	6.62(\pm 0.29)	6.81(\pm 0.50)	6.89(\pm 0.26)	6.31(\pm 1.08)
Cond (μS/cm)	30.18(\pm 15.19)	83.99(\pm 47.06)	38.38(\pm 7.78)	75.76(\pm 64.49)
TN (μg/L)	1483.10(\pm 742.29)	1075.70(\pm 69.55)	1287.80(\pm 313.64)	2597.90(\pm 1705.44)
NO₃ (μg/L)	21.47(\pm 52.58)	37.46(\pm 57.90)	24.10(\pm 69.11)	46.47(\pm 79.32)
NH₄ (μg/L)	43.83(\pm 28.84)	28.59(\pm 20.28)	28.43(\pm 31.31)	44.41(\pm 78.45)
TP (μg/L)	63.73(\pm 36.69)	52.26(\pm 16.56)	85.63(\pm 29.10)	113.27(\pm 50.75)
PO₄ (μg/L)	17.03(\pm 10.43)	14.52(\pm 6.53)	12.69(\pm 4.61)	15.45(\pm 8.18)

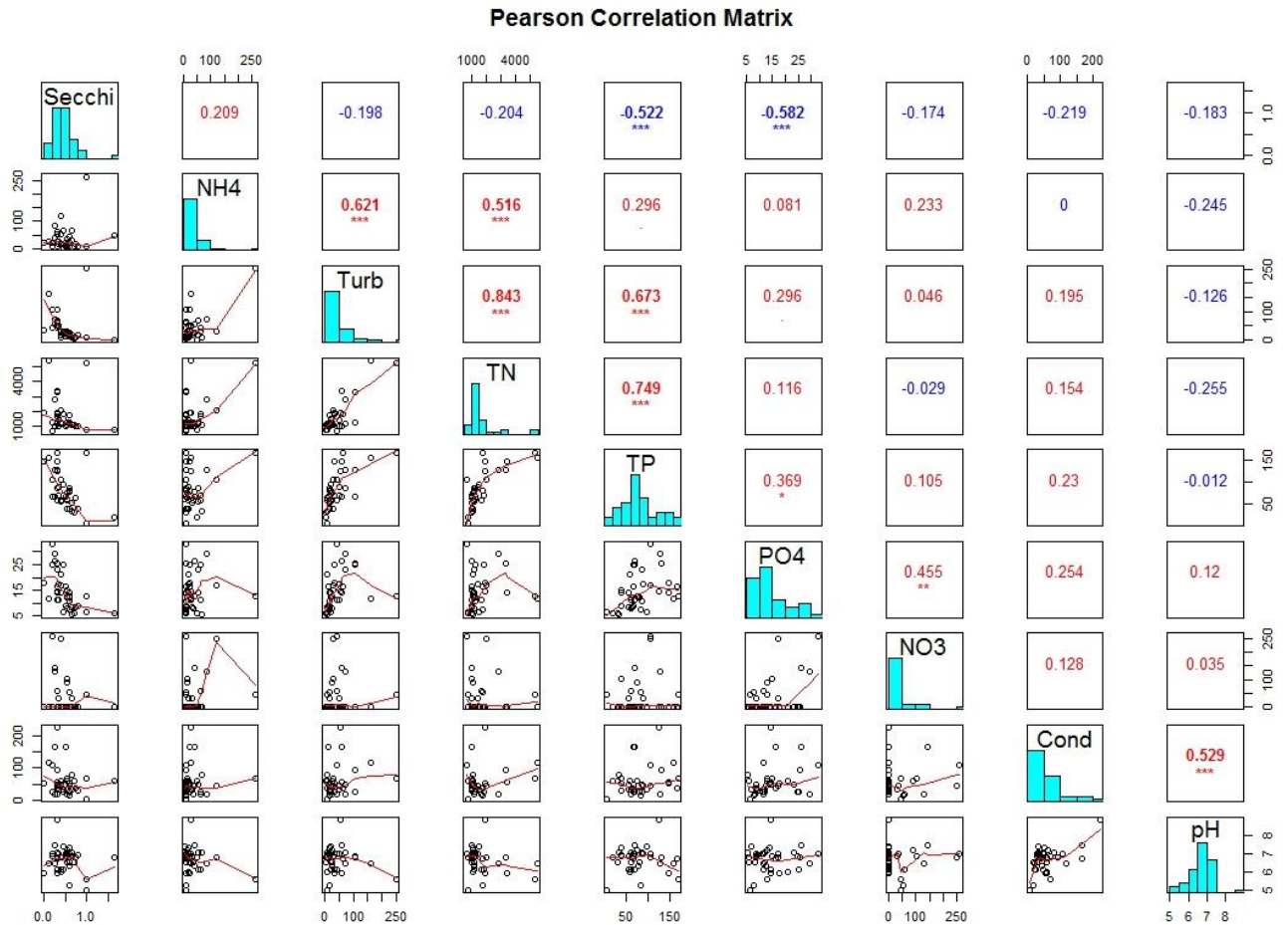


Figure 3. Pearson correlation matrix of limnological parameters. Coefficients are provided above the diagonal, with positive correlations in red and negative correlations in blue. Raw values are provided below the diagonal. Asterisks designate significance level (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$). Turb=Turbidity, Cond=Conductivity, TN=Total Nitrogen, TP=Total Phosphorous.

No significant differences were observed for $\delta^{13}\text{C}$ values of carbon sources among basins (Table 2). In contrast, significant differences in $\delta^{15}\text{N}$ were observed among basins for all carbon sources except C_4 plants (Table 2). Sources from the Araguaia floodplain were consistently more ^{15}N -enriched than in the other basins (Table 2), and exhibited significant differences between the Pantanal for C_3 riparian vegetation, the Paraná floodplain for periphyton and phytoplankton, and among all other basins for POC. C_3 macrophytes, which were not collected in the Araguaia basin, had significantly higher $\delta^{15}\text{N}$ in the Pantanal than Paraná (Table 2). $\delta^{15}\text{N}$ values for sources from Amazonas were intermediate in all cases.

Table 2. Mean (‰) and standard deviation (\pm SD) of carbon and nitrogen isotope values for each carbon source, and ANOVA results for the test of differences among basins. PR=Paraná; PA=Pantanal; AR=Araguaia; AM=Amazon; n=number of samples for each source in each basin. Shared underlines indicate lack of significant differences for the Tukey *post hoc* test. See Appendix 1 for graphs.

Source	PR	PA	AR	AM	ANOVA		
	Mean (\pm SD)				F _{df}	p	Tukey test
C₃ Macrophytes (n)	19	38	0	10			
$\delta^{13}\text{C}$	-29.49 (0.85)	-29.05 (1.36)	-	-29.62 (1.15)	F _{2,64} =1.34	0.270	-
$\delta^{15}\text{N}$	4.86 (2.41)	7.54 (2.17)	-	5.53 (0.49)	F _{2,64} =10.61	<0.001	<u>PR</u> <u>AM</u> <u>PA</u>
C₃ Riparian Vegetation (n)	25	42	54	37			
$\delta^{13}\text{C}$	-29.86 (1.46)	-30.04 (1.20)	-30.08 (1.16)	-30.50 (0.94)	F _{3,154} =1.74	0.162	-
$\delta^{15}\text{N}$	4.64 (2.68)	3.12 (3.06)	4.65 (2.30)	3.68 (1.47)	F _{3,154} =3.91	0.010	<u>PA</u> <u>PR</u> <u>AM</u> <u>AR</u>
C₄ Plants (n)	1	13	1	10			
$\delta^{13}\text{C}$	-12.82	-12.49(0.67)	-12.56	-12.60 (1.02)	F _{3,21} =0.07	0.976	-
$\delta^{15}\text{N}$	6.20	5.21(2.64)	9.92	6.43 (1.43)	F _{3,21} =1.74	0.191	-
Periphyton (n)	12	17	20	7			
$\delta^{13}\text{C}$	-29.03 (1.82)	-26.26 (5.42)	-27.21 (2.55)	-25.03 (0.78)	F _{3,52} =2.30	0.088	-
$\delta^{15}\text{N}$	4.72 (1.69)	5.87 (1.20)	6.22 (1.49)	5.17 (0.83)	F _{3,52} =3.31	0.027	<u>PR</u> <u>AM</u> <u>PA</u> <u>AR</u>
Phytoplankton (n)	25	36	52	36			
$\delta^{13}\text{C}$	-30.10 (3.07)	-30.83 (3.79)	-30.19 (1.93)	-30.12 (1.94)	F _{3,145} =0.59	0.621	-
$\delta^{15}\text{N}$	3.96 (2.30)	5.01 (1.49)	5.42 (1.25)	4.67 (1.65)	F _{3,145} =4.90	0.003	<u>PR</u> <u>AM</u> <u>PA</u> <u>AR</u>
POC (n)	22	36	53	40			
$\delta^{13}\text{C}$	-29.87 (2.55)	-30.39 (3.80)	-30.64 (1.72)	-30.67 (2.03)	F _{3,147} =0.59	0.626	-
$\delta^{15}\text{N}$	3.94 (1.83)	4.19 (1.54)	5.10 (1.32)	4.27 (1.19)	F _{3,147} =5.24	0.002	<u>PR</u> <u>PA</u> <u>AM</u> <u>AR</u>

All significant correlations between $\delta^{13}\text{C}$ or $\delta^{15}\text{N}$ and limnological parameters were relatively weak (i.e. $r < 0.45$), and were predominantly observed for phytoplankton, POC and periphyton (Table 3). $\delta^{13}\text{C}$ values for phytoplankton and POC were positively correlated with turbidity, TP and PO_4 (plus TN for phytoplankton), and negatively correlated with Secchi depth. Periphyton $\delta^{13}\text{C}$ was negatively correlated with NH_4 . In contrast, $\delta^{15}\text{N}$ values for phytoplankton and POC were positively correlated with pH and NO_3 , and negatively correlated with turbidity, TN and NH_4 (plus PO_4 for POC). Periphyton $\delta^{15}\text{N}$ was positively correlated with NO_3 and NH_4 and negatively correlated with turbidity and PO_4 . C3 aquatic macrophyte $\delta^{15}\text{N}$ was negatively correlated with turbidity. No environmental correlates of $\delta^{13}\text{C}$ or $\delta^{15}\text{N}$ were found for C₄ plants or C₃ riparian vegetation (except for a very weak positive correlation between turbidity and $\delta^{13}\text{C}$).

Table 3. Pearson's *r* correlation coefficients between stable isotope values ($\delta^{13}\text{C}$ or $\delta^{15}\text{N}$) and environmental variables for each source. Significant values are in bold with level of significance denote using asterisks (* $p<0.05$; ** $p<0.01$; *** $p<0.001$). Turb=Turbidity, Cond=Conductivity, TN=Total Nitrogen, TP=Total Phosphorous (See Appendix 2 and 3 for graphs).

Source	Secchi	Turb.	pH	Cond.	TN	NO ₃	NH ₄	TP	PO ₄
C₃ Macrophytes									
$\delta^{13}\text{C}$	0.089	-0.141	-0.030	0.011	-0.216	-0.141	-0.121	-0.210	-0.133
$\delta^{15}\text{N}$	-0.075	-0.309*	-0.140	0.045	-0.156	0.071	0.063	-0.078	0.063
C₃ Riparian Vegetation									
$\delta^{13}\text{C}$	-0.174	0.061*	0.051	0.004	0.049	-0.077	0.095	0.075	0.114
$\delta^{15}\text{N}$	-0.041	-0.041	0.125	0.034	-0.055	0.051	0.006	0.107	0.000
C₄ Plants									
$\delta^{13}\text{C}$	0.034	-0.045	0.056	-0.068	-0.239	0.257	0.008	-0.151	0.070
$\delta^{15}\text{N}$	-0.019	0.159	0.011	-0.192	0.159	-0.137	-0.138	0.256	0.103
Periphyton									
$\delta^{13}\text{C}$	-0.210	-0.067	-0.070	0.119	0.038	-0.094	-0.312*	0.101	0.107
$\delta^{15}\text{N}$	0.173	-0.273*	0.119	0.074	-0.112	0.419**	0.329*	0.030	-0.286*
Phytoplankton									
$\delta^{13}\text{C}$	-0.333***	0.320***	-0.110	0.012	0.187*	-0.034	0.002	0.281***	0.366***
$\delta^{15}\text{N}$	-0.016	-0.285***	0.259**	0.067	-0.214**	0.260**	-0.212**	-0.044	-0.142
POC									
$\delta^{13}\text{C}$	-0.235**	0.227**	0.044	0.134	0.121	-0.095	-0.064	0.182*	0.342***
$\delta^{15}\text{N}$	0.023	-0.305***	0.251**	-0.010	-0.204*	0.276***	-0.183**	-0.009	-0.193*

Regression trees for both $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ depict complex multivariate and in some cases nested relationships with local limnological conditions and basin identity (Figures 4 and 5). All of the measured limnological parameters and basin identity were included in at least two regression trees, but TP, pH, NH_4 and turbidity together accounted for almost 70% of the splits (including the primary split in seven of the 12 regression trees; Figures 4 and 5). Although PO_4 was included in only four models, three of those were primary splits (i.e. $\delta^{13}\text{C}$ of phytoplankton and POC, and periphyton $\delta^{15}\text{N}$). Similarly, basin identity was included in four models but was the primary split for only $\delta^{15}\text{N}$ of C_3 aquatic macrophytes, distinguishing samples from the Pantanal from low- and high-pH sites in the Paraná and Amazonas floodplains (subsequent splits for the Pantanal were associated with TP, pH and NH_4 ; Figure 5). Aside from C_3 macrophytes from the Pantanal, almost all other terminal nodes across all trees were comprised by samples from more than one basin (Figures 4 and 5).

Tree structures for $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ were never identical for a carbon source, and exhibited limited similarity across sources for $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$. Coarsely comparing models for $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$, model complexity was similar (i.e. similar number of splits), but the importance of a few parameters were more commonly associated with one or the other isotope. Specifically, turbidity was included four and five times in regression trees for $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$, respectively, but was never a primary or secondary split for $\delta^{13}\text{C}$ whereas four of the five inclusions for $\delta^{15}\text{N}$ were either primary or secondary splits (Figures 4 and 5). Seemingly linked to high turbidity, conductivity was a secondary split for the two $\delta^{15}\text{N}$ trees with turbidity as the primary split (i.e. phytoplankton and POC), but was never included in $\delta^{13}\text{C}$ models. pH was included twice as many times in regression trees for $\delta^{13}\text{C}$, including two primary and one secondary split (i.e. C_4 plants, periphyton and phytoplankton) versus two secondary splits for $\delta^{15}\text{N}$ (i.e. C_3 macrophytes and periphyton). Nutrient concentrations were frequently included and in similar numbers in trees for both $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$. However, N (i.e. TN, NO_3 , NH_4) was mostly a secondary split (nine secondary splits, one primary) whereas P (i.e. TP and PO_4) was commonly included as a primary and secondary split (six primary, five secondary).

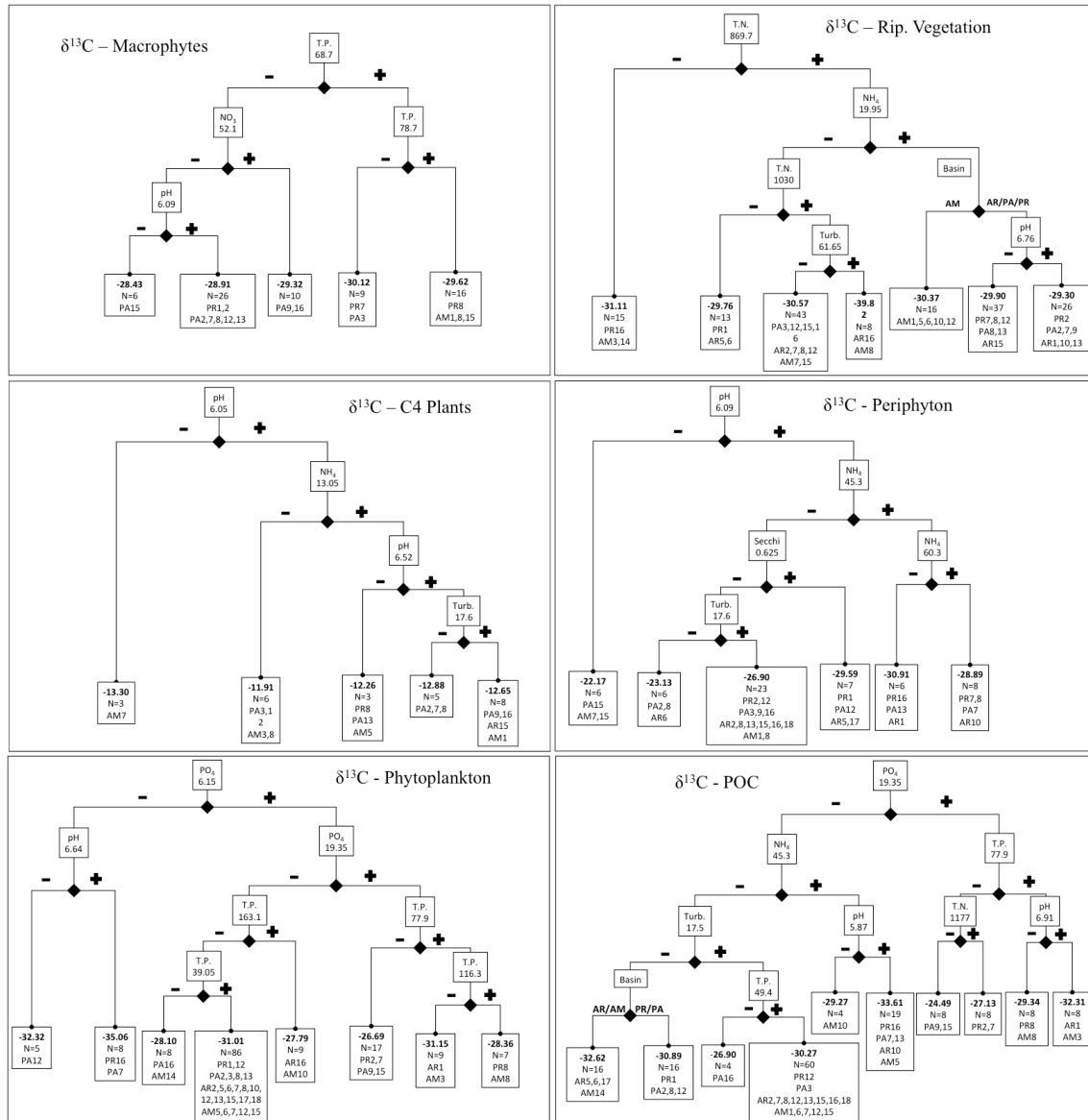


Figure 4. Regression trees predicting $\delta^{13}\text{C}$ for each carbon source. Splits are identified by boxes on branches with the corresponding parameter and value, and terminal nodes are identified by boxes including the mean value for the response variable (i.e. $\delta^{13}\text{C}$) as well as the number of samples and sampling locations included in the node. Plus and minus signs or basin abbreviations designate the level of parameter to the left or right of a split (e.g. pH less than or greater than 6.09 for the first split for periphyton).

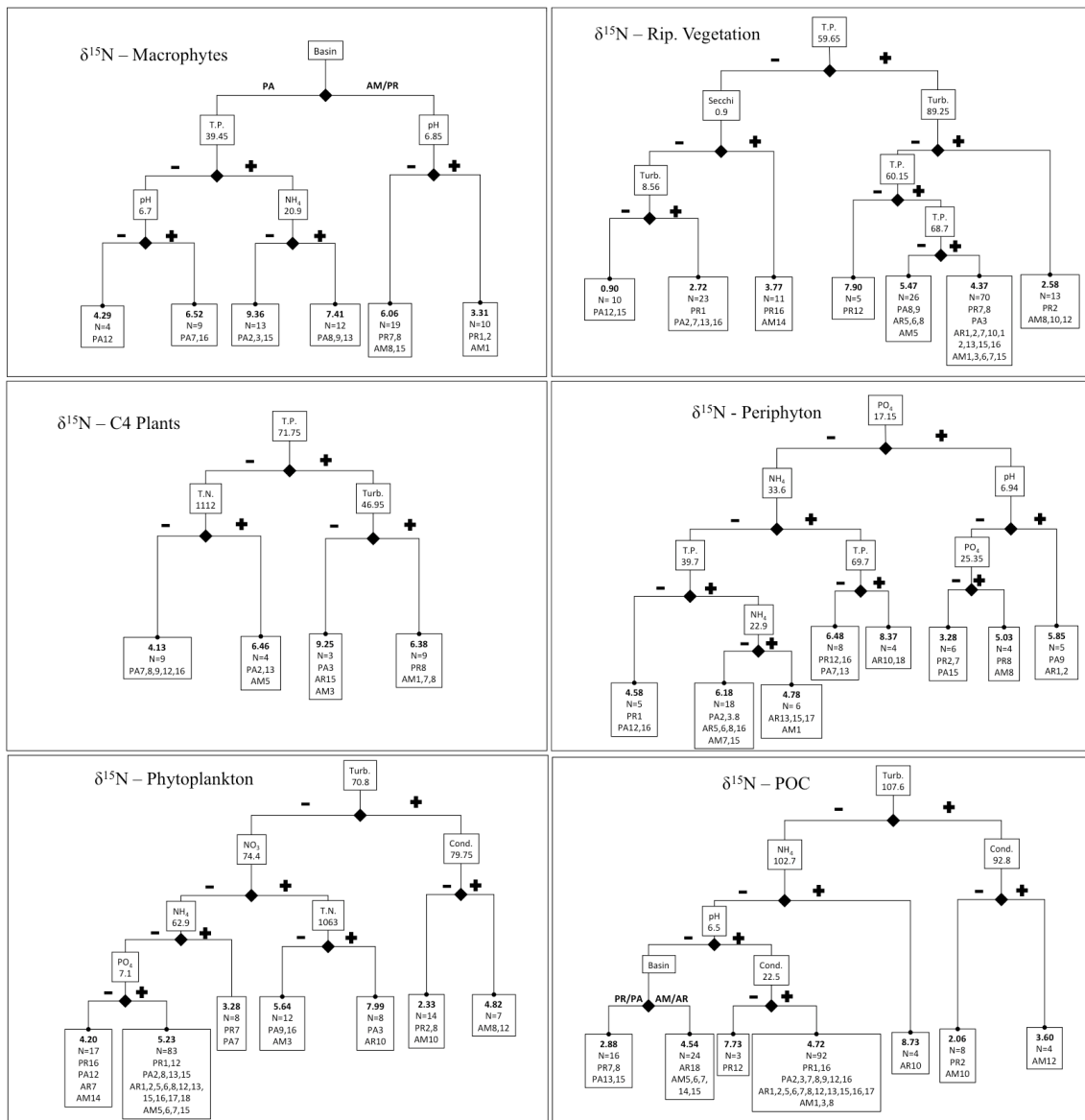


Figure 5. Regression trees predicting $\delta^{15}\text{N}$ for each carbon source. Splits are identified by boxes on branches with the corresponding parameter and value, and terminal nodes are identified by boxes including the mean value for the response variable (i.e. $\delta^{15}\text{N}$) as well as the number of samples and sampling locations included in the node. Plus and minus signs or basin abbreviations designate the level of parameter to the left or right of a split (e.g. TP less than or greater than 59.65 for the first split for riparian vegetation).

2.4 DISCUSSION

Although previous studies demonstrated biogeographic and biochemical patterns affecting carbon and nitrogen stable isotope values (e.g. Jepsen & Winemiller, 2007; Hill & McQuaid, 2008; Hobson et al., 2012), we did not detect similar patterns for our four floodplain study systems. Only very minor differences in $\delta^{15}\text{N}$ values of sources were observed among basins, and $\delta^{13}\text{C}$ did not differ among basins for any source. Although $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ values exhibited significant correlations with some limnological factors, those

relationships were generally weak and the patterns differed among carbon sources. When considering basin identity and local limnological conditions together, regression trees for both $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ for all sources depicted complex and in some cases nested relationships, and only very limited similarity was observed among trees for different carbon sources. Contrary to expectations, nutrient concentrations did not have a consistent directional effect on isotope values (e.g. positive correlation between $\delta^{15}\text{N}$ and nitrogen concentration). That being said, some factors were more consistently included in regression trees for $\delta^{13}\text{C}$ or $\delta^{15}\text{N}$ and at primary or secondary split locations (i.e. more important in determining isotope values). For example, turbidity was generally more important for $\delta^{15}\text{N}$ (two primary and two secondary splits), whereas pH was included twice as many times in regression trees for $\delta^{13}\text{C}$ (including two primary and one secondary split). Nutrient concentrations were frequently included and in similar numbers in trees for both $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$, but N (i.e. TN, NO_3 , NH_4) was mostly a secondary split (nine secondary splits, one primary) whereas P (i.e. TP and PO_4) was commonly included as a primary and secondary split (six primary, five secondary).

Our findings indicate a strong effect of local limnological conditions on $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$, regardless of basin. Basin was the primary factor affecting $\delta^{15}\text{N}$ of C_3 macrophytes (which generally have high values for $\delta^{15}\text{N}$; Wantzen et al., 2002) but nutrient concentrations and pH were important in further distinguishing the broad range of variability in $\delta^{15}\text{N}$ of macrophytes in the Pantanal. In contrast, Jepsen & Winemiller (2007), working in four tributaries of the Orinoco River basin, identified basin geochemistry as a primary factor affecting $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ values of sources and consumers (i.e. fishes). In their study, the tributaries exhibited general differences in limnological conditions due to underlying geologic formations (i.e. white, clear and black water types). Significant variability in $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ of sources was observed within each system (i.e. distribution of source values within systems exceeded differences among systems in their Figure 4), but their primary focus was on upper trophic levels and they did not investigate factors affecting isotopic variability of sources within each system. We expect that had they further explored factors affecting source variability among sampling locations, the effect of 'basin' on the isotopic baseline would have been greatly diminished. However, that leaves the question of why consumers demonstrated marked differences in isotope values among systems, and this is likely due to differences in the relative importance of various sources to the food webs (as discussed by the authors), which would compound any differences in the mean isotope values of specific sources among systems. In comparison, our study lacked the range of limnological conditions (i.e. extreme blackwater) in Jepsen & Winemiller (2007), and we would anticipate a greater influence of

basin geochemistry on source $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ had our study included a classical blackwater river.

No significant differences in $\delta^{13}\text{C}$ of carbon sources were observed at the landscape scale, i.e. comparing mean values of sources among floodplains, and mean source values were comparable with previous studies in floodplain ecosystems (e.g. Hamilton & Lewis, 1992; Benedito-Cecílio et al., 2000; Lewis et al., 2001; Hoeinghaus et al. 2007). Although largely conserved by photosynthetic pathway (e.g. C_4 vs. C_3 plants), regression trees identified complex relationships between $\delta^{13}\text{C}$ of carbon sources and local limnological conditions. Somewhat surprisingly, pH was associated with the primary split in $\delta^{13}\text{C}$ regression trees in only two cases (C_4 plants and periphyton). pH is one of the distinguishing characteristics in the classification of water types that previous studies have associated with differences in $\delta^{13}\text{C}$ (e.g. Jepsen & Winemiller, 2007), and it plays a fundamental role in the bicarbonate equilibrium (i.e. determining relative concentrations of dissolved inorganic carbon compounds) and affects $\delta^{13}\text{C}$ of DIC (Stumm & Morgan, 1981; Bade et al., 2004; Gray et al., 2011). In both of the cases where pH was the primary split, the subsequent split was associated with NH_4 , perhaps indicating an important interaction between nutrient concentrations and pH in determining $\delta^{13}\text{C}$ of the DIC (Lin & Sternberg, 1992; McKee et al., 2002). In fact, pH was included in every $\delta^{13}\text{C}$ regression tree, and was always in combination with nutrient concentrations for aquatic sources (i.e. all except riparian vegetation). Aquatic production sources such as phytoplankton and macrophytes preferentially assimilate $^{12}\text{CO}_2$ during photosynthesis, thus the rate of photosynthesis (often limited by available nutrients and light) can affect $\delta^{13}\text{C}$ of the DIC by ^{12}C depletion.

It has long been recognized that lake metabolism plays an important role in influencing the isotope signature of DIC (Oana & Deevey, 1960). For example, increasing productivity increases $\delta^{13}\text{C}$ -DIC (Wang & Veizer, 2000) and respiration is generally considered to be the reason for declining $\delta^{13}\text{C}$ -DIC (Miyajima et al., 1997). Although Bade et al. (2004) found a weak correlation between TP and $\delta^{13}\text{C}$ -DIC and a strong effect of pH on $\delta^{13}\text{C}$ -DIC for the Highland Lakes (USA), this pattern may be different in highly productive floodplain ecosystems (Lewis et al., 2001). $\delta^{13}\text{C}$ of aquatic carbon sources directly dependent on DIC in floodplain-river systems and seem to be governed by a balance between respiration and productivity due to a greater contribution of biogenic CO_2 in these productive watersheds (Tan & Edmond, 1993). Unfortunately, we were unable to process samples for determination of $\delta^{13}\text{C}$ -DIC, which would have allowed us to more directly test for relationships between

limnological conditions and $\delta^{13}\text{C}$ of DIC and primary production sources among sampling locations.

$\delta^{15}\text{N}$ of carbon sources was expected to increase with increasing nutrient concentrations, especially for N and P (e.g. Cabana & Rasmussen, 1996; Inglett et al, 2007). In contrast, our correlation analyses indicated no relationship between $\delta^{15}\text{N}$ and nutrient concentrations for some sources as well as both positive and negative correlations between $\delta^{15}\text{N}$ and different nutrient species (e.g. NH_4 vs NO_3) for the same carbon source. Although nutrient concentrations were frequently included in the regression trees, there was not a consistent pattern of higher $\delta^{15}\text{N}$ values with higher nutrient concentrations and all models included other predictor variables not associated with nutrients (e.g. pH, conductivity, basin identity). Thus, the influence of nutrient availability on $\delta^{15}\text{N}$ of carbon sources was dependent on other factors and was not consistent among sources. Pollution from anthropogenic activities, such as agriculture (e.g. Winemiller et al. 2010; Como et al., 2012) and sewage (Schubert et al., 2013; Ochoa-Izaguirre & Soto-Jiménez, 2015) have been shown to affect $\delta^{15}\text{N}$ of primary producers and consumers, but we did not directly incorporate such human activities in this study. However, it is worth mentioning that an active community was present at site AMA12 (locally known as *Castanho* Lake) in the Amazonas basin, and that nutrient concentrations were the highest among all sites (TN=5435 $\mu\text{g/L}$ and TP=157.7 $\mu\text{g/L}$) and $\delta^{15}\text{N}$ of sources at this site were usually enriched (e.g. phytoplankton $\delta^{15}\text{N}$ averages 4.46).

Important caveats to consider are that our sample size was low for C_4 plants, C_3 macrophytes were not collected from the Araguaia floodplain, and that there are other potentially important environmental factors that we did not quantify. We expect the regression tree results would differ if more samples were included from the Araguaia and Paraná basins for C_4 plants and if samples were included for C_3 macrophytes from Araguaia. However, based on the patterns observed for other carbon sources, there is little or no reason to suspect that a more direct or easily interpretable result would be observed, thus our overall findings would remain largely unchanged. Similarly, other environmental factors that may affect isotope values of carbon sources are unlikely to play key roles in our study systems. Specifically, studies from streams found gradients in $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ of carbon sources among local sites which they attributed to water velocity (Finlay et al. 2002; Costas & Pardo 2014). Our study sites were all located in floodplain lakes with little or no flow, so inclusion of water velocity is unlikely to significantly change our findings. Besides that, others studies found that high temperatures and light intensity are positively correlated with $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$

enriched aquatic carbon sources (periphyton and algae) for freshwater systems (MacLeod & Barton, 1998; Hill et al., 2008). Nevertheless, our study sites (along with the dry season) always show high temperatures (i.e. > 25 °C) and open canopy for the entrance of light, being these factors also unlikely to change our results.

Landscape-level differences in stable isotope values of production sources have been useful in studies of organism movement (Hobson et al., 1999; Rubenstein & Hobson, 2004; Brosi et al., 2009; Hobson et al., 2014). For example, differences in $\delta^{13}\text{C}$ of sources of white and black water rivers discussed above allowed Winemiller & Jepsen (2004) to estimate subsidies to blackwater food webs via consumption of migratory *Semaprochilodus kneri* by large peacock bass *Cichla temensis* (Hoeinghaus et al. 2006). For our study systems, high *within* floodplain variability and importance of local conditions in determining those differences, suggest that isotopes may be useful for examining habitat use, dispersal and patch dynamics within heterogeneous floodplain ecosystems rather than just between systems with extreme water types (i.e. a finer resolution ‘isoscape’ than has been previously utilized, Bowen, 2010; Powell et al., 2012; Radabaugh et al., 2013). Such applications may be more useful for small-bodied organisms or early life history stages of larger-bodied species (e.g. young-of-year fishes) due to faster tissue turnover rates. Movement and dispersal rates are notoriously difficult to quantify in complex and open systems such as floodplains, and the application of natural isotopic tracers would be a welcome addition to the ‘tool kit’ for such studies where artificial isotopic labeling (Veuger et al., 2007; Yu et al., 2013; Yu et al., 2014) is not feasible due to the scale and size of the water bodies. The inclusion of hydrogen stable isotopes along with carbon and nitrogen may further enhance this possibility (Finlay et al., 2010; Hondula et al., 2014), similar to the utility of sulfur stable isotopes for adding greater resolution along spatial gradients in coastal systems (Conolly et al., 2004; Fry & Chumchal, 2011).

The same heterogeneity that may enable the use of isotopes as tracers of organism movement may complicate their use in other types of investigations. One of the primary interests in understanding factors that affect isotope values of production sources is identify when and how that variability may need to be accounted for when comparing isotope values of consumers from across sampling locations or systems (Hobson et al., 2012) or when testing the aforementioned models of carbon flow in river ecosystems (e.g. Hoeinghaus et al. 2007; Medeiros & Arthington, 2011; Fellman et al., 2013). Our findings paint a complex picture of the effects of local conditions versus landscape differences on the carbon and nitrogen isotope values of production sources. At the landscape scale, $\delta^{13}\text{C}$ of carbon sources was relatively

conserved across systems, which is good news for comparing patterns of carbon flow, but $\delta^{15}\text{N}$ differed among systems as well as among sources within systems (in some cases more than the expected effect of trophic fraction), which is a significant concern when studying trophic interactions. Unfortunately, the complex interactions of multiple factors in determining isotope values of sources among sites likely precludes a simple analytical correction. Such variability in the $\delta^{15}\text{N}$ baseline is often accounted for by using relatively large-bodied primary consumers as indicators of baseline values (Post et al., 2000; Hoeninghaus et al., 2008; Jardine et al., 2014). The relatively greater heterogeneity within versus among systems in our study highlights that the spatial scale of sampling for control of baseline heterogeneity should be explicitly considered.

REFERENCES

- Agostinho, A. A., Gomes, L. C. & Pelicice, F.M. (2007) *Ecologia e manejo de recursos pesqueiros em reservatórios do Brasil*. Maringá: Eduem. 501 p.
- Alvarenga, S. M., Brasil, A. E., Pinheiro, R. & Kux, H. J. H. (1984) Estudo geomorfológico aplicado à Bacia do alto Rio Paraguai e Pantanaís Matogrossenses. *Boletim Técnico Projeto RADAM/BRASIL. Série Geomorfologia*, **187**, 89-183.
- Bade, D. L., Carpenter, S. R., Cole, J. J., Hanson, P. C. & Hesslein, R. H. (2004) Controls of $\delta^{13}\text{C}$ -DIC in lakes: Geochemistry, lake metabolism, and morphometry. *Limnology and Oceanography*, **49**, 1160-1172.
- Benedito-Cecilio, E., Araujo-lima, C. A. R. M., Forsberg, B. R., Bittencourt, M. M. & Martinelli, L. C. (2000) Carbon sources of Amazonian fisheries. *Fisheries Management and Ecology*, **7**, 305–315.
- Bergamin, H., Reis, B. F. & Zagatto, E. A. G. (1978) A new device for improving sensitivity and stabilization in flow injection analysis. *Analytica Chimica Acta*, **97**, 427-431.
- Bouillon, S., Connolly, R. M. & Lee, S. Y. (2008) Organic matter exchange and cycling in mangrove ecosystems: Recent insights from stable isotope studies. *Journal of Sea Research*, **59**, 44-58.
- Bowen, G. J. (2010) Isoscapes: Spatial Pattern in Isotopic Biogeochemistry. *Annual Review of Earth and Planetary Sciences*, **38**, 161-187.
- Brosi, B. J., Daily, G. C., Chamberlain, C. P. & Mills, M. (2009) Detecting changes in habitat-scale bee foraging in a tropical fragmented landscape using stable isotopes. *Forest Ecology and Management*, **258**, 1846-1855.
- Bullen, T. D. & Kendall, C. (1998) Tracing of weathering reactions and water flowpaths: a multi-isotope approach. In: *Isotope Tracers in Catchment Hydrology* (Eds C. Kendall & J. J. McDonnell), pp 611-646, Elsevier, Amsterdam.
- Bunn, S. E., Davies, P. M. & Winning, M. (2003) Sources of organic carbon supporting the food web of an arid zone floodplain river. *Freshwater Biology*, **48**, 619-635.

- Cabana, G., & Rasmussen, J. B. (1996) Comparison of aquatic food chains using nitrogen isotopes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **93**, 10844-10847
- Casey, M. M. & Post, D.M. (2011) The problem of isotopic baseline: Reconstructing the diet and trophic position of fossil animals. *Earth-Science Reviews*, **106**, 131-148.
- Chen, Z. X., Yu, L., Liu, W. G., Lam, M. H. W., Liu, G. J. & Yin, X. B. (2014) Nitrogen and oxygen isotopic composition of water-soluble nitrate in Taihu Lake water system, China: implication for nitrate sources and biogeochemical process. *Environmental Earth Sciences*, **71**, 217-223
- Como, S., Magni, P., Van Der Velde, G., Blok, F. S. & Van De Steeg, M. F. M. (2012) Spatial variations in $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ values of primary consumers in a coastal lagoon. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, **115**, 300-308.
- Connolly, R. M., Guest, M. A., Melville, A. J. & Oakes, J. M. (2004) Sulfur stable isotopes separate producers in marine food-web analysis. *Oecologia*, **138**, 161-167.
- Costas, N. & Pardo, I. (2014) Isotopic variability in a stream longitudinal gradient: implications for trophic ecology. *Aquatic Sciences*, **77**, 231–260
- De'ath, G. & Fabricius, K. E. (2000.) Classification and regression trees: a powerful yet simple technique for the analysis of complex ecological data. *Ecology*, **81**, 3178-3192
- DeBruyn, A. M H. & Rasmussen, J. B. (2002) Quantifying assimilation of sewage-derived organic matter by riverine benthos. *Ecological Applications*, **12**, 511-520
- Doi, A.H., Takemon Y., Ohta, T., Ishida, Y. & Kikuchi, E. (2007) Effects of reach - scale canopy cover on trophic pathways of caddisfly larvae in a Japanese mountain stream. *Marine and Freshwater Research*, **58**, 811-817.
- Fellerhoff, C., Voss, M. & Wantzen, K. M. (2003) Stable carbon and nitrogen isotope signatures of decomposing tropical macrophytes. *Aquatic Ecology*, **37**, 361-375.
- Fellman, J. B., Pettit, N. E., Kalic, J. & Grierson, P. F. (2013) Influence of stream-floodplain biogeochemical linkages on aquatic foodweb structure along a gradient of stream size in a tropical catchment. *Freshwater Science*, **32**, 217-229.
- Finlay, J. C., Doucett, R. R. & Mcneely, C. (2010) Tracing energy flow in stream food webs using stable isotopes of hydrogen. *Freshwater Biology*, **55**, 941-951.
- Finlay, J. C. & Kendall, C. (2007) Stable isotope tracing of temporal and spatial variability in organic matter sources to freshwater ecosystems. In: *Stable isotopes in ecology and environmental science* (Eds R. Michener & K. Lajtha), pp 283-333. Blackwell Publishing, 2nd edition, London.
- Finlay, J. C., Khandwala, S. & Power, M. E. (2002) Spatial scales of carbon flow in a river food web. *Ecology*, **83**, 1845- 1859.
- Finlay, J. (2003) Controls of streamwater dissolved inorganic carbon dynamics in a forested watershed. *Biogeochemistry*, **62**, 231-252.
- Fry, B. & Chumchal, M. M. (2011) Sulfur stable isotope indicators of residency in estuarine fish. *Limnology and Oceanography*, **56**, 1563-1576.
- Furch, K. & Junk, W. J. (1997) *Physicochemical conditions in the floodplains*. In: *The central Amazon floodplain: ecology of a pulsing system* (Ed Junk, W. J.), pp 69-108. Ecological Studies, v. 126. Springer, Berlin.

- Giné, M. F., Bergamin, F. H., Zagatto, E. A. G. & Reis, B. F. (1980) Simultaneous determination of nitrate and nitrite by flow injection analysis. *Analytica Chimica Acta*, **114**, 191-197.
- Golterman, H. L., Clymo, R. S. & Ohmstad, M. A. M. (1978) *Methods for physical and chemical analysis of fresh water*. Oxford: Blackwell Scientific. 214p.
- Gomes, L. C. & Miranda, L. E. (2001) Riverine characteristics dictate composition of fish assemblages and limit fisheries in reservoirs of the upper Paraná River basin. *Regulated Rivers*, **17**, 67-76.
- Gray, D. P., Harding, J. S., Elberling, B., Horton, T., Clough, T. J. & Winterbourn, M. J. (2011) Carbon Cycling in Floodplain Ecosystems: Out-Gassing and Photosynthesis Transmit Soil $\delta^{13}\text{C}$ Gradient Through Stream Food Webs. *Ecosystems*, **14**, 583-597.
- Hadwen, W. L., Spears, M. & Kennard, M. J. (2010) Temporal variability of benthic algal $\delta^{13}\text{C}$ signatures influences assessments of carbon flows in stream food webs. *Hydrobiologia*, **651**, 239-251.
- Hamilton, S. K. & Lewis, W. M. (1992) Stable carbon and nitrogen isotopes in algae and detritus from the orinoco river floodplain, venezuela. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, **56**, 4237-4246.
- Hamilton, S. K. (2002). Hydrological controls of ecological structure and function in the Pantanal wetland (Brazil). In: *The Ecohydrology of Southamerican Rivers and Wetlands* (Ed McClain, M.), pp. 133-158. International Association of Hydrological Science, vol 6, Special publications.
- Hill, J. M. & McQuaid, C. D. (2008) $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ biogeographic trends in rocky intertidal communities along the coast of South Africa: Evidence of strong environmental signatures. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, **80**, 261-268.
- Hill, W. R., Fanta, S. E. & Roberts, B. J. (2008) ^{13}C dynamics in benthic algae: Effects of light, phosphorus, and biomass development. *Limnology and Oceanography*, **53**, 1217-1226.
- Hobson, K. A., Ofukany, A., Soto, D. X. & Wassenaar, L. I. (2012) An isotopic baseline ($\delta^{13}\text{C}$, $\delta^{15}\text{N}$) for fishes of Lake Winnipeg: Implications for investigating impacts of eutrophication and invasive species. *Journal of Great Lakes Research*, **38**, 58-65.
- Hobson, K. A., Van Wilgenburg, S. L., Faaborg, J., Toms, J. D., Rengifo, C., Sosa, A. L., et al. (2014) Connecting breeding and wintering grounds of Neotropical migrant songbirds using stable hydrogen isotopes: a call for an isotopic atlas of migratory connectivity. *Journal of Field Ornithology*, **85**, 237-257.
- Hobson, K. A., Wassenaar, L. I. & Taylor, O. R. (1999) Stable isotopes (δD and $\delta^{13}\text{C}$) are geographic indicators of natal origins of monarch butterflies in eastern North America. *Oecologia*, **120**, 397-404.
- Hoeinghaus, D. J., Winemiller, K. O. & Agostinho, A. A. (2008) Hydrogeomorphology and river impoundment affect food-chain length of diverse Neotropical food webs. *Oikos*, **117**, 984-995.
- Hoeinghaus, D. J., Winemiller, K. O. & Agostinho, A. A. (2007) Landscape-scale hydrologic characteristics differentiate patterns of carbon flow in large-river food webs. *Ecosystems*, **10**, 1019-1033.

- Hoeinghaus, D. J., Winemiller, K. O., Layman, C. A., Arrington, D. A. & Jepsen, D. B. (2006) Effects of seasonality and migratory prey on body condition of *Cichla* species in a tropical floodplain river. *Ecology of Freshwater Fish* **15**, 398-407
- Hondula, K. L., Pace, M. L., Cole, J. J. & Batt, R. D. (2014) Hydrogen isotope discrimination in aquatic primary producers: Implications for aquatic food web studies. *Aquatic Sciences*, **76**, 217-229.
- Humphries, P., Keckeis, H. & Finlayson, B. (2014) The River Wave Concept: Integrating River Ecosystem Models. *BioScience*, doi:10.1093/biosci/biu130.
- Inglett, P. W., Reddy, K. R., Newman, S. & Lorenzen, B. (2007) Increased soil stable nitrogen isotopic ratio following phosphorus enrichment: Historical patterns and tests of two hypotheses in a phosphorus-limited wetland. *Oecologia*, **153**, 99-109.
- Jardine, T. D., Hadwen, W. L., Hamilton, S. K., Hladysz, S., Mitrovic, S. M., Kidd, K. A., et al. (2014) Understanding and overcoming baseline isotopic variability in running waters. *River research and applications*, **165**, 155-165.
- Jepsen, D. B. & Winemiller, K. O. (2007) Basin geochemistry and isotopic ratios of fishes and basal production sources in four neotropical rivers. *Ecology of Freshwater Fish*, **16**, 267-281.
- Joel, M., David S. S., Mark, F. A., Frank, D. W. & Ralph, D. C. (1994) Regression Tree Analysis of satellite and terrain data to guide vegetation sampling and surveys. *Journal of Vegetation Science*, **5**, 673-686.
- Junk, W. J., Bayley, P. B. & Sparks, R. E. (1989) The flood pulse concept in river-floodplain systems. In: *Proceedings of the International Large River Symposium*. (Ed. D.P. Dodge). Canadian Special Publications Fisheries and 7 Aquatic Sciences, **106**, 110-127.
- Junk, W. J., Cunha, C. N., Wantzen, K. M., Petermann, P., Strüssmann, C., Marques, M. I., et al. (2006). Biodiversity and its conservation in the Pantanal of Mato Grosso, Brazil. *Aquatic Sciences*, **68**, 278-309.
- Klinge, H., Junk, W. J. & Revilla, C. J. (1990) Status and distribution of forested wetlands in tropical South America. *Forest Ecology and Management*, **33/34**, 81-101.
- Kumar, B. S. K., Sarma, V. V. S. S. & Krishna, M. S. (2014) Distribution of biochemical constituents in the surface sediments of western coastal Bay of Bengal: influence of river discharge and water column properties. *Environmental Earth Sciences*, **69**, 1033-1043
- Lake, J. L., McKinney, R. A., Osterman, F. A., Pruell, R. J., Kiddon, J., Ryba, S. A., et al. (2001) Stable nitrogen isotopes as indicators of anthropogenic activities in small freshwater systems. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, **58**, 870-878.
- Latrubesse, E. M. & Stevaux, J. C. (2002) Geomorphology and Environmental Aspects of Araguaia Fluvial Basin, Brazil. *Zeitschrift für Geomorphologie*, **129**, 109 - 127.
- Lewis, W. M., Hamilton, S. K., Rodriguez, M. A., Saunders, J. F. & Lasi, M. A. (2001) Foodweb analysis of the Orinoco floodplain based on production estimates and stable isotope data. *Journal of the North American Benthological Society*, **20**, 241-254.
- Lin, G. & Sternberg, L. D. S. L. (1992) Effect of growth form, salinity, nutrient and sulfide on photosynthesis, carbon isotope discrimination and growth of red mangrove (*Rhizophora mangle* L.). *Australian Journal of Plant Physiology*, **19**, 509-517.

- MacLeod, N. A. & Barton, D. R. (1998) Effects of light intensity, water velocity, and species composition on carbon and nitrogen stable isotope ratios in periphyton. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, **55**, 1919–1925.
- MacKereth, F. Y. H., Heron, J. & Talling, J. J. (1978) Water analysis: some revised methods for Limnologists. *Freshwater Biological Association*, **36**, 1-120.
- McKee, K. L., Feller, I. C., Popp, M. & Wanek, W. (2002) Mangrove isotopic ($\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$) fractionation across a nitrogen vs. phosphorus limitation gradient. *Ecology*, **83**, 1065-1075.
- Medeiros, E. S. F. & Arthington, A. H. (2011) Allochthonous and autochthonous carbon sources for fish in floodplain lagoons of an Australian dryland river. *Environmental Biology of Fishes*, **90**, 1-17.
- Miyajima, T., Yamada, Y., Wada, E., Nakajima, T., Koitabashi, T., Hanba, Y. T., et al. (1997) Distribution of greenhouse gases, nitrite, and ^{13}C of dissolved inorganic carbon in Lake Biwa: Implications for hypolimnetic metabolism. *Biogeochemistry*, **36**, 205-221.
- Myers, N., Mittermeier, R. A., Mittermeier, C. G., Fonseca, G. A. B. & Kent, J. (2000) Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature*, **403**, 853-858
- Oana, S. & Deevey, E. S. (1960) Carbon 13 in lake waters and its possible bearing on paleolimnology. *American Journal of Science*, **258**, 253-272.
- Ochoa-Izaguirre, M. J. & Soto-Jimenez, M. F. (2015) Variability in Nitrogen Stable Isotope Ratios of Macroalgae: Consequences for the Identification of Nitrogen Sources. *Journal of Phycology*, **51**, 46-65.
- Oksanen, J. F., Blanchet, B., Kindt, R., Legendre, P., Minchin, P. R., O'Hara, et al. (2015). vegan: Community Ecology Package. R package version 2.3-0. <http://CRAN.R-project.org/package=vegan>.
- Peres-Neto, P. R., Jackson, D. A. & Somers, K. M. (2005) How many principal components? Stopping rules for determining the number of non-trivial axes revisited. *Computational Statistics and Data Analysis*, **49**, 974-997
- Pingram, M. A., Collier, K. J., Hamilton, D. P., David, B. O. & Hicks, B. J. (2012) Carbon Sources Supporting Large River Food Webs: A Review of Ecological Theories and Evidence from Stable Isotopes. *Freshwater Reviews*, **5**, 85-103.
- Post, D. M., Pace, M. L. & Hairston, N. G. (2000) Ecosystem size determines food-chain length in lakes. *Nature*, **405**, 1047-1049.
- Powell, R. L., Yoo, E. H. & Still, C. J. (2012) Vegetation and soil carbon-13 isoscapes for South America: integrating remote sensing and ecosystem isotope measurements. *Ecosphere*, **3**, 1-25.
- R Core Team (2014). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <http://www.R-project.org/>.
- Radabaugh, K., Hollander, D. & Peebles, E. (2013) Seasonal $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ isoscapes of fish populations along a continental shelf trophic gradient. *Continental Shelf Research*, **68**, 112-122.
- Rožič, R. P., Dolenc, T., Lojen, S., Kniewald, G. & Dolenc, M. (2014) Use of stable isotope composition variability of particulate organic matter to assess the anthropogenic organic matter in coastal environment (Istra Peninsula, Northern Adriatic). *Environmental Earth Sciences*, **73**, 3109-3118.

- Roach K. A. (2013) Environmental factors affecting incorporation of terrestrial material into large river food webs. *Freshwater Science*, **32**, 283-298.
- Rubenstein, D. R. & Hobson, K. A. (2004) From birds to butterflies: Animal movement patterns and stable isotopes. *Trends in Ecology and Evolution*, **19**, 256-263.
- Sarà, G., Scilipoti, D., Mazzola, A. & Modica, A. (2004) Effects of fish farming waste to sedimentary and particulate organic matter in a southern Mediterranean area (Gulf of Castellammare, Sicily): a multiple stable isotope study $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$. *Aquaculture*, **234**, 199-213
- Schubert, P. R., Karez, R., Reusch, T. B. H. & Dierking, J. (2013) Isotopic signatures of eelgrass (*Zostera marina* L.) as bioindicator of anthropogenic nutrient input in the western Baltic Sea. *Marine Pollution Bulletin*, **72**, 64-70.
- Sigleo, A. C. & Macko, S. A. (2002) Carbon and nitrogen isotopes in suspended particles and colloids, Chesapeake and San Francisco Estuaries. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, **54**, 701-711.
- Sioli, H. (1984). The Amazon and its main affluents: hydrography, morphology of the rivers courses, and river types. In: *The Amazon: limnology and landscape ecology of a mighty tropical river and its basin*. (Ed Sioli, H.), pp. 127-165. Dr. Junk Publishers, Dordrecht..
- Sioli, H. (1975) Tropical rivers as an expression of their terrestrial environment. In: *Tropical Ecological Systems*. (Ed Golly, F. B.), pp. 275-288. Berlin: Springer-Verlag, Stallard.
- Souza Filho, E. E. (2009). Evaluation of the Upper Paraná River discharge controlled by reservoirs. *Brazilian Journal of Biology*, **69**, 707-716.
- Striegl, R. G., Kortelainen, P., Chanton, J. P. & Wickland, K. P. (2001) Carbon dioxide partial pressure and ^{13}C content of north temperate and boreal lakes at spring ice melt. *Limnology and Oceanography*, **46**, 941-945.
- Stumm, W. & Morgan, J. J. (1981) *Aquatic chemistry: an introduction emphasizing chemical equilibria in natural waters*. New York: Wiley Inter-science. p 780.
- Tan, F. C. & Edmond, J. M. (1993) Carbon isotope geochemistry of the Orinoco Basin. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, **36**, 541-547.
- Therneau, T; Atkinson, B & Ripley, B. (2015) rpart: Recursive Partitioning and Regression Trees. R package version 4.1-10. <http://CRAN.R-project.org/package=rpart>
- Thorp, J. H., & DeLong, M. D. (1994) The riverine productivity model: an heuristic view of carbon sources and organic processing in large river ecosystems. *Oikos*, **70**, 305-308.
- Vannote, R. L., Minshall, G., Cummins, K. W., Sedell, J. R. & Cushing, C. E. (1980) The river continuum concept. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, **37**, 130-137.
- Veuger, B., Eyre, B. D., Maher, D. & Middelburg, J. J. (2007) Nitrogen incorporation and retention by bacteria, algae, and fauna in a subtropical intertidal sediment: An situ ^{15}N -labeling study. *Limnology and Oceanography*, **52**, 1930-1942.
- Viana, I. G. & Bode, A. (2015) Variability in $\delta^{15}\text{N}$ of intertidal brown algae along a salinity gradient: Differential impact of nitrogen sources. *Science of the Total Environment*, **513**, 167-176.
- Wang, X. & Veizer, J. (2000) Respiration-photosynthesis balance of terrestrial aquatic ecosystems, Ottawa area, Canada. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, **64**, 3775-3786.

- Wantzen, K. M., Machado, F. A., Voss, M., Boriss, H. & Junk, W. J. (2002) Seasonal isotopic shifts in fish of the Pantanal wetland, Brazil. *Aquatic Sciences*, **64**, 239-251.
- Winemiller, K. O., Hoeninghaus, D. J., Pease, A. A., Esselman, P. C., Honeycutt, R. L., Gbanaador, D., et al. (2010) Stable isotope analysis reveals food web structure and watershed impacts along the fluvial gradient of a mesoamerican coastal river. *River Research and Applications*, **27**, 791-803.
- Winemiller, K. O., Zeug, S. C., Robertson, C. R., Winemiller, B. K. & Honeycutt, R. L. (2011) Food-web structure of coastal streams in Costa Rica revealed by dietary and stable isotope analyses. *Journal of Tropical Ecology*, **27**, 463- 476.
- Winemiller, K. O. & Jepsen, D. B. (2004) Migratory Neotropical fish subsidize food webs of oligotrophic blackwater rivers. In: *Food webs at the landscape level* (Eds Polis, G. A., Power, M. E. & Huxel, G. R.), pp. 115-132. University of Chicago Press, Chicago, Illinois.
- Yu, J., He, H., Liu, Z., Li, K., Hu, Y., Zhong, P., et al. (2014) Cyanobacteria-derived nitrogen uptake by benthic invertebrates in Lake Taihu: a mesocosm study using ¹⁵N labeling. *Knowledge and Management of Aquatic Ecosystems*, **415**, doi: 10.1051/kmae/2014033.
- Yu, J., Li, Y., Liu, X., Li, K., Chen, F., Gulati, R. et al. (2013). The fate of cyanobacterial detritus in the food web of Lake Taihu: a mesocosm study using ¹³C and ¹⁵N labeling. *Hydrobiologia*, **710**, 39-46.

Appendix A - Mean and standard deviations of the carbono sources from the four floodplains.

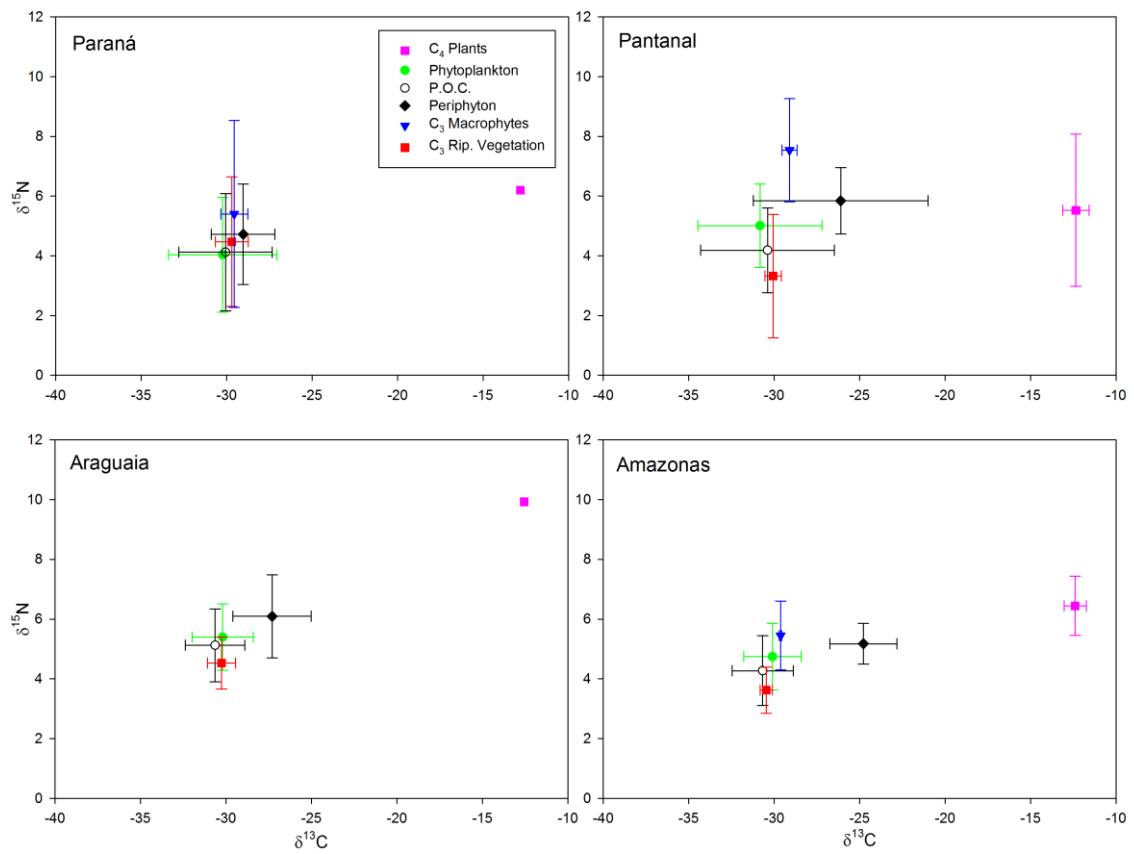


Figure 1. Mean and standard deviations of the carbono sources from the four floodplains. Signs and legend are indicated on the graph.

Appendix B – Graphs representing Pearson's r correlations between $\delta^{13}\text{C}/\delta^{15}\text{N}$ and environmental variables.

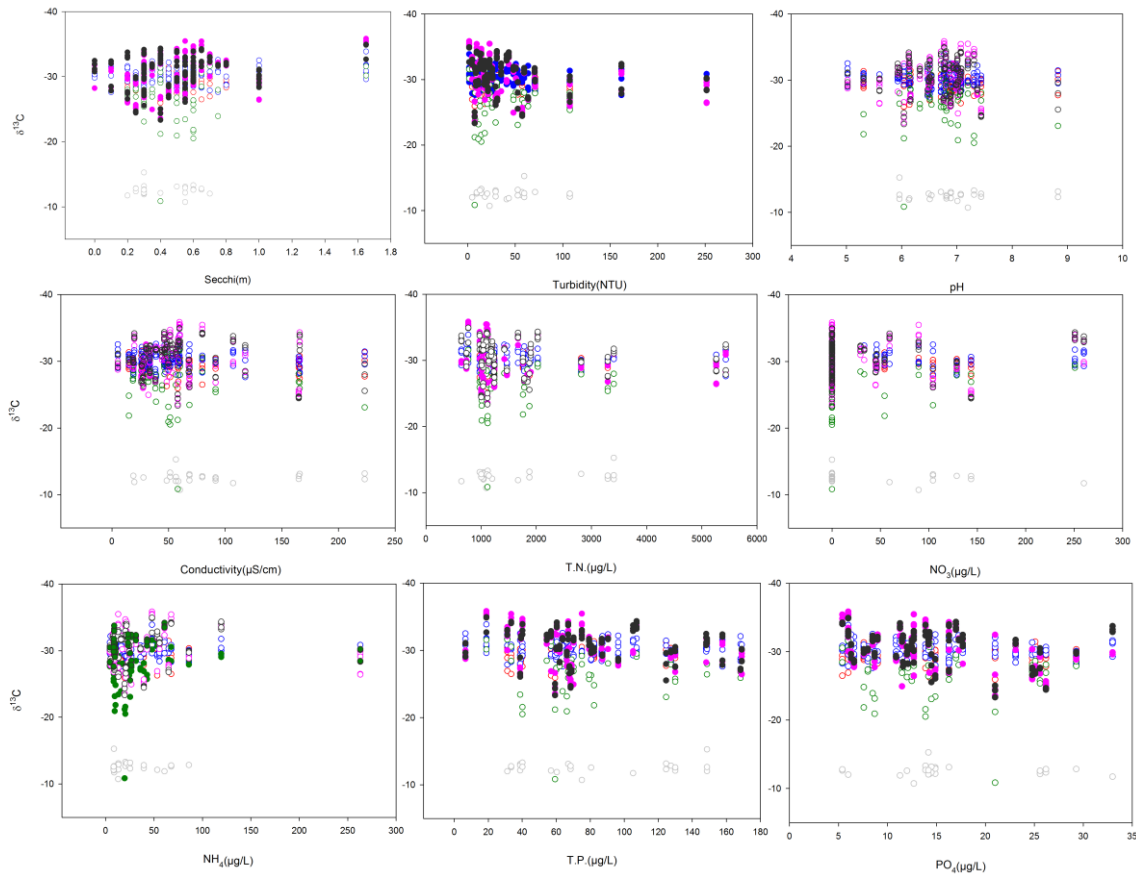


Figure 2. Pearson's r correlation between carbon stable isotope values ($\delta^{13}\text{C}$) and environmental variables, for each source represented graphically. Filled circles represent significant correlations. Red circles = C_3 Macrophytes; blue circles = C_3 Riparian vegetation; gray circles = C_4 Plants; green circles = Periphyton; pink circles = Phytoplankton; black circles = POC.

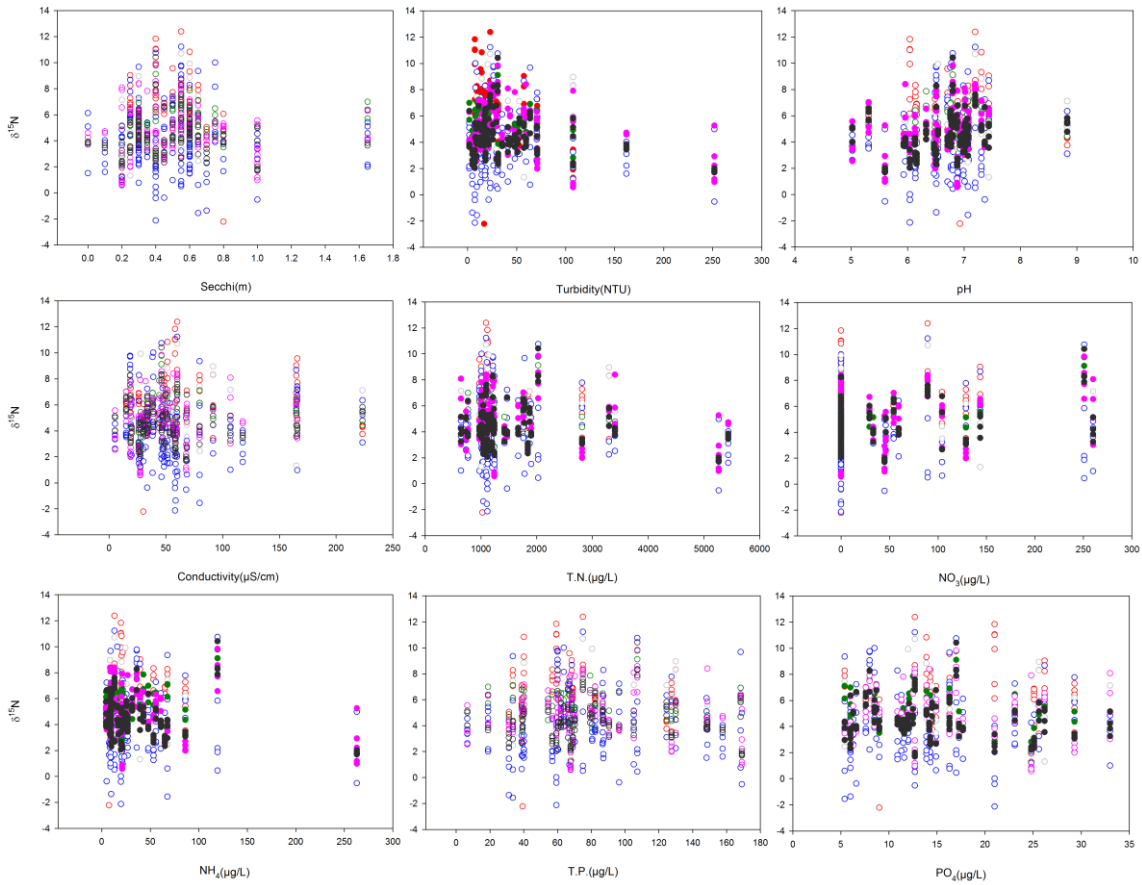


Figure 3. Pearson's r correlation between nitrogen stable isotope values ($\delta^{15}\text{N}$) and environmental variables, for each source represented graphically. Filled circles represent significant correlations. Red circles = C₃ Macrophytes; blue circles = C₃ Riparian vegetation; gray circles = C₄ Plants; green circles = Periphyton; pink circles = Phytoplankton; black circles = POC.

3 A SEGREGAÇÃO DE NICHOS ISOTÓPICOS EXPLICA A COEXISTÊNCIA DE DUAS ESPÉCIES DE PIRANHAS

RESUMO

A invasão de espécies não nativas, filogeneticamente próximas das nativas, foi observada no alto rio Paraná, após a construção da usina hidroelétrica de Itaipu e consequente supressão de uma barreira natural (Salto Sete Quedas). Espécies endêmicas do baixo rio Paraná colonizaram e se dispersaram no novo ambiente com sucesso, incluindo a espécie de piranha *Serrasalmus marginatus*. Neste contexto, partindo-se do pressuposto de que as duas espécies de piranha coexistem naturalmente no Pantanal, e que *S. marginatus* é uma espécie não nativa estabelecida na planície de inundação do alto rio Paraná, hipotetiza-se que apenas neste ambiente ocorre sobreposição de nicho trófico entre as espécies de *Serrasalmus*, devido à coexistência em curto prazo (i.e. escala não evolutiva). Este estudo foi conduzido em uma lagoa situada no Pantanal (i.e. habitat de co-ocorrência das espécies nativas) e uma lagoa situada na planície de inundação do alto rio Paraná (i.e. habitat de co-ocorrência da nativa *S. maculatus* com a não-nativa *S. marginatus*). Para identificar a estrutura do nicho isotópico das populações em cada ambiente, foram estabelecidas a amplitude do carbono e do nitrogênio isotópico, assim como a área de nicho isotópico ocupada por cada espécie. Estas medidas foram utilizadas para estimar a amplitude e sobreposição de nicho isotópico (utilizado como um substituto do nicho trófico) de cada espécie. De acordo com o modelo de mistura a fonte de carbono predominante para ambas as espécies nos dois ambientes foi de origem terrestre. Entretanto, no Paraná as espécies diferiram significativamente com relação ao $\delta^{13}\text{C}$ e a não nativa apresentou maiores áreas de nicho que a nativa. No Pantanal, não foram identificadas diferenças significativas nos valores de $\delta^{13}\text{C}$, mas as espécies diferiram com relação ao $\delta^{15}\text{N}$ e as áreas dos nichos isotópicos foram menores para ambas as espécies. Considerando os resultados expostos e a sobreposição de nicho isotópico nula, pode-se inferir que as espécies dependem de fontes alimentares diferentes. As piranhas obtêm energia de presas distintas, as quais provavelmente consomem recursos de cadeias alimentares diversas. Assim, o estabelecimento de *S. marginatus* é provavelmente direcionado pelo acesso aos recursos não utilizados pela espécie nativa e por outras dimensões do nicho não analisadas nesse estudo (e.g. aspectos reprodutivos, competição entre juvenis, etc.), além de outras interações bióticas.

Palavras-chave: Carbono, nitrogênio, nicho trófico, espécie não-nativa, *Serrasalmus marginatus*, *Serrasalmus maculatus*.

3.1 INTRODUÇÃO

Existe um longo debate em Ecologia que busca compreender os processos que determinam a coexistência entre espécies (Juncos et al., 2014), com destaque aos casos em que as mesmas pertencem à mesma guilda (Keppeler et al., 2015). Estes eventos precisam ser amplamente estudados, especialmente em casos de introdução de espécies, que forcem a simpatria entre espécies que não coevoluíram, podendo resultar tanto em coexistência quanto em exclusão (Bohn et al., 2008).

Espécies introduzidas são umas das principais ameaças às espécies nativas, e têm sido o centro de discussões quando se leva em consideração a perda da biodiversidade (e.g. Dudgeon et al., 2006; Pelicice et al., 2014; Daga et al., 2015). Algumas atividades antrópicas têm contribuído para aumentar a introdução de espécies não nativas em ecossistemas aquáticos continentais, dentre as quais destaca-se a construção de usinas hidrelétricas. Além dos conhecidos impactos destes empreendimentos sobre o ecossistema, estes podem atuar como facilitadores da dispersão de espécies (Júlio Júnior et al., 2009; Vitule et al., 2012).

A construção da Usina Hidrelétrica de Itaipu em 1982 levou à supressão de uma barreira geográfica natural (i.e. um conjunto de cachoeiras conhecido como Salto Sete Quedas) existente entre duas ecorregiões do rio Paraná (Abell et al., 2008). Este evento fez com que muitas espécies do baixo rio Paraná conseguissem colonizar o alto rio Paraná, entre elas a piranha *Serrasalmus marginatus* Valenciennes, 1837 (veja Figura 1; Júlio Junior et al., 2009), uma espécie também nativa do Pantanal (Sazima & Machado, 1990; Bistoni & Haro, 1995). Poucos anos após a construção de Itaipu, constatou-se a dominância da mesma e declínio da sua congênica nativa, *Serrasalmus maculatus* Kner, 1858 (Agostinho et al., 1994; Agostinho & Júlio-Jr, 2002; Agostinho et al., 2003).

Estudos relacionados à alimentação de ambas as espécies foram realizados a fim de determinar se o sucesso da espécie não nativa relacionava-se ao seu comportamento alimentar. Agostinho et al. (2003) concluíram, através da análise de conteúdos estomacais, que as espécies apresentam o mesmo hábito alimentar e alta sobreposição de nicho trófico, atribuída ao consumo de fragmentos de peixes. A análise do conteúdo estomacal tem sido uma ferramenta eficiente para inferir sobre os hábitos e as estratégias alimentares das espécies de peixes. Contudo, para piranhas esta pode não ser a análise mais adequada, já que os fragmentos podem ter sido obtidos de diferentes espécies de peixes e em distintas posições tróficas (Almeida et al., 1998; Agostinho et al., 2003).

Em contrapartida, a análise de isótopos estáveis (AIE) tem sido útil para o entendimento do papel funcional dos organismos nas cadeias alimentares (Correa & Winemiller, 2014; Polačik et al., 2014), tornando-se uma ferramenta importante para elucidar diferenças tróficas entre espécies filogeneticamente próximas (Faye et al., 2011; Le Loc'h et al., 2015). Como exemplo, os isótopos estáveis de carbono ($\delta^{13}\text{C}$) e de nitrogênio ($\delta^{15}\text{N}$) são utilizados para distinguir a fonte de energia obtida e a posição trófica ocupada pelo organismo, respectivamente (Peterson & Fry, 1987; Vander Zanden & Rasmussen, 1999). Deste modo, valores de $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$ podem ser usados para a definição de nichos tróficos (Layman et al., 2007), constituindo-se em importantes preditores dos impactos das espécies não nativas (e.g. Olsson et al., 2009; Monroy et al., 2014; Córdova-Tapia et al., 2015; Hill et al., 2015).

Neste contexto, partindo-se do pressuposto de que as duas espécies de piranha coexistem naturalmente no Pantanal, e que *S. marginatus* é uma espécie não nativa estabelecida na planície de inundação do alto rio Paraná (Júlio Júnior et al., 2009; Tófoli, 2015), hipotetiza-se que apenas neste ambiente ocorre sobreposição de nicho trófico entre as espécies de *Serrasalmus*, devido à coexistência em curto prazo (escala não evolutiva). De acordo com esta hipótese, pode-se prever que no alto rio Paraná: (i) as espécies utilizam a mesma fonte de carbono e (ii) que os valores isotópicos de carbono e nitrogênio não diferem entre as espécies, havendo sobreposição de nicho trófico (nicho isotópico). Deste modo, busca-se entender se a coexistência modulada evolutivamente (Pantanal) e a coexistência em curta escala temporal (alto rio Paraná), interferem nas interações tróficas entre ambas as espécies.

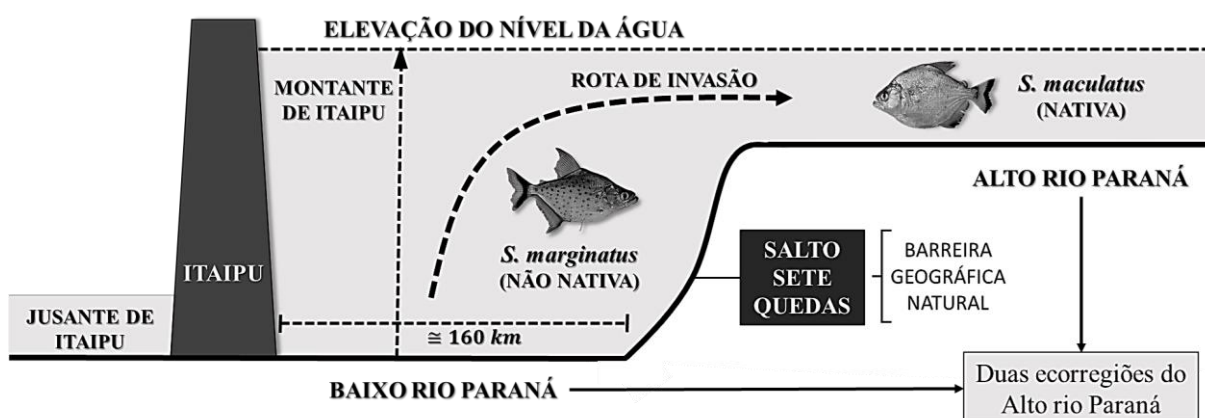


Figura 1. Modelos ilustrativo exemplificando a facilitação da invasão de *Serrasalmus marginatus* do baixo rio Paraná para o alto rio Paraná após a construção da barragem de Itaipu em 1982, e supressão de uma barreira geográfica (Salto Sete Quedas). As imagens dos peixes foram modificadas do *FishBase* (<http://www.fishbase.org/search.php>). ($\cong 160$ km) = distância entre a barragem de Itaipu e o

local onde estava inserido o Salto Sete Quedas (Dados obtidos do *Google Earth Pro*). As proporções dos elementos da figura são meramente ilustrativas.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1 Área de estudo

Os locais de estudo para a avaliação de partição do nicho isotópico entre *Serrasalmus maculatus* e *Serrasalmus marginatus* foram constituídos de duas lagoas. No Pantanal, foram realizadas amostragens em um total de nove lagoas, porém apenas em uma foram capturados indivíduos de ambas as espécies. Já no alto rio Paraná, seis lagoas foram amostradas, sendo que em três delas foram capturadas ambas as espécies. Para estas, foram realizadas análises preliminares nas quais foram encontrados resultados convergentes. Deste modo, com a finalidade de padronizar o número de ambientes analisados em cada planície de inundação, apenas a lagoa com o maior número de indivíduos capturados foi selecionada para interpretação. A lagoa situada no Pantanal é um habitat de co-ocorrência das espécies nativas (habitat CON). Já a lagoa localizada na planície de inundação do alto rio Paraná constitui um habitat de co-ocorrência da nativa *S. maculatus* com a não-nativa *S. marginatus* (habitat CNN) (Figura 2).

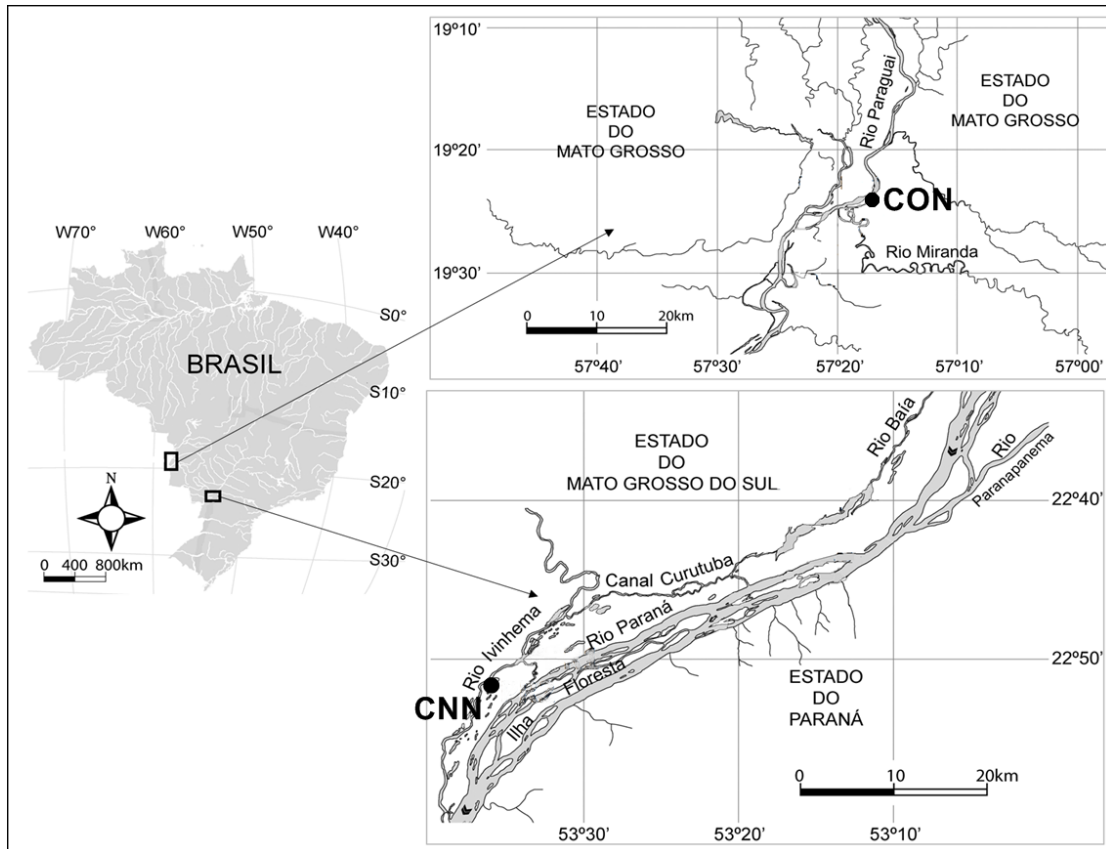


Figura 2. Área de estudo. Os pontos (•) indicam as lagoas em que as espécies de peixes congênicas *Serrasalmus maculatus* e *S. marginatus* foram amostradas. CON = habitat de co-ocorrência das espécies nativas (Pantanal); CNN = habitat de co-ocorrência da nativa *S. maculatus* com a não-nativa *S. marginatus* (alto rio Paraná).

O rio Paraguai é o principal tributário da planície do Pantanal, fluindo no sentido norte-sul ao longo do lado oeste do Pantanal e recebendo água de vários tributários (Hamilton, 2002). O Pantanal é uma das maiores planícies alagáveis do mundo, ocupando uma área de cerca 140.000 km², sendo que a maior parte deste bioma está situado em território brasileiro (Hamilton, 2002). O clima do Pantanal é marcado por um período de seca (maio a setembro) e outro de cheia (outubro a abril) (Agostinho et al., 2014), no entanto, esses períodos são variáveis dependendo da latitude desse bioma (Junk et al., 2006). Por causa da baixa declividade do terreno (2-3 cm/km no sentido norte-sul e 5-15cm/km na direção leste-oeste), é necessário um período de três a quatro meses de cheia para inundar todo o Pantanal (Alvarenga et al., 1984). Dessa forma, o pulso de inundação na porção norte coincide com a estação chuvosa, mas há um atraso de cerca de três meses entre esta estação e a ocorrência de cheia na porção sul do Pantanal e, por isso, foi considerado o mês de março como período de seca.

A planície de inundação do alto rio Paraná é o último trecho livre de barramentos do rio Paraná, localizada entre os reservatórios de Porto Primavera e de Itaipu, com cerca de 230km de extensão. O segmento do rio Paraná, ocupado pelo reservatório de Itaipu, anteriormente fluía através de um cânion, e as águas de seus tributários emanava de cachoeiras de diferentes alturas (Agostinho & Julio-Jr, 2002). A construção do reservatório submergiu essas cachoeiras (conhecidas como Salto Sete Quedas) e suprimiu essa barreira natural à dispersão de peixes, fazendo com que várias espécies que não ocorriam no alto rio Paraná invadissem este ambiente (Agostinho & Julio-Jr, 2002; Agostinho et al., 2014; Tófoli, 2015).

3.2.2 Amostragem

Os peixes e as potenciais fontes de energia foram amostrados em uma lagoa (CON) adjacente ao rio Paraguai, no Pantanal, enquanto que no alto rio Paraná, os peixes foram obtidos em uma lagoa (CNN) adjacente ao subsistema rio Ivinhema (Figura 2). Em CON, os peixes foram amostrados com auxílio de redes de arrasto de 20m, e em CNN, utilizaram-se redes de espera, com diferentes tipos de malhagens expostas por um período de 24h. Vale ressaltar que as distintas metodologias de coleta não influenciaram os sinais isotópicos dos peixes, já que somente peixes adultos foram selecionados para o estudo [de acordo com o comprimento padrão da primeira maturação, conforme Vazzoler (1996)]. Para os dois habitats foi definido o período de amostragem como sendo aquele de seca (setembro/2011 no habitat CNN e março/2012 no habitat CON), pois nestes períodos as espécies ficam confinadas nas lagoas, maximizando a probabilidade de encontro entre ambas, bem como entre estas e suas presas.

Todos os peixes amostrados foram imediatamente acondicionados em caixas térmicas com gelo e posteriormente congelados. As espécies foram identificadas segundo Graça & Pavanelli (2007) e foram aferidos dados biométricos (comprimento padrão, em centímetros, e peso, em gramas). Ao todo, foram capturados 22 indivíduos (i.e. quatorze no Paraná e oito no Pantanal) e de cada exemplar foi extraído uma amostra de músculo, próximo à base de inserção da nadadeira dorsal, o qual foi utilizado para a determinação da razão de isótopos estáveis de carbono e nitrogênio. Exemplares testemunhos foram depositados na Coleção Ictiológica do Núcleo de Pesquisas em Limnologia, Ictiologia e Aquicultura (Nupélia) da Universidade Estadual de Maringá.

As potenciais fontes primárias de energia para as espécies de piranhas foram categorizadas em pelágica, litorânea e terrestre. A fonte pelágica foi constituída por matéria orgânica particulada na coluna da água (MOP), a litorânea pelo perifíton, e a terrestre, por folhas arbóreas predominantes no entorno das lagoas. A MOP foi coletada com o auxílio de redes de fitoplâncton (com malhagem de 15 μ m), sendo esta arrastada horizontalmente por cerca de 3 minutos na subsuperfície da coluna da água, e posteriormente armazenada em frascos de 500ml. Já o perifíton foi extraído através da raspagem cuidadosa da superfície do pecíolo de plantas aquáticas. Posteriormente, as amostras de MOP e perifíton foram filtradas e retidas em filtros de fibra de vidro (GFC-Whatman, 47mm) previamente calcinados a 450° C, e imediatamente congeladas a -20 °C.

Todas as amostras (peixes e fontes primárias) devidamente identificadas, foram submetidas à secagem em estufa a 60°C (durante 72 horas). Os músculos dos peixes e as folhas da vegetação ripária foram maceradas até a obtenção de um pó fino e homogêneo e cerca de 1,5 mg (peixe) e 4 mg (folhas) de cada amostra foram acondicionadas em cápsulas de estanho para posterior análise de isótopos. Os filtros contendo MOP e perifíton foram cortados ao meio e também acondicionados em cápsulas de estanho para a análise de isótopos.

A determinação das razões isotópicas de carbono e nitrogênio foi realizada em Espectrômetro de Massa Razão Isotópica da PDZ Europa ANCA-GSL com interface a PDZ Europa 20-20 (SerconLtd., Cheshire, UK) na *University of California, Davis Stable Isotope Facility*. Os valores das razões isotópicas foram expressos com a notação delta (δ) e em partes por mil (‰), relativos ao padrão internacional para o carbono da rocha calcária *Pee Dee Belemnite* (PDB), enquanto para nitrogênio foi utilizado o N atmosférico. A amplitude dos desvios padrões observados para cinco réplicas foram de 0,04 - 0,13‰ e 0,09 - 0,22‰, de $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$, respectivamente.

3.2.3 Análise dos dados

Para identificar a estrutura do nicho isotópico das populações em cada ambiente, foram estabelecidas a amplitude do carbono (CR) e do nitrogênio (NR) isotópico (Layman et al., 2007), assim como a área padrão da elipse corrigida para o tamanho da amostra (SEAc). Estas medidas foram utilizadas para estimar a amplitude de nicho trófico de cada espécie. A sobreposição do nicho isotópico (IOv) também foi calculada com base na SEAc (Jackson et al., 2011), que representa o quanto uma espécie se assemelha em relação à outra quando considerado o espectro de isótopos em seus tecidos. A SEAc é calculada a partir da variância

e covariância dos valores de $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$, acomoda 40% dos dados e, conseqüentemente, revela o núcleo médio da área do nicho isotópico de uma população. Com isso, espera-se que a SEAc não seja sensível ao tamanho da amostra. CR e NR correspondem à distância entre dois indivíduos de uma população com os valores mais altos e mais baixos de $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$, respectivamente. Realizou-se também o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis para testar possíveis diferenças nos valores de $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$ entre as populações das duas espécies de cada um dos ambientes investigados.

Com o intuito de identificar as contribuições das fontes primárias de energia para as espécies estudadas foi utilizado o modelo de mistura isotópica (Siar – Parnell et al., 2010; 2013). Como fator de discriminação, foram adotados os valores propostos por Post et al. (2002). Todas as análises foram calculadas nos *software* R (R Development Core Team, 2014), com os pacotes Vegan (Oksanen et al., 2015) e Siar (Parnell & Jackson, 2013). O nível de significância adotado foi de $\alpha=0,05$.

3.3 RESULTADOS

Serrasalmus maculatus e *S. marginatus* parecem consumir presas diferentes em CNN, já que diferem significativamente quanto à assinatura isotópica de carbono (Tabela I). Neste local, não houve diferença significativa quanto ao $\delta^{15}\text{N}$. Em CON, foi observado o inverso, inexistência de diferença significativa entre as espécies no que se refere ao $\delta^{13}\text{C}$ e diferença significativa nos valores de $\delta^{15}\text{N}$ (Tabela I).

A área do nicho isotópico (SEAc) da população de *S. marginatus* foi maior que da sua congênere em CNN (1,25‰). Em contrapartida, *S. maculatus* obteve os maiores valores de SEAc (0,69‰) em CON (Tabela I, Figura 3). Em CON, observou-se maiores valores de CR e NR para *S. maculatus* (Tabela I). Já em CNN a espécie não-nativa teve uma amplitude maior que a espécie nativa (i.e. CR=3,86; NR=2,02). Não foi observada sobreposição da área isotópica ($\text{IOv}=0$) em nenhum dos ambientes estudados (Tabela I).

Tabela I. Valores da assinatura isotópica de $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$ (peixes e fontes), métricas referentes ao nicho isotópico (Métricas) e teste de Kruskal-Wallis (KW) para *S. maculatus* (*S.mac*) e *S. marginatus* (*S.marg*) em cada ambiente. SEAc= área padrão da elipse corrigida, CR=amplitude do $\delta^{13}\text{C}$, NR=amplitude do $\delta^{15}\text{N}$, IOv=sobreposição da área do nicho isotópico, KWp=valores de *p* indicando a significância do teste, N=nativa, NN=não nativa, n=número de amostras para a análise.

Habitat Espécie/Fonte	n	(Mínimo) - (Máximo)		Métricas			KWp		
		$\delta^{13}\text{C}(\text{‰})$	$\delta^{15}\text{N}(\text{‰})$	SEAc(‰)	CR(‰)	NR(‰)	IOv	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^{15}\text{N}$
CON							0	0,456	0,05
<i>S. mac</i> (N)	5	(-26,88)-(-24,60)	(9,08)-(9,66)	0,691	2,28	0,58			
<i>S. marg</i> (N)	3	(-26,71)-(-25,78)	(9,55)-(9,93)	0,215	0,93	0,38			
Pelágica	4	(-33,46)-(-32,12)	(3,65)-(4,34)						
Litorânea	2	(-31,68)-(-31,59)	(4,44)-(4,87)						
Terrestre	5	(-32,42)-(-27,87)	(-1,27)-(2,28)						
CNN							0	0,02	0,19
<i>S. mac</i> (N)	6	(-28,90)-(-28,32)	(10,14)-(10,94)	0,195	0,58	0,80			
<i>S. marg</i> (NN)	8	(-31,26)-(-27,40)	(10,43)-(12,45)	1,254	3,86	2,02			
Pelágica	4	(-26,17)-(-26,96)	(0,57)-(0,88)						
Litorânea	2	(-27,98)-(-27,08)	(2,41)-(2,82)						
Terrestre	4	(-31,32)-(-29,53)	(0,61)-(4,29)						

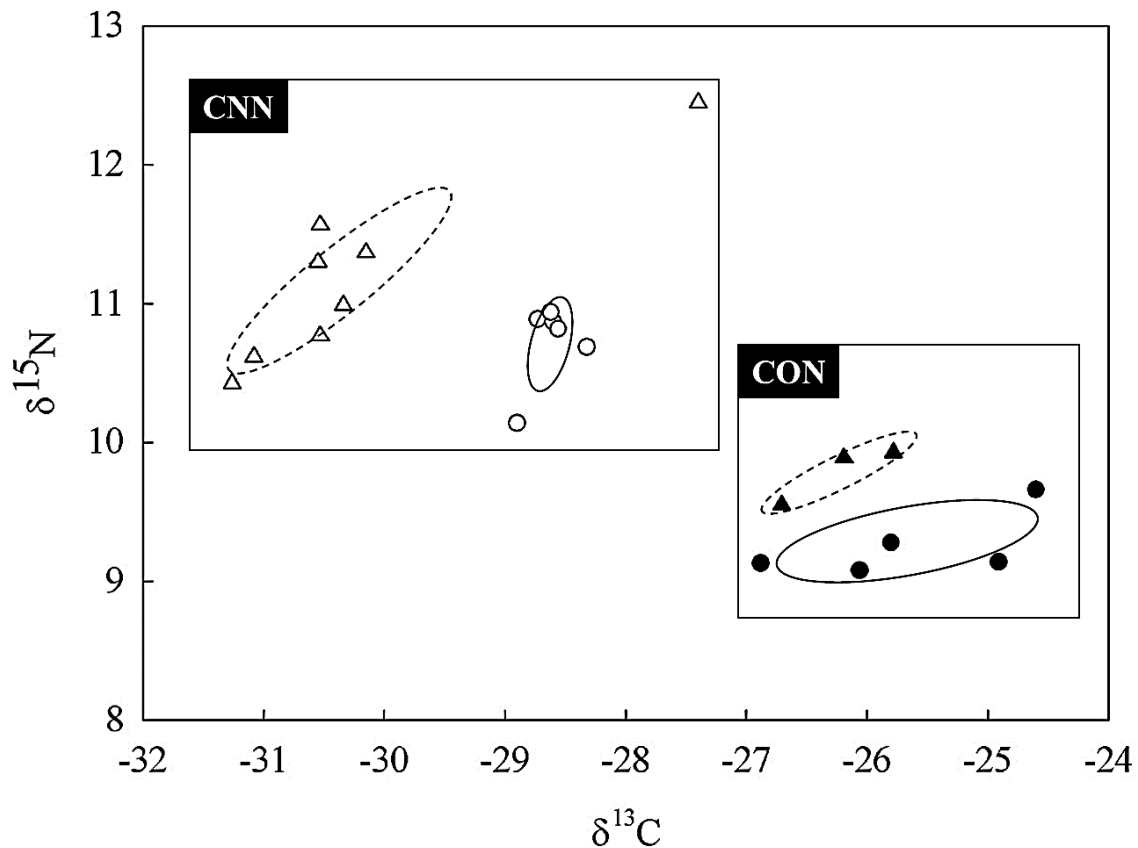


Figura 3. Área do nicho isotópica (SEAc) das espécies *Serrasalmus marginatus* (triângulos/linha pontilhada) e *Serrasalmus maculatus* (círculos/linha contínua) no Pantanal (CON) e no Paraná (CNN) baseada nos valores de $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$ (SEAc= área padrão da elipse corrigida).

A fonte de carbono predominante para ambas as espécies foi de origem terrestre tanto em CON quanto em CNN, enquanto que as fontes pelágicas e litorâneas contribuíram de forma ínfima (Figura 4). Os valores dos isótopos de C e N (mínimo e máximo) das fontes de carbono estão descritos na Tabela I.

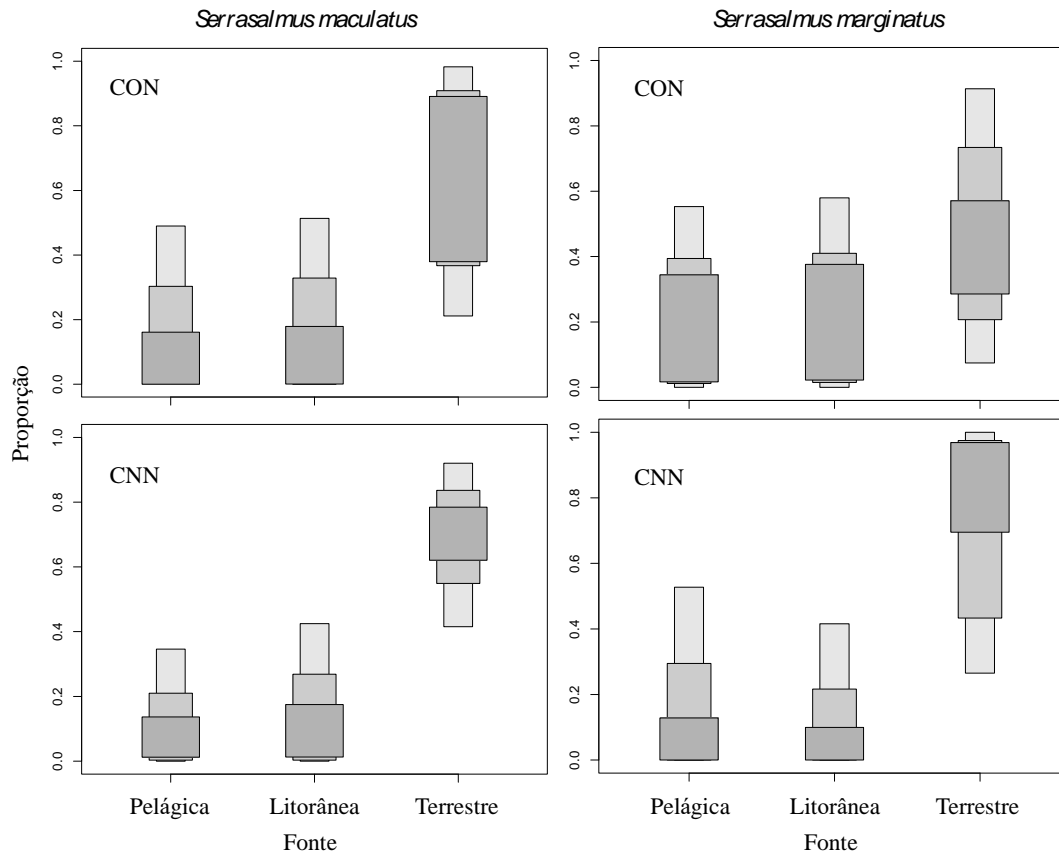


Figura 4. Contribuições proporcionais estimadas de cada fonte de energia (Pelágica, Litorânea ou Terrestre) para cada espécie nos ambientes CON e CNN. Os intervalos de credibilidade são de 50% (cinza claro), 75% (cinza médio) e 95% (cinza escuro).

3.4 DISCUSSÃO

Diferentemente do proposto por Agostinho et al. (2003), cujos resultados da análise de conteúdo estomacal das piranhas no habitat CNN revelam sobreposição de nicho trófico entre adultos, no presente estudo foi observado a utilização de recursos distintos entre as espécies. Isso pôde ser confirmado através da análise de isótopos estáveis, a qual revelou diferença significativa entre os valores de $\delta^{13}\text{C}$ e sobreposição isotópica nula. A maioria dos estudos utilizando a abordagem isotópica tem demonstrado alta sobreposição de nicho isotópico entre espécies nativas e não-nativas (e.g. Mercado-Silva et al., 2009; Olsson et al., 2009; Ruokonen et al., 2012; Monroy et al., 2014; Córdova-Tapia et al., 2015; Philippsen et al., 2015). Entretanto, a interação entre as piranhas congênicas é estruturada pela segregação trófica,

invalidando a hipótese proposta neste trabalho. Este cenário também foi encontrado por Guzzo et al. (2013) e Eloranta et al. (2015), entre espécies filogeneticamente próximas (nativa x não-nativa), resultado que foi atribuído à variabilidade isotópica específica dos peixes não-nativos.

A inexistência de sobreposição de nicho isotópico e as diferenças observadas nos valores de $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$, para o presente estudo, são fortes indícios de segregação do nicho trófico, já que estudos anteriores sugerem que a sobreposição de nicho pode ser interpretada como compartilhamento de alimentos e, conseqüentemente, um indicador potencial de competição (Pilger et al., 2010; Zambrano et al., 2010). A segregação do nicho trófico pode ter ocorrido pela alta plasticidade trófica da espécie não-nativa (Guzzo et al., 2013; Ferreira et al., 2014; Eloranta et al., 2015) no habitat CNN, demonstrada pelos valores maiores da área da elipse corrigida (SEAc) e também pelos maiores valores da amplitude dos isótopos (CR e NR). Guzzo et al. (2013), Córdova-Tapia et al. (2015) e Hill et al. (2015) também observaram que a área do nicho isotópico das espécies não-nativas foi sempre maior que a área do nicho das espécies nativas. Além disso, sabe-se que a presença de espécies não-nativas tende a diminuir a amplitude de $\delta^{13}\text{C}$ (CR) de peixes nativos (Pilger et al., 2010), fato também observado neste estudo.

No habitat CON, foi observado que a partilha de recursos está mais relacionada com o consumo de presas em níveis tróficos distintos, já que houve diferença significativa entre os valores de $\delta^{15}\text{N}$ das espécies, sem sobreposição de nicho isotópico. Também, baixos valores de SEAc , NR e CR indicam maior especialização na dieta, que pode ser atingida conforme espécies similares desenvolvem características adaptativas ao longo do tempo. Vale ressaltar que neste ambiente as espécies são nativas, evoluíram juntas e, conseqüentemente, desenvolveram especializações tróficas que fazem com que as mesmas evitem a competição por alimento (Baltz & Moyle, 1984; Brown, 1995). Além disso, o nicho isotópico reduzido pode também ser atribuído à existência de uma terceira espécie de piranha neste ambiente, *Pygocentrus nattereri* (dados não publicados), a qual apresenta o mesmo comportamento alimentar que àquelas do gênero *Serrasalmus* (Ferreira et al., 2014) e que pode também influenciar esta interação trófica.

Em ambos os habitats (CNN e CON), constatou-se que as espécies apresentaram, predominantemente, como a principal fonte de energia o carbono de origem terrestre, permitindo que a primeira predição fosse aceita. No entanto, isso não significa que as espécies de piranhas tenham se alimentado diretamente de presas de origem terrestre, já que estes peixes são piscívoros, consumindo pedaços de nadadeiras, escamas e outras partes do corpo

de suas presas (Agostinho & Marques, 2001; Agostinho et al., 2003; Costa et al., 2005; Vilares-Jr et al., 2008). Infelizmente, dados isotópicos referentes às presas das piranhas não foram aferidos, o que impossibilitou a determinação exata do que estava sendo consumido. Porém, acredita-se que as piranhas tenham consumido presas que se alimentam de recursos terrestres de forma direta (i.e. peixes com hábitos alimentares insetívoros) ou indireta (i.e. peixes detritívoros), considerando que o consumo de curimatídeos e outros caracídeos pelágicos já foi documentado na literatura (Ferreira et al., 2014).

Embora sejam recorrentes os estudos que evidenciam os recursos autóctones como os principais direcionadores de cadeias alimentares de sistemas rios-planície de inundação (e.g. Feorsberg et al., 1993; Benedito-Cecilio et al., 2000; McCutchan & Lewis, 2002; Thorp & Delong, 2002, Bunn et al., 2003; Hoeinghaus et al., 2007; Jepsen & Winemiller, 2007; Hladyz et al., 2010; Hunt et al., 2011; Reid et al., 2011), os resultados obtidos estão em concordância com o *Flood Pulse Concept* (Junk et al., 1989). Este conceito enfatiza a importância das trocas laterais do rio com a área alagada e prediz que as teias alimentares são mais dependentes da matéria orgânica produzida na planície. Embora tenha-se utilizado como *baseline* da cadeia trófica somente produtores primários, os modelos de mistura indicam a dependência, ao menos parcial, de matéria orgânica de origem terrestre.

Assim, com base no exposto acima, acredita-se que o sucesso de estabelecimento de *S. marginatus* no habitat CNN (Tófoli, 2015) deve-se às suas maiores amplitudes de nicho isotópico (i.e. SEAc, NR e CR). Estas métricas são indicativas de generalismo trófico, o qual parece ser uma característica que favorece o estabelecimento de espécies não nativas, visto que esta é uma característica comumente observada em peixes invasores de outros habitats (e.g. Brandner et al., 2012; Eloranta et al., 2015; Hill et al., 2015).

Apesar das populações de *S. maculatus* terem sido extensamente deplecionadas ao longo dos últimos 30 anos, após a introdução de *S. marginatus* (Agostinho & Julio-Jr, 2002; Agostinho et al., 2003), esse panorama parece estar se estabilizando. Agostinho et al. (2003) propuseram que a coexistência dessas espécies no habitat CNN depende da capacidade de *S. maculatus* comportar-se como um competidor fugitivo até que padrões na reprodução e de uso de recursos tornem-se diferenciados. Com o auxílio das razões isotópicas, foi possível identificar que a segregação trófica é evidente entre as congêneres, e que competição por recursos alimentares, no presente momento e no local estudado, não parece ser um fator limitante para a coexistência das mesmas. O estabelecimento de *S. marginatus* é provavelmente direcionado pelo acesso à recursos não utilizados pela espécie nativa e por outras dimensões do nicho não analisadas nesse estudo (aspectos reprodutivos, competição

entre juvenis, etc.), além de outras interações bióticas. Assim, para um panorama mais completo sobre a coexistência dessas espécies, e de várias outras espécies nativas influenciadas pela introdução de invasores competitivos, torna-se de fundamental importância a condução de novos estudos que integrem outras dimensões do nicho, bem como análises das variações espaço-temporais na dinâmica de disponibilidade e obtenção de recursos tróficos.

REFERÊNCIAS

- Abell, R., Thieme, M. L., Revenga, C., Bryer, M., Kottelat, M., Bogutskaya, N., Coad, B., Mandrak, N., Balderas, S. L., Bussing, W., Stiassny, M. L. J., Skelton, P., Allen, G. R., Unmack, P., Naseka, A., Ng, R., Sindorf, N., Robertson, J., Armijo, E., Higgins, J. Y., Heibel, T. J., Wikramanayake, E., Olson, D., López, H. L., Reis, R. E., Lundberg, J. G., Pérez, M. H. S. & Petry, P. (2008). Freshwater ecoregions of the world: a new map of biogeographic units for freshwater biodiversity conservation. *Bioscience* **58**, 403-414.
- Agostinho, A. A., Suzuki, H. I., Fugi, R., Alves, D. C., Tonella, L. H. & Espindola, L. A. (2014). Ecological and life history traits of *Hemiodus orthonops* in the invasion process: looking for clues at home. *Hydrobiologia* **746**, 415-430.
- Agostinho, C. S. & Julio-Jr, H. F. (2002). Observation of an invasion of the piranha *Serrasalmus marginatus*, (Serrasalmidae) into the Upper Paraná River, Brazil. *Acta Scientiarum: Biological Sciences* **24**, 391-395.
- Agostinho, C. S., Hahn, N. S. & Marques, E. E. (2003). Patterns of food resource use by two congeneric species of piranhas (*Serrasalmus*) on the Upper Paraná River floodplain. *Brazilian Journal of Biology* **63**, 177-182.
- Agostinho, A. A., H. F. Júlio Jr. & Petrere Jr, M. (1994). Itaipu reservoir: impacts of the impoundment on fish fauna and fisheries. In *Rehabilitation of Freshwaters Fisheries* (Cowx, I. G., ed), pp 171-184. Oxford: Blackwell Scientific Publications.
- Agostinho, C. S. & Marques, E. E. (2001). Selection of netted prey by piranhas, *Serrasalmus marginatus* (Pisces, Serrasalmidae). *Acta Scientiarum: Biological Sciences* **23**, 461-464.
- Almeida, V. L. L., Hahn, N. S. & Agostinho, C. S. (1998). Stomach content of juvenile and adult of piranhas (*Serrasalmus marginatus*) in the Paraná floodplains, Brazil. *Studies on Neotropical Fauna and Environment* **33**, 100-105.
- Alvarenga, S. M., Brasil, A. E., Pinheiro, R. & Kux, H. J. H. (1984). Estudo geomorfológico aplicado à Bacia do alto Rio Paraguai e Pantaneais Matogrossenses. *Boletim Técnico Projeto RADAM/BRASIL. Série Geomorfologia* **187**, 89-183.
- Baltz, D. M. & Moyle, P. B. (1984). Segregation by species and size classes of rainbow trout, *Salmo gairdneri*, and Sacramento sucker, *Catostomus occidentalis*, in three California streams. *Environmental Biology of Fishes* **10**, 101-110.
- Benedito-Cecilio, E., Araujo-Lima, C. A. R. M., Forsberg, B. R., Bittencourt, M. M. & Martinelli, L. C. (2000). Carbon sources of Amazonian fisheries. *Fisheries Management and Ecology* **7**, 305-315.

- Bistone, M. A., Haro, J. G. (1995). Hábitos alimentarios de *Serrasalmus spilopleura* (Pisces, Serrasalminidae) en los bañados del río Dulce (Córdoba, Argentina). *Revista Brasileira de Biologia* **55**, 847-53.
- Bøhn, T., Amundsen, P. A. & Sparrow, A. (2008). Competitive exclusion after invasion? *Biological Invasions* **10**, 359–368.
- Brandner, J., Auerswald, K., Cerwenka, A. F., Schliewen, U. K. & Geist, J. (2012). Comparative feeding ecology of invasive Ponto-Caspian gobies. *Hydrobiologia* **703**, 113–131.
- Brown, J.H. (1995). *Macroecology*. University of Chicago Press: Chicago.
- Bunn, S. E., Davies, P. M. & Winning, M. (2003). Sources of organic carbon supporting the food web of an arid zone floodplain river. *Freshwater Biology* **48**, 619–635.
- Córdova-Tapia, F., Contreras, M. & Zambrano, L. (2015). Trophic niche overlap between native and non-native fishes. *Hydrobiologia* **746**, 291–301.
- Correa, S. C. & Winemiller, K. O. (2014). Niche partitioning among frugivorous fishes in response to fluctuating resources in the Amazonian floodplain forest. *Ecology* **95**, 210–224.
- Costa, A. C., Salvador Junior, L. F., Domingos, F. F. T. & Fonseca, M. L. (2005). Alimentação da pirambeba *Serrasalmus spilopleura* Kner, 1858 (Characidae; Serrasalminae) em um reservatório do Sudeste brasileiro. *Acta Scientiarum: Biological Sciences* **27**, 365–369.
- Daga, V. S., Skóra, F., Padial, A. A., Abilhoa, V., Gubiani, E. A. & Vitule, J. R. S. (2015). Homogenization dynamics of the fish assemblages in Neotropical reservoirs: comparing the roles of introduced species and their vectors. *Hydrobiologia* **746**, 327–347.
- Dudgeon, D., Arthington, A. H., Gessner, M. O., Kawabata, Z. I., Knowler, D. J., Lévêque C., Naiman, R. J., Prieur-Richard, A. H., Soto, D., Stiassny, M. L. & Sullivan, C. A. (2006). Freshwater biodiversity: importance, threats, status and conservation challenges. *Biological reviews of the Cambridge Philosophical Society* **81**, 163–182.
- Eloranta, A. P., Nieminen, P. & Kahilainen, K. K. (2015). Trophic interactions between introduced lake trout (*Salvelinus namaycush*) and native Arctic charr (*S. alpinus*) in a large Fennoscandian subarctic lake. *Ecology of Freshwater Fish* **24**, 181–192.
- Faye, D., Morais, L. T., Raffray, J., Sadio, O., Thiaw, O.T. & Le Loc'h, F. (2011). Structure and seasonal variability of fish food webs in an estuarine tropical marine protected area (Senegal): Evidence from stable isotope analysis. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* **92**, 607–617.
- Ferreira, F. S., Vicentin, W. Costa, F. E. S. & Suárez, Y. R. (2014). Trophic ecology of two piranha species, *Pygocentrus nattereri* and *Serrasalmus marginatus* (Characiformes, Characidae), in the floodplain of the Negro River, Pantanal. *Acta Limnologica Brasiliensia* **26**, 381–391.
- Forsberg, B. R., Araujo-Lima, C. A. R. M., Martinelli, L. A., Victoria, R. L. & Bonassi, J. A. (1993). Autotrophic carbon sources for fish of the central Amazon. *Ecology* **74**, 643–652.
- Graça, W. J. & Pavanelli, C. S. (2007). *Peixes da planície de inundação do alto rio Paraná e áreas adjacentes*. Maringá, PR: Eduem.
- Guzzo, M. M., Haffner, G. D., Legler, N. D., Rush, S. A. & Fisk, A. T. (2013). Fifty years later: Trophic ecology and niche overlap of a native and non-indigenous fish species in the western basin of Lake Erie. *Biological Invasions* **15**, 1695–1711.

- Hamilton, S. K. (2002). Hydrological controls of ecological structure and function in the Pantanal wetland (Brazil). In *The Ecohydrology of Southamerican Rivers and Wetlands*, Special publications 6, (McClain, M., ed), pp. 133-158. International Association of Hydrological Science.
- Hill, J. M., Jones, R. W., Hill, M. P. & Weyl, O. L. F. (2015). Comparisons of isotopic niche widths of some invasive and indigenous fauna in a South African river. *Freshwater Biology* **60**, 893–902.
- Hladyz, S., Nielsen, D. L., Suter, P. J. & Krull, E. S. (2010). Temporal variations in organic carbon utilization by consumers in a lowland river. *River Research and Applications* **28**, 513-528.
- Hoeinghaus, D. J., Winemiller, K. O. & Agostinho, A. A. (2007). Landscape-scale hydrologic characteristics differentiate patterns of carbon flow in large-river food webs. *Ecosystems* **10**, 1019-1033.
- Hunt, R. J., Jardine, T. D., Hamilton, S. K. & Bunn, S. E. (2011). Temporal and spatial variation in ecosystem metabolism and food web carbon transfer in a wet-dry tropical river. *Freshwater Biology* **57**, 435-450.
- Jackson, A. L., Inger, R., Parnell, A. C. & Bearhop, S. (2011). Comparing isotopic niche widths among and within communities: SIBER - Stable isotope Bayesian ellipses in R. *Journal of Animal Ecology* **80**, 595-602.
- Jepsen, D. B. & Winemiller, K. O. (2007). Basin geochemistry and isotopic ratios of fishes and basal production sources in four neotropical rivers. *Ecology of Freshwater Fish* **16**, 267–281.
- Júlio Júnior, H. F., Tós, C. D., Agostinho, A. A. & Pavanelli, C. S. (2009). A massive invasion of fish species after eliminating a natural barrier in the upper rio Paraná basin. *Neotropical Ichthyology* **7**, 709–718.
- Juncos, R., Milano, D., Macchi, P. J. & Vigliano, P. H. (2014). Niche segregation facilitates coexistence between native and introduced fishes in a deep Patagonian lake. *Hydrobiologia* **747**, 53–67.
- Junk, W. J., Cunha, C. N., Wantzen, K. M., Petermann, P., Strüssmann, C., Marques, M. I. & Adis, J. (2006). Biodiversity and its conservation in the Pantanal of Mato Grosso, Brazil. *Aquatic Sciences* **68**, 278–309.
- Junk, W. J., Bayley, P. B. & Sparks, R. E. (1989). The flood pulse concept in river-floodplain systems. In *Proceedings of the International Large River Symposium*, vol. 106 (Dodge, D. P., ed), pp. 110-127. Canadian Special Publication of Fisheries and Aquatic Sciences.
- Keppeler, F. W., Lanés, L. E. K., Rolon, A. S., Stenert, C., Lehmann, P., Reichard M. & Maltchik, L. (2014). The morphology-diet relationship and its role in the coexistence of two species of annual fishes. *Ecology of Freshwater Fish* **24**, 77–90.
- Layman, C. G., Arrington, D. A., Montaña, C. G. & Post, D. M. (2007). Can stable isotope ratios provide for community-wide measures of trophic structure? *Ecology* **88**, 42–48.
- Le Loc'h, F., Durand J., Diop K. & Panfili J. (2015). Spatio-temporal isotopic signatures ($\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$) reveal that two sympatric West African mullet species do not feed. *Journal of Fish Biology* **86**, 1444–1453.
- McCutchan, J. H. & Lewis, W. M. (2002). Relative importance of carbon sources for macroinvertebrates in a Rocky Mountain stream. *Limnology and Oceanography* **47**, 742–752.

- Mercado-Silva, N., Helmus, M. R. & Vander Zanden, M. J. (2009). The effects of impoundment and non-native species on a river food web in Mexico's Central plateau. *River Research and Applications* **25**, 1090-1108.
- Monroy, M., Maceda-Veiga, A., Caiola, N. & De Sostoa, A. (2014) Trophic interactions between native and introduced fish species in a littoral fish community. *Journal of Fish Biology* **85**, 1693–1706.
- Oksanen, J. F., Blanchet, B., Kindt, R., Legendre, P., Minchin, P. R., O'Hara, R. B., Simpson, G. L., Solymos, P. M., Stevens M. H. H. & Wagner, H. (2015). vegan: Community Ecology Package. R package version 2.3-0. <http://CRAN.R-project.org/package=vegan>.
- Olsson, K., Stenroth, P., Nystrom, P. & Graneli, W. (2009). Invasions and niche width: does niche width of an introduced crayfish differ from a native crayfish? *Freshwater Biology* **54**, 1731–1740.
- Parnell, A. & Jackson, A. (2013). siar: Stable Isotope Analysis in R. R package version 4.2. <http://CRAN.R-project.org/package=siar>.
- Parnell, A. C., Inger, R., Bearhop, S., & Jackson, A. L. (2010). Source partitioning using stable isotopes: coping with too much variation. *PLoS ONE* **5**, e9672 Doi: 10.1371/journal.pone.0009672.
- Pelicice, F. M., Vitule, J. R. S., Lima Junior, D. P., Orsi, M. L. & Agostinho, A. A. (2014). A serious new threat to brazilian freshwater ecosystems: The naturalization of nonnative fish by decree. *Conservation Letters* **7**, 55–60.
- Peterson, B. J. & Fry, B. (1987). Stable isotopes in ecosystem studies. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* **18**, 293–320.
- Philippsen, J. S., Hauser, M. & Benedito, E. (2015) Isotopic niches of sympatric native and exotic fish species in a Neotropical floodplain. *Annals of the Brazilian Academy of Sciences* **87**, 825-833
- Pilger, T. J., Gido, K. B. & Propst, D. L. (2010). Diet and trophic niche overlap of native and nonnative fishes in the Gila River, USA: implications for native fish conservation. *Ecology of Freshwater Fish* **19**, 300–321.
- Polačik M., Harrod C., Blažek R. & Reichard M. (2013). Trophic niche partitioning in communities of African annual fish: evidence from stable isotopes. *Hydrobiologia* **721**, 99–106.
- Post, D. M. (2002). Using Stable Isotopes to Estimate Trophic Position : Models, Methods, and Assumptions. *Ecology* **83**, 703–718.
- R Core Team (2014). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <http://www.R-project.org/>.
- Reid, M. A., DeLong, M. D. & Thoms, M. C. (2011). The influence of hydrological connectivity on food web structure in floodplain lakes. *River Research and Applications* **28**, 827-844.
- Ruokonen, T. J., Karjalainen J., Kiljunen M., Pursiainen, M. & Hämäläinen, H. (2012). Do introduced crayfish affect benthic fish in stony littoral habitats of large boreal lakes. *Biological Invasions* **14**, 813-825.
- Sazima, I. & Machado, F. A. (1990). Underwater observations of piranhas in western Brazil. *Environmental Biology of Fishes* **28**, 17-31.

- Thorp, J. H. & DeLong, A. D. (2002). Dominance of autochthonous autotrophic carbon in food webs of heterotrophic rivers. *Oikos* **96**, 543–550.
- Tófoli, R. M. (2015). *Um método simples para avaliar a probabilidade de estabelecimento e invasividade de espécies não nativas*. Exame Geral de Qualificação de Doutorado. Universidade Estadual de Maringá, 27 p.
- Vander Zanden, M. J. & Rasmussen, J. B. (1999). Primary consumer d13C and d15N and the trophic position of aquatic consumers. *Ecology* **80**, 1395–1404.
- Vazzoler, A. E. A. M. (1996). *Biologia da reprodução de peixes teleósteos: teoria e prática*. EDUEM, Maringá/SBI, São Paulo, 169 p.
- Villares-Jr, G. A., Gomiero, L. M. & Goitein, R. (2008). Alimentação de *Serrasalmus maculatus* (Kner, 1858) (Characiformes; Serrasalmidae) no trecho inferior bacia do rio Sorocaba, São Paulo, Brasil. *Acta Scientiarum: Biological Sciences* **30**, 267–273.
- Vitule, J. R. S., Skóra, F. & Abilhoa, V. (2012). Homogenization of freshwater fish faunas after the elimination of a natural barrier by a dam in Neotropics. *Diversity and Distributions* **18**, 111-120.
- Zambrano, L., Valiente, E. & Vander Zanden, M. J. (2010). Food web overlap among native axolotl (*Ambystoma mexicanum*) and two exotic fishes: carp (*Cyprinus carpio*) and tilapia (*Oreochromis niloticus*) in Xochimilco, Mexico City. *Biological Invasions* **12**, 3061–3069.

