INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA – INPA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA, CONSERVAÇÃO E BIOLOGIA EVOLUTIVA

Estimativa da variabilidade genética da piramutaba (*Brachyplatystoma vaillantii*) por meio de marcadores moleculares microssatélites e *D-loop* de quatro localidades da Amazônia: diferenças entre calha e tributários.

FABÍOLA DA COSTA RODRIGUES

MANAUS – Amazonas

Setembro, 2009

FABÍOLA DA COSTA RODRIGUES

Estimativa da variabilidade genética da piramutaba (*Brachyplatystoma vaillantii*) por meio de marcadores moleculares microssatélites e *D-loop* de quatro localidades da Amazônia: diferenças entre calha e tributários.

ORIENTADOR: Dr. JOSÉ ANTÔNIO ALVES GOMES

CO-ORIENTADORA: Dra. IZENI PIRES FARIAS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação do INPA como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Genética, Conservação e Biologia Evolutiva.

MANAUS, AM

Setembro, 2009

FICHA CATALOGRÁFICA

R696 Rodrigues, Fabíola da Costa
Estimativa da variabilidade genética da piramutaba (*Brachyplatystoma vaillantii*) por meio de marcadores moleculares microssatélites e D-loop de quatro localidades da Amazônia diferenças entre calha e tributários / Fabíola da Costa Rodrigues. --- Manaus : [s.n.], 2009.
xvi, 96 f. ; Il. color.

Dissertação (mestrado)-- INPA/UFAM , Manaus, 2009
Orientador : José Antônio Alves Gomes
Co-orientador : Izeni Pires Farias
Área de concentração : Genética, Conservação e Biologia Evolutiva

1. Piramutaba. 2. Brachyplatystoma vaillantii. 3. Marcadores moleculares. 4. Genética populacional. I. Título.

CDD 19. ed. 597.520415

Sinopse:

Foram utilizados no presente estudo marcadores moleculares de sequências de DNA do genoma mitocondrial e microssatélites para identificar a distribuição da variabilidade genética da piramutaba (*Brachyplatystoma vaillantii*), um bagre migrador de importância econômica para a região amazônica, no sentido Norte-Sul, em quatro localidades da bacia Amazônica. Os resultados revelaram a presença de um único estoque panmítico.

Palavras-chave: bagre migrador, diversidade genética, sobre-pesca, panmixia.

Dedico esta vitória ao Jeová, meu pai (*in memorian*), quem mais sonhou com este mestrado... até mais do que eu mesma.

“De fato, não fracassei ao tentar, cerca de 10.000 vezes (...). Simplesmente, encontrei 10.000 maneiras que não funcionam.”

Thomas A. Edison

A realização deste projeto foi possível devido:

Ao Programa de Pós-graduação em Genética, Conservação e Biologia Evolutiva, do INPA.

Ao laboratório de Genética e Evolução Animal (LEGAL) da UFAM, onde a maior parte deste trabalho foi desenvolvido.

Ao Laboratório Temático de Biologia Molecular (LTBM) do INPA, nas etapas iniciais deste projeto.

A CAPES/FAPEAM pela concessão da bolsa de estudos.

Essa dissertação teve financiamento proporcionado pelos projetos: da FAPEAM (Processo 903/03), do CNPq/PPG-7 (Processo 557090/05), CT-Amazônia 554057/2006-9, CT-Amazônia 575603/2008-9 e do CNPq/CT Amazônia (Processo 554054/06-0).

AGRADECIMENTOS

2007 foi um ano de mudanças, mudanças boas e ruins... Consegui entrar no seleto grupo de mestrado do INPA; conheci meu “princeso”; infelizmente meu pai adoeceu e faleceu; vínculos foram desfeitos, mas outros foram consolidados. Esse ano com certeza, nunca sairá da minha memória! Os anos de 2008 e 2009 foram de batalha (às vezes, guerra) e de realizações: época do aprendizado. Não falo só do aprendizado intelectual ou das práticas laboratoriais, que me ensinaram bastante, mas do conhecer. O “deixar se conhecer”, para assim saber lidar com os seus sentimentos, limites e obstáculos, e o “conhecer os outros”, com todos os sentimentos (bons ou ruins) misturados. Superação é a palavra do meu mestrado, foram provas e provações. Mas nada disso seria possível sozinha, por isso eu agradeço...

... Ao meu Bom Deus, força maior, onde eu sempre encontrei conforto e força para prosseguir. ***“Olhos pra quando eu não vejo. Se eu me sinto sozinho, Ele vem em segredo, que me faz passarinho pra que eu não mais tenha medo”***

... Ao São Jorge, meu Santo guerreiro. ***“Por que eu estou vestida com as roupas e as armas de Jorge”***

... À minha mãe, pela ótima educação, ensinamentos e valores. Por ter sido sempre meu exemplo de dignidade, fé e força, e por ser a principal responsável pela formação do meu caráter. Obrigada por ter me ensinado valores tão preciosos! ***“A medida de amar é amar sem medida”***

... Ao Jeová, meu pai (*in memorian)*, pela bondade e generosidade de sempre. Por ter me ensinado a ver a vida com outros olhos e por ter acreditado nesse mestrado. Eu não sabia o quanto iria sentir sua falta! Esse prêmio é todo seu!!! ***“E aquele sentimento que era passageiro, não acaba mais”***

... À minha irmã Eliane, que foi companheira e passou pelos mesmos desafios que eu e aguentou meu mau humor. À minha irmã Monique, que esse mestrado te sirva de inspiração e volte a estudar. ***“Quem sabe o que quer, nunca fica pra trás... Bote fé!”***

... Ao meu amor e companheiro Marco, por ser meu “pára-raios”, meu lenço de papel, meu ombro, meu incentivador, meu estimulante... ***“Só vim pra te fazer sentir, você, pra me fazer viver”***... Pelo apoio nos momentos difíceis, por não me deixar desistir e por sempre estar ao meu lado. ***“Nada do que possa acontecer, será mais forte do que há entre nós”***

... Ao curso de Genética, Conservação e Biologia Evolutiva, ao INPA e à UFAM pelo auxílio e infraestrutura. ***“Nessa terra de gigantes”***

... À CAPES/FAPEAM pela concessão da bolsa de estudos. À FAPEAM e ao CNPq pelo financiamento do projeto. Ao PROCAD pela oportunidade concedida e experiência na UNICAMP.

... Ao Dr. José Gomes, pela orientação, pelos direcionamentos e pelo apoio nos momentos críticos e decisivos.

... À Dra. Izeni Farias, pela orientação, paciência, dedicação, profissionalismo, acolhimento, sabedoria e por ser meu principal exemplo de profissional. Obrigada pela confiança e por ter sido meu "pára-raios" durante essa jornada. Sem a senhora nada disso seria possível! ***"A mente criadora é o dom maior naqueles que são revolucionários"***

... Ao professor Dr. Tomas Hrbek, gênio das análises, pelos ensinamentos e paciência. ***"E eu, o que faço com esses números?"***

... Aos três grandes amigos que sempre vou levar em meu coração: Leandra Terencio, Carlos Schneider e Cláudia Gross. Obrigada por me aturarem, por me acalmarem, por escutarem minhas neuras, por me fazerem rir nos momentos de choro, por serem meus primeiros revisores em tudo, por serem pessoas iluminadas! Obrigada pelas aulas, dicas, ensinamentos, paciência, traquilidade e gargalhadas. Eu não sei o que seria de mim sem vocês três branquelos!!! ***"Abençoados os que possuem amigos, os que os têm sem pedir. Porque amigo não se pede, não se compra, nem se vende. Amigo a gente sente!"***

... À Isaurinha, que foi uma mãe e às vezes avó, que me acolheu em sua casa com todo o carinho nos momentos decisivos. Obrigada pela acolhida, companhia, atenção, broncas e mimos! ***"Amigo é coisa pra se guardar do lado esquerdo do peito"***

... Aos membros do Projeto Pirada e ao Projeto Pirada.

... Aos companheiros do LEGAL, em especial: Waleska, Concy, Áureo, Natasha, Valéria, Adam e Mário, pelas dicas e ajuda nas análises.

... À Dina e ao Johnson, por terem me disponibilizado o MegaBACE sempre que precisei.

... À Dra. e professora querida Eliana Feldberg, pelos incentivos e serenidade todas as vezes em que conversamos.

... Ao Dr. Jorge Porto, pelos valiosos artigos e pela ajuda de sempre.

... Aos revisores do plano de dissertação (Dr. Alberto Akama e Dra. Iracilda Sampaio), à banca de qualificação (Dra. Eliana Feldberg, Dra. Maria das Neves e Dr. Cleiton Fantin) e aos *referees* da dissertação (Dr. Cláudio Oliveira, Dr. Jorge Porto, Dr. Alberto Prioli, Dr. Anderson Alves e Dr. Pedro Galetti Júnior).

... A todos que contribuíram para a realização deste trabalho. Muito obrigada!!!

... E... à piramutaba, esse bagre tão interessante e que vem sofrendo com a pesca excessiva mas que mesmo assim, continua firme e forte nos rios, talvez adotando novas estratégias para manter seus genes no ambiente.

Sinceramente, FCR

RESUMO

A piramutaba (*Brachyplatystoma vaillantii*) é um grande bagre que realiza longas migrações em rios de águas brancas da bacia Amazônica. Esse bagre necessita de áreas específicas para a criação, alimentação e reprodução, uma extensão que vai desde o estuário até as cabeceiras do rio Solimões-Amazonas. É uma das espécies de bagres mais capturadas pela pesca, em particular a pesca industrial que a exporta para vários países, movimentando milhões de dólares por ano. A piramutaba encontra-se em sobre-pesca de crescimento, fato notado pela contínua diminuição no tamanho nas capturas. Considerando a importância ecológica e econômica desta espécie, este trabalho abordou uma análise da variabilidade genética da piramutaba, provenientes de quatro localidades (Vila Bittencourt, Manaus, Tefé e Porto Velho) da bacia Amazônica, no sentido Norte-Sul de distribuição da espécie, por meio de marcadores de sequências da região controle do DNA mitocondrial e de marcadores microssatélites. Foram desenvolvidos e caracterizados 15 marcadores microssatélites espécie-específicos e seis foram escolhidos e utilizados para as análises populacionais. Os resultados obtidos com as sequências de DNA mitocondrial e com os marcadores microssatélites mostraram a existência de um único estoque geneticamente homogêneo. A migração realizada pela piramutaba não é só importante para o seu ciclo de vida, mas também para a manutenção de sua diversidade genética. Os resultados desta dissertação podem ajudar em futuros estudos de manejo e de conservação da piramutaba na Amazônia.

ABSTRACT

The piramutaba (*Brachyplatystoma vaillantii*) is a species of a large catfish that undertakes long distance migrations in whitewater rivers of the Amazon basin. This catfish species needs specific areas for growth, feeding and reproduction, an expanse from the estuary to the headwaters of the Solimões-Amazonas River. This species is one of the most frequently captured catfish species in particular by industrial fishing fleets which then export them to various countries, resulting in a commerce worth millions of dollars. The piramutaba is over exploited, a fact noted also in the continuous decrease in size at capture. Considering the ecological and economic importance of this species, this study undertook an analysis of genetic variability of the piramutaba sampled from four localities (Vila Bittencourt, Manaus, Tefé e Porto Velho) from a north-south transect in the Amazon basin, and utilized mitochondrial sequence and nuclear microsatellite data. Fifteen species specific markers were developed and characterized, and six of these were selected for population genetic analyses. The results obtained with the mitochondrial sequence data and microsatellite fragment data indicated the existence of a single genetically homogeneous stock of piramutaba. The migrations of the piramutaba are not only important for the completion of its life cycle, but also for the maintenance of the genetic diversity of this species. The results of this dissertation can help in future studies of management and conservation of the piramutaba in the Amazon basin.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL 1

1.1 Os grandes bagres migradores da Amazônia 1

1.2 Piramutaba (*Brachyplatystoma vaillantii*) 2

1.3 A sobrepesca da piramutaba 4

1.4 Variabilidade Genética 6

2 OBJETIVOS 8

2.1 Objetivo geral 8

2.2 Objetivos específicos 8

CAPÍTULO I 9

CAPÍTULO II 16

II.1 INTRODUÇÃO 17

II.1.1 DNA Mitocondrial (Região Controle) 18

II.1.2 Marcadores Moleculares Microssatélites 20

II.2 MATERIAL E MÉTODOS 24

II.2.1 Amostragem 24

II.2.2 Extração de DNA e amplificação dos fragmentos 24

II.2.3 DNA Mitocondrial (Região Controle) 25

II.2.4 Marcadores moleculares microssatélites 27

II.3 RESULTADOS 31

II.3.1 Análise da diversidade genética 31

II.3.2 Análise de estrutura populacional 35

II.4 DISCUSSÃO 42

II.4.1 Análise da diversidade genética 42

II.4.2 Piramutaba: uma população panmítica 46

II.4.3 A problemática do rio Madeira 50
II.4.4 Implicações para a conservação e manejo 52
3 CONCLUSÕES GERAIS 54
4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 55
ANEXO I 70
ANEXO II 77

LISTA DE FIGURAS

Introdução

Figura 1- Exemplar de piramutaba - *Brachyplatystoma vaillantii*.....2

Figura 2- Hipótese para o ciclo de vida da piramutaba.....4

Capítulo II

Figura 1- Esquema gráfico do genoma mitocondrial de peixes, destacando a região controle (*D-loop*) (Modificado de Meyer, 1993). Secções em branco (exceto o 12S e 16 S, que codificam RNAs ribossomais) representam os genes codificadores de proteínas, as secções em laranja correspondem aos genes que codificam RNAs transportadores e a região em verde corresponde a região controle.....19

Figura 2- Locais de coleta: Vila Bittencourt = rio Japurá; Tefé = rio Solimões; Manaus = rio Solimões; Porto Velho = rio Madeira.....24

Figura 3- Esquema de anelamento dos *primers* que foram utilizados para a amplificação da região controle 25

Figura 4- Inserção de 46pb do indivíduo 3429 proveniente de Tefé.....31

Figura 5- Gráfico do número de substituições nucleotídicas (transições –TS, transversões- TV) *versus* a distância genética (JC69) para a região controle da piramutaba.....32

Figura 6- Gráfico de distribuição *mismatch* (*mismatch distribution)* indicando que não há a existência de expansão súbita (distribuição bimodal).....37

Figura 7- Árvore de Evolução Mínima (ME) sem raiz para as localidades amostradas. Em verde: amostras provenientes do rio Madeira (Porto Velho), em rosa amostras de Tefé, em amarelo amostras do rio Japurá (Vila Bittencourt) e em azul amostras de Manaus.....38

Figura 8- Gráfico do Structure mostrando uma população panmítica. O maior valor para K=1foi de p= -3595,9. Os valores na vertical são os valores de p da média de verossimilhança; valores na horizontal são os números de agrupamentos K (*clusters*) possíveis.....40

Figura 9- Maior índice de diversidade genética Θ encontrado. Na figura 13a, Θ para a Porto Velho (Θ=2,675) e em 13b o menor Θ encontrado (Θ=0,725) para o rio Japurá.....40

LISTA DE TABELAS

Capítulo I:

Tabela 1: Caracterização de 15 locos microssatélites em 36-48 indivíduos de piramutaba (*Brachyplatystoma vaillantii*) do município de Tefé, Amazonas, Brasil. 14

Tabela 2: Amplificação heteróloga com *primers* de *Brachyplatystoma vaillantii* em outras espécies de *Brachyplatystoma*.....15

Capítulo II:

Tabela 1: Locos de microssatélites de piramutaba desenvolvidos no presente estudo e escolhidos para análises populacionais.....28

Tabela 2: Esquema das genotipagens multiplex por tamanho de fragmento.....29

Tabela 3: Índices de polimorfismo de DNA para os espécimes de *B. vaillantii* das quatro localidades amostradas. N=número amostral; H= número de haplótipos; HU=haplótipos únicos; S=sítios polimórficos; ETA=número de mutações; HD=diversidade haplotípica; PI= diversidade nucleotídica; K=média das diferenças nucleotídicas par a par.....33

Tabela 4: Índices de diversidade genética por localidade.....34

Tabela 5: Número de alelos encontrados por loco, heterozigosidade observada, heterozigosidade esperada e o valor de p.....35

Tabela 6: AMOVA para as localidades de piramutaba.....36

Tabela 7: Diferenciação genética (*Φst*) acima da diagonal e estimativa indireta de fluxo gênico (*Nm*) abaixo da diagonal.....36

Tabela 8: Análise de Variância Molecular (AMOVA).....39

Tabela 9: Índices de migração entre as localidades. Observa-se um maior valor de migrantes de Manaus para Porto Velho e um menor valor de Porto Velho para o rio

Japurá, em destaque. Valores abaixo da diagonal correspondem ao número estimado de imigrantes, e os valores abaixo da diagonal, correspondem ao número estimado de emigrantes entre as localidades.....41

1 INTRODUÇÃO GERAL

1.1 Os grandes bagres migradores da Amazônia

A família Pimelodidae é um clado com aproximadamente 300 espécies distribuídas nos rios da América do Sul e Central, Ilhas do Caribe e Sul do México (Nelson, 2006; De Pinna, 1998; Lundberg e Littmann, 2003). As principais características morfológicas dos peixes dessa família são: corpo sem placas, nadadeira adiposa bem desenvolvida, presença de acúleos nas nadadeiras peitorais e dorsal e a presença de três pares de barbilhões longos, sendo um par na maxila superior e dois na maxila inferior (Nelson, 1994). Essa família inclui os grandes bagres do gênero *Brachyplatystoma,* que foi recentemente revisado e re-descrito por Lundberg e Akama (2005). Os autores descreveram uma nova espécie, a piraíba negra ou filhote capapreta (*B. capapretum)*, além de criarem uma tribo para este grupo, Brachyplatystomatini, bem como o novo sub-gênero *Malacobagrus.*

Os bagres, que na Amazônia também são chamados de peixes lisos, são o alvo principal de uma parcela significativa da atividade pesqueira existente na região amazônica. Estima-se que a captura dos bagres pertencentes ao gênero *Brachyplatystoma* corresponde a cerca de 80% do total da pesca de peixes lisos e esse esforço de pesca é feito em cima de três espécies: *Brachyplatystoma vaillantii* (piramutaba), *B. rousseauxii* (dourada) e *B. filamentosum* (filhote ou piraíba) (Barthem e Goulding, 1997). Ao longo do sistema Solimões-Amazonas, estas espécies são capturadas pela frota pesqueira desde Belém, no estuário do rio Amazonas, até Pucallpa, no Peru, aproximadamente 4.500 km a oeste, próximo aos Andes peruanos. A piramutaba e a dourada são as principais espécies comerciais de bagres pescados nos canais destes rios (Barthem e Goulding, 1997; Id., 2007).

1.2 Piramutaba (*Brachyplatystoma vaillantii*)

A piramutaba (Figura 1), dependendo do país onde é encontrada, é conhecida vulgarmente como: piramutaba, pira-botão ou mulher-ingrata no Brasil; pirabutón ou blanco-pobre na Colômbia, bagre no Equador e manitoa no Peru (Fabré e Barthem, 2005; Barthem e Goulding, 2007).

Entre as características que a distinguem dos outros bagres, estão: a cabeça larga, coberta por uma fina camada de pele e focinho fortemente deprimido; olhos pequenos e dorsolaterais; barbilhões da maxila superiores bem longos; nadadeira caudal em forma de furca com raios laterais longos e filamentosos; base da nadadeira adiposa mais longa que a base da nadadeira anal, a coloração cinza-escuro na região dorsal e claro na região ventral, dentes deprimidos e dispostos em bandas na maxila superior e na maxila inferior (Barthem, 1990; Barthem e Goulding, 1997; Alonso e Pirker, 2005). A maxila superior é protuberante e os acúleos peitorais e dorsal não encaixados na pele do animal são bem desenvolvidos, mas não muito fortes. O tamanho máximo registrado é de 105cm (Burgess,1989; Barthem e Goulding, 1997) e 10 kg (Fabré e Barthem, 2005). Sua reprodução se dá entre segundo e o terceiro ano de vida e estima-se que ela possa viver até os 22 anos de idade (Alonso e Pirker, 2005)

Figura 1: Exemplar de piramutaba - *Brachyplatystoma vaillantii* (Foto: Fabíola Rodrigues)

Com relação à distribuição geográfica, há sobreposição entre a piramutaba e as demais espécies do gênero *Brachyplatystoma,* englobando as bacias dos rios

Amazonas, Tocantins, Parnaíba e pequenos rios que deságuam entre a costa destes rios (Eigenmann e Eigenmann, 1890; Mees, 1974). Ocorre principalmente nos tributários de água branca do rio Solimões-Amazonas, preferencialmente no canal desses rios e na foz amazônica (Barthem e Goulding, 1997).

A ampla distribuição geográfica, relacionada com a distribuição de tamanho dos exemplares pescados ao longo dos diversos rios e a frequência de indivíduos sexualmente maduros levantou hipóteses que a piramutaba poderia realizar migrações. Por ser um peixe adaptado às águas turvas que nada próximo ao fundo dos rios é muito difícil de ser observado (Barthem, 1990) e por conta disso a sua migração é tão pouco conhecida e estudada, apesar da grande importância para o comércio nacional e internacional (Bayley e Petrere, 1989; Barthem, 1990; Barthem e Goulding, 1997).

Um trabalho pioneiro a respeito da migração da piramutaba foi realizado por Godoy (1979) pelo método de marcação e recaptura, nas áreas do estuário e baixo Amazonas. Porém, os resultados foram inconclusivos já que foram recapturadas somente 0,67% das 9.296 piramutabas marcadas.

Barthem e Goulding (1997; Id., 2007), a partir de levantamentos de captura experimental e de dados merísticos e morfométricos, propuseram que esses peixes são capazes de nadar aproximadamente 4.500 Km para completar seu ciclo de vida (Figura 2). Assim, os adultos se reproduzem e desovam na região oeste do rio Amazonas, para depois regressar à região estuarina. Os ovos e larvas são levados passivamente pelas correntes do rio até a região do estuário amazônico, região onde ocorre o recrutamento inicial e por lá ficam até atingirem 20cm. A partir de então, os jovens deslocam-se rio acima durante um a dois anos nos grandes rios da Amazônia Central para se alimentar, sendo esta a área de alimentação e crescimento durante a fase pré-adulta. Após atingirem uma idade de aproximadamente 2-3 anos e 40cm de comprimento, quando o nível do rio começa a subir, as piramutabas que viveram na Amazônia Central, formam cardumes e se movem rio acima procurando as cabeceiras para a reprodução, reiniciando o ciclo reprodutivo.

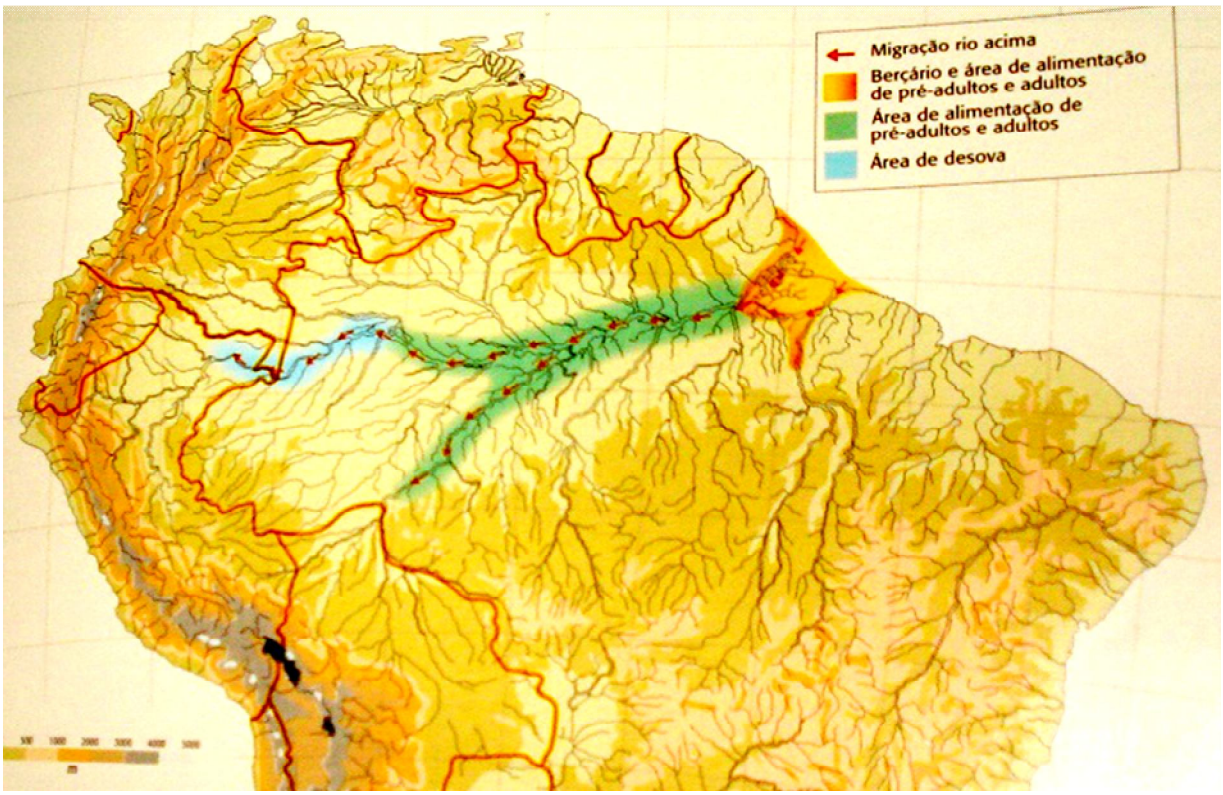

Figura 2: Hipótese para o ciclo de vida da piramutaba (Fonte: Barthem e Goulding, 2007)

1.3 A sobrepesca da piramutaba

A piramutaba é capturada tanto pela pesca artesanal (ou de pequena escala) quanto pela frota industrial, sendo esta última representada principalmente por empresas frigoríficas da cidade de Belém. No final da década de 1960 o Governo Federal disponibilizou e ofereceu incentivos fiscais, como a isenção de impostos e facilidades de importações, para a pesca da piramutaba, através do Decreto-Lei nº 221, de 28 de janeiro de 1967. Assim aumentou o interesse econômico pelos bagres, e pela piramutaba em particular, principalmente no estuário para fins de exportação (Britto *et al.*, 1975; Goulding, 1979; Rodríguez, 1991; Barthem e Goulding, 1997; Vieira, 2005). Somente em 1975 é que se iniciaram as pesquisas científicas sobre a biologia da piramutaba e seu estoque (Dias Neto e Mesquita, 1988).

Dados pesqueiros sugerem que o estoque de piramutaba está sobre-explotado, cuja sobrepesca de crescimento é identificada pela contínua diminuição dos tamanhos dos peixes nas capturas (Barthem, 1990; Barthem e Petrere, 1995; Barthem e Goulding, 1997; Alonso e Pirker, 2005). O desembarque da piramutaba apresentou um pico de captura em 1977, quando atingiu a cota de 28.829 t (toneladas) (SANYO, 1998). Em 1980 a exportação de piramutaba no estado do Pará ultrapassou os 12 milhões de dólares. A partir daí a captura total desembarcada apresentou uma tendência de queda, mesmo com ocorrência de picos nos anos de 1982 e 1986. Esta tendência de queda atingiu no ano de 1992 sua menor produção, quando foram desembarcadas 7.506 t (SANYO, 1998; Barthem e Goulding, 2007). No ano de 2000 a piramutaba ficou em segundo lugar na captura das espécies mais pescadas da região Norte, com 18.642 t, ficando atrás somente do curimatã (*Prochilodus nigricans*) (Almeida, 2006).

A sobrepesca é preocupante, pois se indivíduos muito jovens e com pouco peso forem capturados continuamente o crescimento do estoque será afetado em termos da biomassa final (Barthem *et al.*, 1995). Assim, a coorte não possui tempo suficiente para atingir o ótimo em peso (Sparre e Venema, 1995) nem a idade de reprodução, podendo também vir a afetar a viabilidade do estoque.

No início da década de 90 foi discutida a criação do período de defeso para a piramutaba e para avaliar, acompanhar e propor medidas de ordenamento pesqueiro para esta espécie foi criado o Grupo Permanente de Estudos sobre a piramutaba (GPE) (IBAMA, 1999). Em 2002 o período de defeso para esta espécie foi implementado, sob a Instrução Normativa n°5, de 10 de julho de 2002. A partir de então, o Ministério do Meio Ambiente publicou, entre 2002 e 2006, nove Instruções Normativas cujos principais objetivos foram: estabelecimento do período de defeso da piramutaba (que variava de setembro a dezembro), proibição da pesca com rede de arrasto na foz dos rios Amazonas e Pará durante esse período, limitou o número de embarcações para essa modalidade de pesca e definiu o tamanho da malha do saco do túnel da rede de arrasto para 100mm (MMA, 2002; Id., 2003; Id., 2004; Id., 2005; Id., 2006).

1.4 Variabilidade Genética

Os esforços de captura sobre várias espécies de peixes, entre elas a piramutaba, vêm aumentando gradativamente, tornando a explotação dos estoques comercialmente inviável e sua recuperação biologicamente difícil devido a depauperação da variabilidade genética e um número reduzido de indivíduos aptos para a reprodução.

A variabilidade genética é um componente decisivo para a sobrevivência de uma espécie a médio e longo prazo, já que é por conta dela que uma espécie está apta a se adaptar às constantes modificações do meio ambiente.

Quanto maior a diversidade genética maiores serão as chances de sobrevivência da espécie (Solé-Cava, 2001; Frankham *et al*., 2002). O nível de heterozigosidade na população está relacionado com a eficiência reprodutiva e resistência a doenças na sobrevivência das espécies (Frankham *et al*., 2002). O isolamento reprodutivo leva à diminuição do tamanho efetivo populacional e consequentemente, ao aumento das chances de deriva genética e à perda da variabilidade genética (Vrijenhoek, 1998).

Com o uso de marcadores moleculares é possível acessar a variabilidade genética de uma população e verificar se existe ou não estrutura populacional. Fatores como barreiras ambientais, comportamento reprodutivo, dispersão e os processos históricos geralmente são indicados como responsáveis pela manutenção da integridade genética em populações (Narum *et al.,* 2004).

Levando em consideração que os estoques de piramutaba vem sofrendo declínio (Barthem e Petrere, 1995; Barthem e Goulding, 1997; IBAMA, 1999; Alonso e Pirker, 2005), estudos genéticos moleculares propiciando conhecimento da estrutura populacional são de fundamental importância para se conhecer a variabilidade genética desta espécie, o que pode ser diretamente usado para se estabelecer estratégias de uso e conservação deste recurso pesqueiro.

Os marcadores moleculares podem ser utilizados não só para a definição de estoques pesqueiros e sua caracterização genética, mas também para estimar e verificar a variabilidade e estrutura genética de populações de peixes. São vários os marcadores moleculares disponíveis para os estudos filogenéticos e evolutivos intra

e interespecíficos (Avise, 2004). Sabe-se que diferentes marcadores moleculares podem apresentar taxas evolutivas distintas. Para esse trabalho, foram utilizados marcadores moleculares dominantes (região controle do DNAmt) e marcadores moleculares de microssatélites (genoma nuclear). Para a estimativa da diversidade genética por meio de marcadores microssatélites, os mesmos foram desenvolvidos e caracterizados no presente estudo.

O primeiro estudo genético para a piramutaba, feito por Formiga-Aquino (2004), analisou sequências de DNA da região controle do DNA mitocondrial, em cinco localidades do eixo Estuário/Amazonas/Solimões e foi verificado que esta espécie compõe uma única população migradora na sua calha principal. Outro estudo analisando regiões do estuário, calha e alto Solimões, com sequências da região controle do DNA mitocondrial, verificou que por mais que o número de indivíduos de piramutaba diminua quando entram nos tributários, a sua variabilidade genética permanece homogênea (Batista *et al.*, 2005).

Em função de estudos anteriores terem demonstrado que a piramutaba que habita a calha do sistema Amazonas-Solimões, sentido Leste-Oeste, constitui-se de um estoque geneticamente homogêneo (Formiga-Aquino, 2004; Batista *et al.*, 2005), é importante complementar e fortalecer o que já se tem a respeito da piramutaba e assim, entender melhor o seu ciclo de vida. Neste estudo foram analisados os parâmetros populacionais em indivíduos coletados em pontos distribuídos no sentido Norte-Sul (calha e tributários da margem esquerda e direita) de distribuição geográfica da espécie. Este desenho amostral visa testar a hipótese nula de não existir divergência genética entre as populações de *Brachyplatystoma vaillantii* no sentido Norte-Sul da sua distribuição geográfica na bacia Amazônica brasileira.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

- Analisar a variabilidade genética da piramutaba (*Brachyplatystoma vaillantii)* por meio de sequências de DNAmt e marcadores moleculares microssatélites em quatro pontos na Amazônia, incluindo-se dois pontos da calha (Manaus e Tefé) e pontos em afluentes de cada margem (rios Japurá e Madeira), comparando-se assim, parâmetros populacionais no sentido Norte-Sul de distribuição geográfica da espécie.

2.2 Objetivos específicos

- Estimar e comparar a variabilidade genética em populações de *Brachyplatystoma vaillantii* por meio de DNAmt e microssatélites nos pontos de coleta*;*
- Construir uma biblioteca genômica enriquecida com regiões de microssatélites para a piramutaba (*Brachyplatystoma vaillantii);*
- Isolar e caracterizar marcadores moleculares microssatélites para a piramutaba (*Brachyplatystoma vaillantii)* e disponibilizá-los para a identificação e caracterização de estoque pesqueiro e estudos de genética populacional dessa espécie;
- Testar a presença de fluxo gênico entre as localidades;
- Comparar a performance dos dois marcadores: DNAmt e microssatélites.

CAPÍTULO I

Isolamento e caracterização de locos microssatélites para a piramutaba (*Brachyplatystoma vaillantii*, Siluriformes: Pimelodidae*)*, um dos bagres migradores mais importantes comercialmente da Bacia Amazônica

Conservation Genet Resour
DOI 10.1007/s12686-009-9084-x

TECHNICAL NOTE

Isolation and characterization of microsatellites loci for "piramutaba" (*Brachyplatystoma vaillantii*, Siluriformes: Pimelodidae), one of the commercially most important migratory catfishes in the Amazon Basin

Fabiola C. Rodrigues · Izeni P. Farias ·
Jacqueline S. Batista · José Alves-Gomes

Received: 14 August 2009 / Accepted: 20 August 2009
© Springer Science+Business Media B.V. 2009

Resumo A piramutaba (*Brachyplatystoma vaillantii*) é um dos maiores e mais importantes bagres migradores da bacia Amazônica. Devido à sua importância histórica, comercial, essa espécie se encontra em sobrepesca. Foram caracterizados 15 marcadores microssatélites polimórficos a fim de responder questões a respeito da biologia e conservação dessa espécie. O número de alelos variou de 4 a 26 por loco, com uma média de 11.33 alelos/loco, em 36-44 indivíduos testados. A heterozigosidade observada e esperada variou de 0.25532 a 0.97778 e de 0.30176 a 0.95281, respectivamente. Todos os microssatélites se encontram em equilíbrio de Hardy-Weinberg e não foi verificado desequilíbrio de ligação. A transferibilidade destes marcadores foi testada em outras espécies de *Brachyplatystoma* evidenciando de sete a 12 locos polimórficos por espécie. Os resultados indicam que estes marcadores são adequados para estudos genéticos e aplicáveis para o manejo e conservação da piramutaba, e de outras espécies de *Brachyplatystoma*.

Palavras-chave: Piramutaba, Microssatélites, *Brachyplatystoma vaillantii,* Bagre migrador, Amazônia

I.1 Introdução

A piramutaba (*Brachyplatystoma vaillantii*) é um dos grandes bagres migradores pertencente à família Pimelodidae (Nelson 2006). No curso do ciclo de vida, essas espécies realizam grandes migrações para se reproduzirem e estudos genéticos preliminares indicam a existência de um único estoque em toda bacia (Batista et al 2004). A hipótese de migração sugerida é que cardumes de piramutaba adultos sobem o rio para desovar na região oeste do rio Amazonas, as larvas são levadas passivamente pela correnteza do rio em direção ao estuário, e durante o ciclo de vida os bagres também podem regressar ao estuário (Barthem e Goulding 2007). Esta espécie ocorre em maior abundância nos canais dos tributários do rio Solimões-Amazonas e na foz amazônica (Barthem e Goulding 1997).

A piramutaba é uma das espécies mais capturadas pela frota industrial e artesanal na Amazônia, que a exporta para os mercados internacionais e movimenta milhões de dólares (Almeida 2006; Barthem e Goulding 2007). Porém, acompanhamentos de desembarque pesqueiro mostram que a pesca da piramutaba vem sofrendo declínio ao longo dos anos e está em sobrepesca de crescimento devido à diminuição de seu tamanho constante nas capturas (Alonso e Pirker 2005). Pelo fato desta espécie ser uma importante fonte de renda para milhares de famílias na Amazônia, e dado a excessiva captura, é necessário ampliar as informações a respeito da biologia, do ciclo de vida e da diversidade genética. Essas informações são cruciais para o manejo dos estoques.

Com marcadores moleculares adequados, como são os microssatélites, podemos fornecer informações da diversidade genética de populações naturais de piramutaba, e gerar dados para o uso do manejo sustentável e para planos de conservação. Por essa razão, nós isolamos e caracterizamos 15 marcadores microssatelites polimórficos para a piramutaba, os quais foram testados também em seis outras espécies de *Brachyplatystoma.*

O DNA genômico total foi extraído de um *pool* de sete indivíduos coletados no município de Tefé (Amazonas, Brasil). Os tecidos foram dissolvidos e digeridos com proteinase K/SDS e seguiu a extração fenol-clorofórmio (Sambrook et al. 1989). Para a construção da biblioteca genômica enriquecida de microssatelites utilizamos o protocolo de Tenzer et al. (1999) com modificações de Farias et al. (2003). O DNA enriquecido foi ligado ao vetor PCR II-TOPO (Invitrogen) e transformados em bactérias competentes de *Escherichia coli* (Promega) por choque térmico. O material foi inoculado *overnight* em placas de Petri com meio sólido LB e o antibiótico Ampicilina 100µL/mL. As colônias transformadas foram selecionadas e transferidas para uma placa com 96 *wells* contendo meio *circle grow* 1x e Ampicilina para crescerem por 16 horas. Para confirmar se as colônias continham o inserto foi feito um PCR com o *primer* M13, os clones positivos foram purificados com o kit GFX (GE *Healthcare*) e sequenciados com os *primers* M13 usando o kit DYEnamic ET *dye terminator* (GE Healthcare) em analisador automático de DNA MegaBACE 1000 (GE Healthcare).

Foram sequenciados 387 clones positivos e destes, 222 continham regiões com microssatélites. Destes, 208 clones positivos tinham boa qualidade, e 30 clones foram escolhidos e *primers* foram desenhados com o auxílio do programa PRIMER 3.0 (Rozen e Skaletsky 2000). Em cada *primer forward* adicionamos uma cauda M13 universal na extremidade 5' conforme descrito por Schuelke (2000) para o anelamento da sequência M13 marcada com fluorescência FAM.

As genotipagens dos PCRs foram realizadas numa reação de 10µL o qual incluiu 1,20µL de DNA (10ng/µL), 2,5µL de dNTP (0,25 mM de cada dNTP) 1,0µL de tampão 10x (10mM Tris-HCl, 50mM KCl, 1mM EDTA), 0,30µL de MgCl2 (50mM), 0,6µL de Taq DNA Polimerase 1U/µL (Biotools), 0,6µL de *primer* F (5µM), 1,2µL de *primer* R (5µM), 0,6µL de *primer* M13 FAM (5µM). Esse mix foi levado ao termociclador (Eppendorf) com a seguinte programação: uma desnaturação inicial (92˚C/1 min), 25 ciclos de 94˚C/20 s; 52-64˚C (tabela 1)/40 s; 68˚C/35 s; seguido de 20 ciclos para anelamento do *primer* FAM por 93˚C/20 s; 53˚C/30 s; 72˚C/35 s, e uma extensão final de 72˚C/30min. As genotipagens foram feitas no MegaBACE 1000 (GE *Healthcare*). O tamanho e a contagem dos alelos foram realizados com o auxílio do size *standard* ET-400 ROX (GE *Healthcare*) e analizados no *Fragment Profiler* 1.2 (GE *Healthcare*).

Dos 30 pares de *primers* desenhados, 15 foram otimizados. A caracterização dos microssatélites foi realizada em aproximadamente 48 indivíduos coletados no município de Tefé, Amazonas, Brasil (Tabela 1). A heterozigosidade observada e esperada e o desequilíbrio de ligação entre os locos foi inferida com o programa Arlequin 3.11 (Excoffier et al. 2005) e não mostraram desvios após a correção de Bonferroni (Rice 1989) (Tabela 1), exceto o loco BV_8. A heterozigosidade observada variou de 0.25532 a 0.97778 e a esperada variou de 0.30176 a 0.95281. O número de alelos variou de quatro (BV_18) a 26 (BV_8) por loco, numa média de 11,33 alelos/loco. Para verificar a presença de alelos nulos foi utilizado o programa Microchecker 2.2.3 (Van Oosterhout et al. 2004), e uma potencial presença de alelos nulos foi inferida nos locos BV_6 e BV_8. Portanto esses dois locos devem ser usados com cautela em estudos populacionais.

Fizemos a transferibilidade para as seis outras espécies do gênero *Brachyplatystoma* (Tabela 2). A amplificação ocorreu satisfatoriamente nas demais espécies e o número de alelos encontrados variaram de dois a sete por loco. Os 15 locos caracterizados mostraram serem marcadores genéticos úteis para estudos genéticos de *Brachyplatystoma vaillantii* e de estudos similares de outras espécies de *Brachyplatystoma*.

Tabela 1: Caracterização de 15 locos microssatélites em 36-48 indivíduos de piramutaba (*Brachyplatystoma vaillantii*) do município de Tefé, Amazonas, Brasil.

Acesso GenBank	Locos	Primer (5' – 3')	Tipo de repetição	T_a (°C)	Pares de base (bp)	*N*	N_A	*Ho*	*He*	*P*
GQ468587	BV_5	F-CCTCAGTGACCTGCAGAGG R-ACCCCACAACCTCCACCT	$(GA)_7$ ca $(GA)_7$ca $(GA)_5$	60	209-227	36	7	0.667	0.769	0.319
GQ468588	BV_6	F-CACATCAACAGTGCCTTGC R-AGACAGGCCGTGAACCTG	$(CA)_{14}$	52	273-293	40	10	0.725	0.857	0.697
GQ468589	BV_8	F-TAGCGGCATCACCATCATC R-TTTCCTGCAGCTTGCACAC	$(TC)_{25}$	60	163-249	45	26	0.756	0.953	0.000*
GQ468590	BV_10	F-AGAATCGCACGTGTTCTGC R- CAGTCAGCCAAGAGGAAATG	$(TC)_{24}$	52	213-237	44	13	0.909	0.909	0.900
GQ468591	BV_11	F- TGGAGCTGTTGGATGTGTC R- ATGACTGAGCTGCCAGGACT	$(CT)_9$ gt $(CT)_4$ $(CA)_{12}$	64	149-189	45	15	0.978	0.903	0.538
GQ468592	BV_13	F-CCTAGTGCCTATGGAGCCTCT R-CATCTGACGAGAGGCGAGT	$(CT)_{25}$	52	173-211	46	18	0.913	0.915	0.088
GQ468593	BV_17	F- CGGGTTGTGGATATGGTTC R- CCGCAAAGACACACAAAGC	$(AG)_{10}$ gg $(AG)_{12}$	60	195-229	42	12	0.833	0.881	0.013
GQ468594	BV_18	F-CCACCCACCCACCTGTTA R-TGTTTCCAAGGCAACCAC	$(AG)_5$ cg $(AG)_5$ cg $(AG)_7$ at $(AG)_6$	52	171-185	47	4	0.255	0.302	0.060
GQ468595	BV_20	F-TGCACAGATGAGGCAGCTA R-CCGGTTTCCTCTTACAGTCC	$(AC)_{11}$	52	142-154	48	9	0.729	0.837	0.057
GQ468596	BV_21	F-CGGACCATACAGCAAAACG R-CTCAGTCTGTCCCACAAGCA	$(TC)_8$ tg $(TC)_7$	53	162-182	46	9	0.783	0.812	0.512
GQ468597	BV_23	F-GAGTCTGTCGTCTGGGTGGT R-AGGTGCCCAGTCAGCATC	$(AG)_8$	64	170-196	45	8	0.756	0.758	0.023
GQ468598	BV_25	F-TCACTGAGGTTCAGGTTAGGG R-CAGCCACCAACATTTGTC	$(TG)_{10}$	54	173-215	46	15	0.891	0.892	0.145
GQ468599	BV_27	F-CTGCTGGTTTCTCATTCAGC R-TGACCTAGCGAGAGTACCTG	$(AG)_7$ aagcagaa $(AG)_5$ aa $(AG)_7$	64	177-199	46	7	0.609	0.635	0.042
GQ468600	BV_29	F-CCCACACAGAGACCATTATC R-GGCTGAGCTGAATGAAGCA	$(GA)_7$ a $(AG)_5$ aa $(AG)_7$	64	274-304	40	12	0.875	0.826	0.489
GQ468601	BV_30	F-CAGACAGAGACCTAGAAAGAGG R- CCGCCATCTCTTTCTCACTT	$(TG)_7$	54	174-182	45	5	0.511	0.591	0.172

T_a, Temperatura de anelamento; *N*, número de indivíduos testados; N_A,número de alelos; H_O, heterozigosidade observada; H_E, heterozigosidade esperada. *Significante após correção de Bonferroni

Tabela 2: Amplificação heteróloga com *primers* de *Brachyplatystoma vaillantii* em outras espécies de *Brachyplatystoma.*

Locos	*B.platynemum* N=4	N_A	*B.juruense* N=4	N_A	*B.tigrinum* N=4	N_A	*B.capapretum* N=4	N_A	*B.filamentosum* N=4	N_A	*B.rousseauxii* N=4	N_A
BV_5	243	1	245	1	-		-		253	1	-	
BV_6	219-231	3	-		-		-		-		-	
BV_8	175-181	4	179-201	3	179-201	3	187	1	-		201-205	2
BV_10	239-247	3	235-247	5	259-273	2	259	1	255-293	5	267-293	5
BV_11	192-206	7	186-192	3	184-202	2	184	1	196-200	3	182-188	3
BV_13	212-228	4	162-232	5	230-232	2	170-222	3	158-190	4	146-198	7
BV_17	216-242	4	212-228	2	212	1	212	1	218-228	3	218-234	7
BV_18	185-201	6	189-197	5	175-189	3	171-199	3	175-189	4	177-189	3
BV_20	170	1	168-178	3	144-176	4	144-176	2	144-172	2	144-186	3
BV_21	184-198	3	184-198	3	182-196	4	184-196	2	184-196	2	184-196	2
BV_23	201-207		201-203		199-237		197-237		221		219-231	
BV_25	211-237	3	211	1	209-231	5	211-229	2	205-229	3	197-239	6
BV_27	207		205		205-227		205		203-205		213-239	
BV_29	-		-		-		-		-		-	
BV_30	199	1	149-199	3	147-197	3	151-197	3	149-199	4	149-197	3

N, número de indivíduos testados; N_A ,número de alelos; -, produto não amplificado

CAPÍTULO II

Estimativa da variabilidade genética de piramutaba (*Brachyplatystoma vaillantii*) por meio da região controle (*D-loop*) do DNA mitocondrial e de marcadores microssatélites em quatro localidades da Amazônia

II.1 INTRODUÇÃO

A piramutaba (*Brachyplatystoma vaillantii*) é um bagre que nada próximo ao fundo dos rios de águas turvas, tornando-se difícil de ser observado (Barthem, 1990). Ocorre principalmente nos tributários de água branca do rio Solimões-Amazonas, preferencialmente no canal desses rios e na foz amazônica (Barthem e Goulding, 1997). Possui cabeça larga, coberta por uma fina camada de pele e focinho fortemente deprimido; olhos pequenos e dorsolaterais; barbilhões da maxila superiores bem longos; nadadeira caudal em forma de furca com raios laterais longos e filamentosos; base da nadadeira adiposa mais longa que a base da nadadeira anal, a coloração cinza-escuro na região dorsal e claro na região ventral, dentes deprimidos e dispostos em bandas na maxila superior e na maxila inferior (Barthem, 1990; Barthem e Goulding, 1997; Alonso e Pirker, 2005). A maxila superior é protuberante e os acúleos peitorais e dorsal não encaixados na pele do animal são bem desenvolvidos. O tamanho máximo registrado é de 105cm (Burgess,1989; Barthem e Goulding, 1997) e 10 kg (Fabré e Barthem, 2005).

Apesar da grande importância para o comércio nacional e internacional, o seu ciclo de vida é pouco conhecido e estudado (Bayley e Petrere, 1989; Barthem, 1990; Barthem e Goulding, 1997). Levantamentos de captura experimental e de dados merísticos e morfométricos, propuseram que a piramutaba é capaz de migrar aproximadamente 4.500 quilômetros para completar seu ciclo de vida (Barthem e Goulding (1997; Id., 2007). Mesmo apresentando uma ampla distribuição geográfica e uma enorme importância econômica para a pesca industrial, dados de captura mostram que essa espécie encontra-se em sobre-explotação (Barthem, 1990; Barthem e Petrere, 1995; Barthem e Goulding, 1997; Alonso e Pirker, 2005).

Em função dos sinais de sobre-explotação detectados para a piramutaba, estudos genéticos moleculares são de fundamental importância para se conhecer a variabilidade genética que, por sua vez, pode ser de extrema utilidade para se estabelecer estratégias de uso e conservação deste recurso pesqueiro. Os marcadores moleculares podem ser utilizados não só para a definição de estoques pesqueiros e sua caracterização genética, mas também permitir estimar e verificar a

variabilidade e estrutura genética de populações de peixes. Desta forma, a análise da região controle do DNA mitocondrial da piramutaba e de marcadores microssatélites pode contribuir de forma significativa para o entendimento do ciclo de vida desta espécie na Amazônia e sua conservação.

II.1.1 DNA Mitocondrial (Região Controle)

O genoma mitocondrial (Figura 1) é uma molécula de DNA circular presente em múltiplas cópias na matriz interna da mitocôndria. O DNA mitocondrial (DNAmt) de vertebrados não apresenta sequências espaçadoras entre os genes ou *íntrons* e compreende 37 genes, dos quais 13 codificam proteínas, dois codificam RNAs ribossomais (12S e 16S), 22 codificam RNAs transportadores; além desses genes, o DNAmt possui uma região não codificante chamada região controle (Wolstenholme, 1992; Meyer, 1993; Boore, 1999).

A região controle (D-*loop* ou alça D) é responsável pela regulação da replicação e da transcrição de todo o DNAmt. A replicação tendo início nesta região é realizada por deslocamento de uma fita em relação à outra, formando uma alça, denominada *D-loop*. Em peixes, a região controle apresenta cerca de 1.100 pares de bases (pb) um domínio conservado central e duas porções ricas em A/T (extremamente variáveis) nas extremidades 5` e 3` (Meyer, 1993).

Entre as vantagens que tornam o DNAmt uma ferramenta poderosa e extensivamente usada para estudos evolutivos pode-se citar: elevado número de cópias por célula; alta taxa evolutiva ($5,7x10^{-8}$ substituição por sítio por geração), maior do que genes codificadores de proteínas do genoma nuclear; ausência de recombinação e modo de herança materna (Brown, 1980; Brown *et al.*, 1982; Avise , 1994; Avise, 2004). A elevada taxa de substituição de nucleotídeos nas mitocôndrias pode estar relacionada com o excesso de resíduos metabólicos, ausência ou deficiência de mecanismos de reparo e pela baixa eficiência na replicação (Li, 1997).

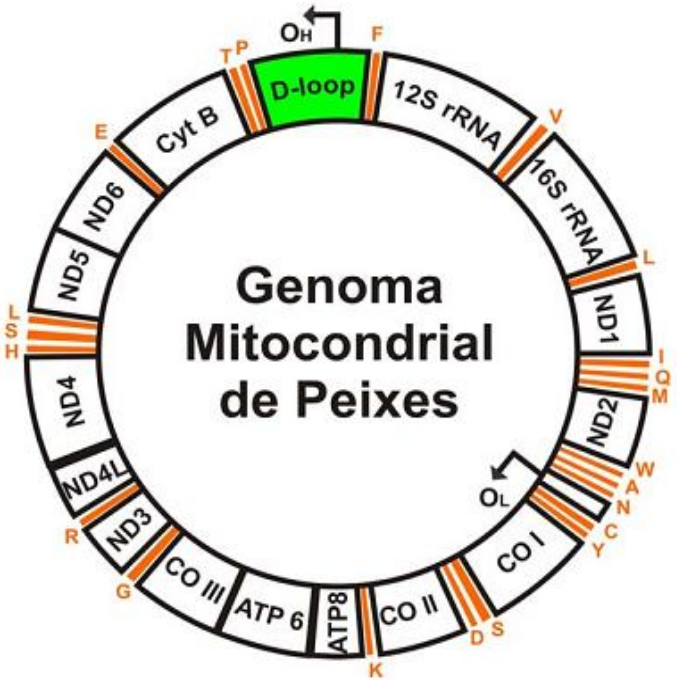

Figura 1: Esquema gráfico do genoma mitocondrial de peixes, destacando a região controle (*D-loop*) (Modificado de Meyer, 1993). Secções em branco (exceto o 12S e 16S, que codificam RNAs ribossomais) representam os genes codificadores de proteínas, as secções em laranja correspondem aos genes que codificam RNAs transportadores e a região em verde corresponde a região controle.

Vários estudos baseados no sequenciamento do DNAmt vêm sendo realizados com peixes. Grande parte desses trabalhos caracteriza a variabilidade genética ao longo da distribuição geográfica de uma espécie e revelam a existência ou não de estrutura populacional. Estudos com essa abordagem já foram feitos com vários peixes amazônicos, incluindo: *Mylesinus paraschomburgkii* (Porto, 1999), *Hypopygus lepturus* (Schmitt, 2005), *Prochilodus lineatus* (Sivasundar *et al.,* 2001), *Arapaima gigas* (Hrbek *et al*., 2005), *Potamotrygon* spp. (Toffoli, 2006), *Brachyplatystoma rousseauxii* (Batista e Alves-Gomes, 2006), *Colossoma macropomum* (Santos *et al.,* 2007), *Cichla* spp. (Willis *et al*., 2007), *Carnegiella strigata* (Schneider, 2007), *Symphysodon* spp. (Farias e Hrbek, 2008), *Fluviphylax* spp. (Souza, 2008), *Pterophyllum* spp. (Meliciano, 2008), *Semaprochilodus insignis* (Batalha, 2009), *Prochilodus nigricans* (Machado, 2009), *Nannostomus eques* (Terencio, 2009).

Para a piramutaba, uma alta variabilidade genética foi encontrada no eixo Estuário/Amazonas/Solimões utilizando sequências da região controle do DNAmt, sendo que esta espécie compõe uma única população migradora na sua calha principal (Formiga-Aquino, 2004). Contudo, os trabalhos genéticos que se têm até o momento para espécies do gênero *Brachyplatystoma* foram sempre feitos analisando-se a variabilidade genética no sentido leste-oeste (estuário-cabeceiras).

II.1.2 Marcadores Moleculares Microssatélites

Marcadores microssatélites ou SSR (*Simple Sequence Repeats*) ou STR (*Short Tandem Repeat*) são regiões encontradas ao longo do DNA que consistem de pequenas sequências com 1 a 6 nucleotídeos de comprimento, repetidas em *tandem* (em "fila") (Tautz e Renz, 1984; Rafalski *et al,.* 1996). Os marcadores microssatélites constituem a classe de marcadores moleculares mais polimórficos conhecidas atualmente. Pelo fato de serem altamente polimórficos e principalmente co-dominantes, são os preferidos para estudos em níveis genéticos, ecológicos e populacionais (Goldstein e Pollock, 1997).

De acordo com o número de nucleotídeos repetidos, os microssatélites podem ser classificados como: mononucleotídeos, dinucleotídeos, trinucleotídeos, tetranucleotídeos, pentanucleotídeos e hexanucleotídeos. Segundo Goldstein e Schlötterer (1999), os microssatélites são organizados em quatro classes: microssatélites perfeitos, microssatélites imperfeitos, microssatélites interrompidos, microssatélites compostos, da seguinte maneira:

- <u>Microssatélites perfeitos</u>: a sequência nucleotídica não apresenta nenhuma interrupção.

Ex: CTCTCTCTCTCTCTCTCTCT

- <u>Microssatélites imperfeitos</u>: a sequência nucleotídica apresenta uma pequena interrupção.

Ex: CTCTCTCTC**A**CTCTCTCT

- Microssatélites interrompidos: uma outra sequência interrompe o microssatélite.

Ex: CTCTC**AAAA**CTCTCT

- Microssatélites compostos: dois microssatélites, com motivos de repetição diferentes, se encontram um ao lado do outro.

Ex: CTCTCTCTCT**GATGATGATGATGAT**

Os microssatélites possuem uma taxa de mutação superior em relação a outras regiões do genoma que varia de 10^{-3} a 10^{-6} por loco por gameta e por geração (Schlötterer, 2000). Essas mutações são causadas por alterações no número das unidades de repetições e podem ser explicadas por duas hipóteses: escorregão (*slippage*) da DNA polimerase e *crossing-over* desigual.

O escorregão da DNA polimerase (Levinson e Gutman, 1987b; Tautz e Schlötterer, 1994) ocorre durante o mecanismo de replicação em regiões do DNA que contém sequências curtas de repetição, ocasionando o pareamento errado das fitas e originando a formação de *loops*. Esses *loops,* dependendo da fita onde se encontram, podem resultar numa adição ou deleção da unidade de repetição durante a replicação do DNA. No *crossing-over* desigual (Jeffreys *et al*., 1994; Brown *et al*., 1996), as unidades de repetição ocasionam o pareamento errôneo dos cromossomos homólogos durante o quiasma resultando na formação de uma cromátide com duplicação e outra com deleção.

Existem três modelos baseados em estimativas das frequências alélicas (F_{st} e R_{st}) que explicam o processo mutacional dos microssatélites (Selkoe e Toonen, 2006):

- IAM (Modelo de Alelo Infinito): todo evento de mutação origina um alelo novo cujo tamanho é independente do alelo original. As mutações resultam na perda ou ganho de uma ou mais repetição, gerando um estado alélico nunca encontrado anteriormente. O cálculo do F_{st} usa o modelo dos alelos infinitos, assumindo que qualquer alelo tem a mesma relação evolutiva com qualquer um dos alelos alternativos.

- SMM (Modelo de Mutação Gradativo - *Stepwise*)*:* admite que a mutação entre alelos resulta na perda ou ganho de uma única unidade de repetição, e os alelos poderiam variar através de estados alélicos anteriormente presente na população. O cálculo do R_{st} é baseado neste modelo.

- TPM (Modelo Duas Fases): apesar de aplicável aos microssatélites, o SMM muitas vezes não se verifica. O TPM é uma tentativa de abordar a evolução de microssatélites com maior complexidade. Consequentemente o processamento matemático torna-se muitas vezes mais complexo. Até o momento não existem estimadores de diferenciação genética baseados no TPM amplamente aceitos

Esses marcadores microssatélites possuem características favoráveis, como: são abundantes e uniformemente distribuídos por todo o genoma; são tipicamente co-dominantes; são altamente multialélicos, apresentando o maior conteúdo informativo por locos entre todas as classes de marcadores moleculares; são obtidos através de amplificação por PCR; são automatizáveis em sistemas multiplex, o que permite avaliar rapidamente um grande número de indivíduos para um grande número de locos em pouco tempo; podem ser transferidos dentro de espécies de um mesmo gênero, devido à alta homologia encontrada nas sequências flanqueadoras (Ferreira e Grattapaglia, 1996; Chase *et al*., 1996).

Trabalhos utilizando os marcadores moleculares microssatélites na região Amazônica ainda são incipientes, dentre os quais destaca-se a análise utilizando concomitantemente marcadores microssatélites e DNA mitocondrial em populações de pirarucu (*Arapaima gigas*), a fim de delimitar áreas para a conservação da variabilidade genética desta espécie na Amazônia (Hrbek *et al*., 2007). Outras pesquisas relevantes têm desenvolvido marcadores microssatélites para espécies de peixes amazônicos a fim de serem utilizados em trabalhos direcionados a genética da conservação e de populações de espécies exploradas, tais como o pirarucu (Farias *et al*., 2003), para espécies de peixe ornamental, como o acará-disco (*Symphysodon discus*) (Amado *et al*., 2008), *Paracheirodon axelrodi* (Beheregaray *et al*., 2004a), *Nannostomus unifasciatus* (Beheregaray *et al*., 2004b), *Carnegiella marthae* (Beheregaray *et al.,* 2006), para o tambaqui (*Colossoma*

macropomum) (Santos *et al*., 2009) e para o aruanã (*Osteoglossum bicirrhosum*) (da Silva *et al*., 2009).

Os locos microssatélites desenvolvidos no presente trabalho (Capítulo I) foram utilizados para o estudo de análise populacional da piramutaba (*Brachyplatystoma vaillantii)* em quatro localidades da Amazônia, sendo dois pontos na calha do rio Solimões-Amazonas (Manaus e Tefé) e em dois tributários de cada margem do rio Madeira (Porto Velho) e rio Japurá (Vila Bittencourt). Devido ao tempo que se tinha para a conclusão deste projeto, foram escolhidos seis locos para os estudos populacionais.

Neste estudo, foram analisados os parâmetros genéticos populacionais no sentido Norte-Sul (calha e tributários da margem esquerda e direita) de distribuição geográfica da espécie por meio de sequências da região controle do DNA mitocondrial e de marcadores moleculares microssatélites, os quais foram analisados sob a hipótese nula de não existir divergência genética entre as populações de piramutaba dos diferentes pontos amostrados.

II.2 MATERIAL E MÉTODOS

II.2.1 Amostragem

Os indivíduos foram coletados nos desembarques pesqueiros advindos da pesca artesanal nos arredores das cidades (Figura 2) de Tefé (rio Solimões), Manaus (rio Solimões), Porto Velho (rio Madeira) e Vila Bittencourt (rio Japurá), totalizando 161 espécimens. As coletas foram realizadas com a autorização e licença do IBAMA n° 14278-1 e n° 130. Foram retiradas amostras do tecido muscular e barbilhão de cada exemplar e acondicionados em frascos com etanol 100%

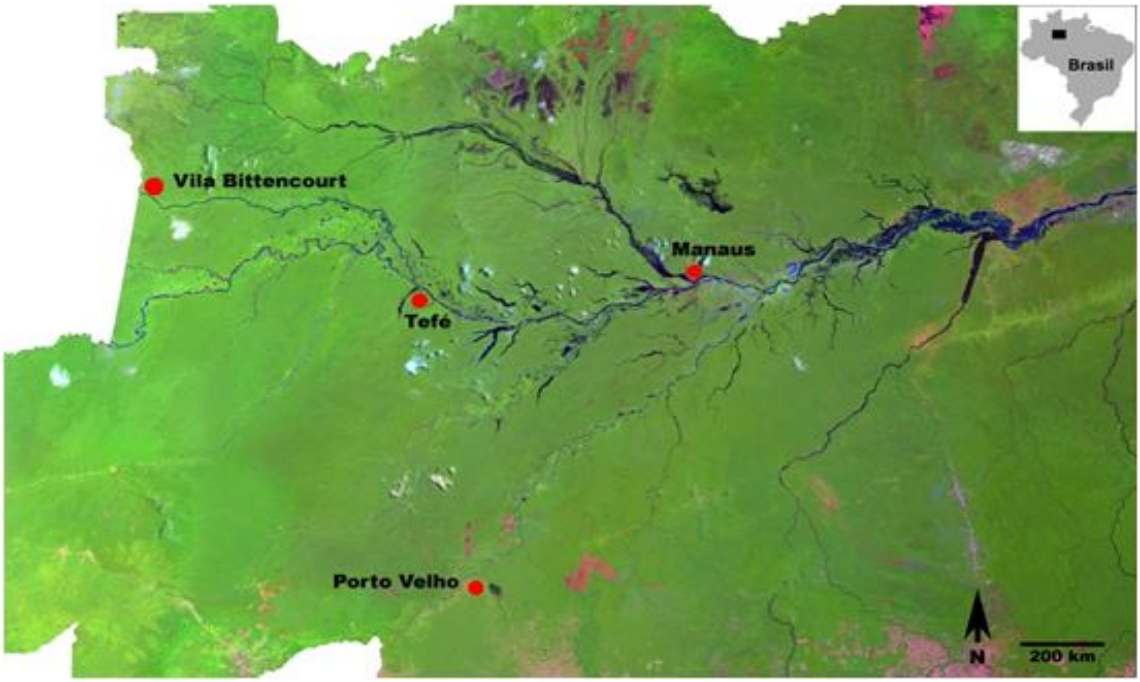

Figura 2: Locais de coleta: Vila Bittencourt = rio Japurá; Tefé = rio Solimões; Manaus = rio Solimões; Porto Velho = rio Madeira.

II.2.2 Extração de DNA e amplificação dos fragmentos

A extração do DNA total (genômico e mitocondrial), a partir do tecido muscular ou do barbilhão preservado em álcool, foi realizado seguindo o protocolo descrito por Sambrook *et al.* (1989). Após a verificação do DNA em gel de agarose 0,8% foi realizada a amplificação do fragmento de interesse por meio da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) (Mullis e Faloona, 1987).

II.2.3 DNA Mitocondrial (Região Controle)

II.2.3.1 Amplificação e purificação dos fragmentos

Para a amplificação da região controle (Figura 3) foram utilizados os seguintes oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) (Sivasundar *et al.,* 2001):

F-TTF: 5'- GCC TAA GAG CAT CGG TCT TGT AA – 3'

F-12R: 5'- GTC AGG ACC ATG CCT TTG TG – 3'

Para a reação de PCR foram adicionados em um tubo de 0,2mL: 2 µL de DNA total (30 ng/µL); 2,5 µL de Tampão 10X (10mM Tris-HCl, 50mM KCl, 1mM EDTA); 3 µL de dNTP (0,25 mM de cada base); 1 µL de $MgCl_2$ (50mM), 2 µL de cada primer (5 µM); 1 µL de *Taq DNA Polimerase* (1 U/ µL); e 11,5 µL de água Milli-Q, totalizando 25 µL. Em seguida os tubos foram levados ao termociclador para uma amplificação de 30 ciclos com o seguinte perfil de temperatura: 94ºC por 2min, 53 ºC por 1 min, 72 ºC por 2 min e uma extensão final a 72 ºC por 5 minutos. Posteriormente, as amostras amplificadas foram purificadas com PEG 20% (*Polyethylene Glycol* 8000), lavadas duas vezes com etanol 80% e ressuspendidas em 100 µL de água Milli-Q.

Figura 3: Esquema de anelamento dos *primers* que foram utilizados para a amplificação da região controle.

II.2.3.2 Sequenciamento do DNA, edição e alinhamento das sequências

A reação de sequenciamento foi feita conforme o proposto por Sanger *et al.*, (1977) utilizando o kit *DYEnamic ET Terminator Cycle Sequence* (*GE HealthCare.* Em cada poço (*well)* da placa foram acrescentados: 3 µL produto de PCR purificado; 2 µL de cada *primer* (5 µM) (os mesmos utilizados para o PCR*)* em reações separadas; 3 µL de premix (kit) e 2 µL de água Milli-Q. Essas reações foram processadas em termociclador por 30 ciclos, a 50°C. Os fragmentos foram precipitados com etanol e formamida. Posteriormente, foi realizada a leitura automática do fragmento no sequenciador automático de DNA MegaBACE 1000 (*GE HealthCare*).

As sequências foram alinhadas no programa *Clustal W* (Thompson *et al.*,1994), incluso no programa BioEdit 7.0.8.0 (Hall, 1999). Foram acrescentados *gaps* (-) nas sequências que apresentaram inserções e deleções (*indels*). A edição final das sequências foi realizada manualmente em conferência com o eletroferograma destas.

II.2.3.3 Caracterização da região controle de piramutaba

Foi realizada a caracterização da região controle do DNAmt de piramutaba, com o auxílio dos programas Arlequin 3.11 (Excoffier, 2005) e DNAsp 4.0 (Rozas *et al.*,2003), onde foram analisados os sítios polimórficos e a composição nucleotídica. Para verificar a possível existência de saturação entre o número de transição e transversão *versus* a distância genética foi usado o programa Dambe 5.0.80 (Xia e Xie, 2001).

II.2.3.4 Análise da diversidade genética

A diversidade haplotípica foi estimada nos programas Arlequin 3.11 (Excoffier, 2005) e DnaSP 5.0 (Librado e Rozas, 2009). Foram realizados os testes de neutralidade seletiva, *D* de Tajima (Tajima, 1989) e o *Fs* de Fu (Fu, 1997).

II.2.3.5 Análise de estrutura populacional

Para verificar a possível existência de populações estruturadas de piramutaba entre rios ou entre calha e tributários e avaliar o grau de variabilidade genética dentro e entre populações foi feita uma Análise de Variância Molecular (AMOVA) (Excoffier *et al*., 1992) inclusa no programa Arlequin 3.11 (Excoffier *et al.,* 2005). O índice de fixação *Φst* foi utilizado para verificar a presença de isolamento genético por distância através do Teste de Mantel (1967), também no programa Arlequin 3.11 (Excoffier *et al.,* 2005). Tanto para a AMOVA quanto para o Teste de Mantel foram simuladas com 10.000 permutações. A correção de Bonferroni foi utilizada para todas as comparações múltiplas, para evitar o "erro do tipo um" (a rejeição da hipótese nula, sendo a mesma verdadeira), tendo em vista que várias comparações podem subestimar os valores de probabilidade. Também foi feito o gráfico de distribuição *mismatch* (*mismatch distribution)* no programa DnaSP 5.0 (Librado e Rozas, 2009) para verificar sinais de uma expansão demográfica.

II.2.3.6 Análises dos haplótipos

A construção de uma rede de haplótipos para verificar a genealogia entre os haplótipos foi realizada no programa TCS 1.2.1 (Clement *et al*., 2000). Foi gerada uma árvore de distância de Evolução Mínima (*Minimum Evolution*-ME) sem raiz no Programa Mega 3.0 (Kumar *et al*., 2004).

II.2.4 Marcadores moleculares microssatélites

II.2.4.1 Amplificação e genotipagem dos fragmentos

Para a PCR das análises populacionais foram escolhidos seis locos (*primers*) desenvolvidos por Rodrigues *et al*. (2009) (Capítulo I) que estão mostrados Tabela 1, onde é possível também verificar o tipo de repetição, a temperatura de anelamento e o tamanho do fragmento.

Tabela 1: Locos de microssatélites de piramutaba desenvolvidos no presente estudo e escolhidos para análises populacionais.

Locos	*Primer (5' – 3')*	Tipo de repetição	T_a (°C)	Pares de base (bp)
BV_6	F-CACATCAACAGTGCCTTGC	$(CA)_{14}$	52	273-293
	R-AGACAGGCCGTGAACCTG			
BV_17	F-CGGGTTGTGGATATGGTTC	$(AG)_{10}$ gg $(AG)_{12}$	60	195-229
	R-CCGCAAAGACACACAAAGC			
BV_21	F-CGGACCATACAGCAAAACG	$(TC)_8$ tg $(TC)_7$	53	162-182
	R-CTCAGTCTGTCCCACAAGCA			
BV_23	F-GAGTCTGTCGTCTGGGTGGT	$(AG)_8$	64	170-196
	R-AGGTGCCCAGTCAGCATC			
BV_29	F-CCCACACAGAGACCATTATC	$(GA)_7$ a $(AG)_5$ aa $(AG)_7$	64	274-304
	R-GGCTGAGCTGAATGAAGCA			
BV_30	F-CAGACAGAGACCTAGAAAGAGG	$(TG)_7$	54	174-182
	R- CCGCCATCTCTTTCTCACTT			

$T_{a=}$ Temperatura de anelamento

Para a reação de PCR foram adicionados em um tubo de 0,2mL: 1,0 µL de DNA total (10ng/µL); 1,0 µL de Tampão 10X (10mM Tris-HCl, 50mM KCl, 1mM EDTA); 2,5µL de dNTP (0,25 mM de cada dNTP); 0,30 µL de $MgCl_2$ (50mM); 0,6 µL do *primer* F (5µM); 1,2 µL do *primer* R (5µM); 0,6 µL de *primer* M13 FAM (5µM); 0,5 µL de *Taq DNA Polimerase* (1 U/ µL); 1,0 µL de BSA (Soro Albumina Bovina) (2,5ng/ µL) e 1,3 µL de água Milli-Q, totalizando um volume fial de 10 µL. Esse mix foi levado ao termociclador Eppendorf e tiveram uma desnaturação inicial (92ºC/1 min), 25 ciclos de 94ºC/20 s; o anelamento dos *primers* variou de 52-64ºC dependendo do *primer* (Tabela 1) por 40 s; 68ºC/35 s; seguido de 20 ciclos para anelamento do *primer* FAM por 93ºC/20 s; 53ºC/30 s; 72ºC/35 s, e uma extensão final de 72ºC/30min. O produto amplificado foi diluído (1:10µL) e foi retirado 3µL da

diluição para um mix de genotipagem juntamente com 6,75µL de Tween 20 0.1% e 0,25 µL de *size standard* ET-400 ROX (GE *Healthcare*), totalizando um volume final de 10µL. Para cada duas combinações de locos foi realizado o sistema de multiplex (Tabela 2), direto na placa de genotipagem, onde foi possível em um mesmo *well* (poço) analisar dois locos de tamanhos diferentes simultaneamente. Essa técnica fez com que se economizasse tempo e reagentes e posteriormente, as placas foram injetadas no MegaBACE 1000 (GE *Healthcare*).

Tabela 2: Esquema das genotipagens multiplex por tamanho de fragmento.

Mix	Combinação Multiplex	Faixa de tamanho (pb)	Fluorescência
Mix 1	BV_6	273-293	FAM
	BV_21	162-182	FAM
Mix 2	BV_17	195-229	FAM
	BV_30	174-182	FAM
Mix 3	BV_23	170-196	FAM
	BV_29	274-304	FAM

II.2.4.2 Estimativas e análise dos parâmetros genéticos

As genotipagens foram analisadas e conferidas no programa *Fragment Profiler* 1.2 (GE *Healthcare*). Após isso, foi construída uma matriz com os genótipos encontrados para todos os indivíduos, das quatro localidades e para os seis locos estudados. Para resolver os possíveis problemas de alelos nulos, excesso de homozigotos, *stuttering* (“gaguejos”) e *dropout* de alelos foi utilizado o programa MicroChecker 2.2.3 (Van Oosterhout *et al.,* 2004).

II.2.4.3 Estrutura populacional e taxas de migração

Foi utilizado o programa Arlequin 3.11 (Excoffier, 2005) para verificar se existe estrutura genética populacional, o nível de variabilidade genética, a heterozigosidade observada e esperada, Equilíbrio de Hardy-Weinberg, a riqueza de alelos, o número de alelos encontrados por localidade. Foi testada a Análise de Variância Molecular (AMOVA) (Excoffier *et al.*, 1992) inclusa no programa. A AMOVA utiliza o índice de fixação *Fst* (Wright, 1969).

Para verificar e confirmar se existe ou não estrutura populacional , ou seja, se os estoques são geneticamente heterogêneo ou homogêneo, entre as amostras de populações, foi utilizado o programa Structure 2.2 (Pritchard *et al.*, 2000). Esse programa faz uma análise de agrupamentos baseada em modelos e assume que existe um número K (*clusters* ou grupos) de agrupamentos (a partir dos genótipos), utilizando a inferência Bayesiana, equilíbrio de Hardy-Weinberg e equilíbrio de ligação entre os locos. Para essa análise foi assumido o modelo de ancestralidade por mistura (*admixture*), onde cada indivíduo pode possuir ancestrais em mais de uma população. Esse modelo correlaciona os alelos permitindo uma resolução máxima em separar as populações de acordo com um dado K.

II.3 RESULTADOS

II.3.1 Análise da diversidade genética

II.3.1.1 DNA mitocondrial

Foram analisadas 149 sequências nucleotídicas da região controle de totalizando 942 pares de base (pb) cada. Com relação aos sítios, 801 sítios apresentaram-se monomórficos, 127 sítios polimórficos (Anexo I) e 14 corresponderam a *indels* (inserções ou deleções). O indivíduo 3429 da localidade de Tefé apresentou uma inserção de 46pb entre os sítios 410-457, a qual foi retirada para as análises populacionais (Figura 4).

A média da composição nucleotídica da região controle dos 149 indivíduos de piramutaba foi de: 21,85% para Citosina, 32,59% para Timina, 31,28% para Adenina e de 14,29% para Guanina.

Dos sítios polimórficos, 106 corresponderam a mutações do tipo transição e 16 corresponderam a transversões. Com o auxílio do programa Dambe (Xia e Xie, 2001) foi gerado o gráfico que relaciona as transições e as transversões que ocorreram nos 129 haplótipos *versus* a distância genética JC69 (Jukes e Cantor, 1969), que atribui a mesma frequência de bases e uma mesma probabilidade para todas as substituições. Não foi observado saturação entre as substituições nucleotídicas com a distância genética (Figura 5).

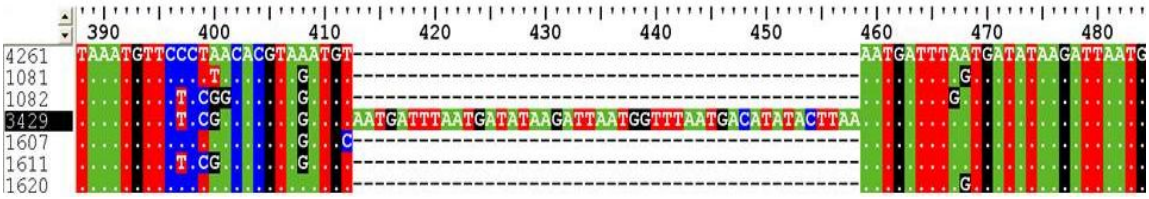

Figura 4: Inserção de 46pb do indivíduo 3429 proveniente de Tefé.

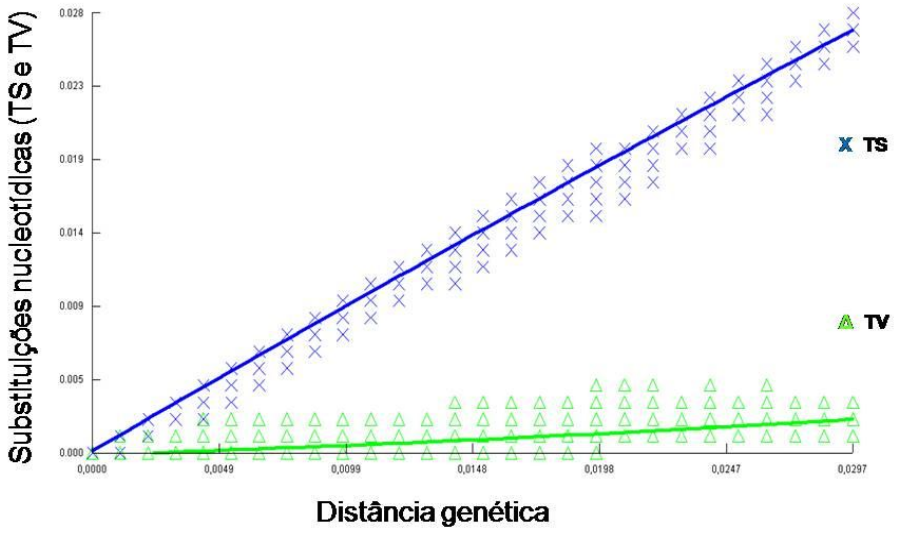

Figura 5: Gráfico do número de substituições nucleotídicas (transições –TS, transversões-TV) *versus* a distância genética (JC69) para a região controle da piramutaba.

A tabela 3 mostra a estimativa dos níveis de variabilidade genética revelada pelos índices de diversidade, calculados com base no polimorfismo dos haplótipos dos indivíduos encontrados.

No rio Japurá foram encontrados 28 haplótipos e destes, 27 corresponderam a haplótipos únicos, com dois haplótipos compartilhados; em Tefé foram encontrados 35 haplótipos únicos, com três haplótipos compartilhados; em Manaus, 38 haplótipos e destes, 34 corresponderam a haplótipos únicos, com seis haplótipos compartilhados e em Porto Velho, foram encontrados 41 haplótipos sendo 38 únicos, com três haplótipos compartilhados.

Todas as localidades (Tabela 3) apresentaram diversidade haplotípica (HD) alta (maior que 99%), que é a probabilidade de duas sequências escolhidas ao acaso ser diferentes. Tefé apresentou o maior índice (HD= 100%). A diversidade nucleotídica (PI), que representa o número de nucleotídeos diferentes por sítio entre as sequências escolhidas ao acaso, apresentou o maior índice no rio Japurá (0,01512) e o menor em Tefé. A maior média das diferenças nucleotídicas par a par (K) foi encontrada no rio Japurá (14,106) e a menor em Tefé (11,940).

O Teste *D* de Tajima não foi significativo para nenhuma das quatro populações amostradas indicando que as localidades estão em equilíbrio genético em relação aos haplótipos. Os valores do *Fs* de Fu foram significativos para todas as localidades, pois todos os valores foram negativos, sugerindo que as localidades amostradas estão em expansão populacional (Tabela 3).

Tabela 3: Índices de polimorfismo de DNA para os espécimes de *B. vaillantii* das quatro localidades amostradas. N=número amostral; H= número de haplótipos; HU=haplótipos únicos; S=sítios polimórficos; ETA=número de mutações; HD=diversidade haplotípica; PI= diversidade nucleotídica; K=média das diferenças nucleotídicas par a par.

População	**N**	**H**	**HU**	**S**	**ETA**	**HD**	**PI**	**K**	***D* de Tajima**	***Fs* de Fu**
Japurá	29	28	27	62	63	0,998	0,01512	14,106	-0,45700	-15,196*
Tefé	38	38	35	63	66	1,000	0,01278	11,940	-0,87220	-32,762*
Manaus	40	38	34	63	64	0,994	0,01372	12,801	-0,53780	-20,980*
Porto Velho	42	41	38	65	66	0,998	0,01343	12,508	-0,66149	-29,734*
Total	**149**	**141**	**134**							

*Resultados significativos (P< 0,02)

II.3.1.2 Microssatélites

Cada loco apresenta um padrão particular para o tipo de alelo encontrado após análises no programa *Fragment Profiler* 1.2 (GE *Healthcare*). Depois de conferidos os alelos foi construída uma matriz com os genótipos encontrados para todos os indivíduos, das quatro localidades e para os seis locos estudados. O loco BV_6 apresentou alelos nulos para três das quatro localidades estudadas, porém não apresentou desequilíbrio de ligação ou de Hardy-Weinberg durante a caracterização (Capítulo I).

Foram genotipados um total de 161 indivíduos os quais foram analisados para seis locos microssatélites. Um total de 221 alelos foi encontrado em uma análise geral das populações. Com o auxílio do programa Arlequin 3.11 (Excoffier, 2006) é possível visualizar na Tabela 4 os seguintes índices de diversidade genética, por localidade: a média da diversidade gênica que variou de 0,742657 (em Porto Velho, com desvio padrão de 0,420245) e de 0,832392 (no rio Japurá, com desvio padrão de 0,504921). O número médio de diferenças par a par, a média de alelos encontrados e a média das heterozigosidades observada e esperada que variou de 0,74710 a 0,78728 em Tefé e de 0,77209 a 0,79933 em Manaus.

Na tabela 5 é possível verificar o número de alelos encontrados por loco, as heterozigosidades observada e esperada por loco e o valor de p. O valor de p não foi significativo para as localidades após a correção de Bonferroni. O loco que apresentou uma menor riqueza alélica total foi o BV_30 (=17) e o loco que apresentou uma riqueza alélica maior foi o BV_17 (=54).

Tabela 4: Índices de diversidade genética por localidade

População	N	Média da diversidade gênica	N° médio de diferenças par a par	N° total de alelos	Média do N° de alelos	Média do EHW H_O - H_E
Japurá	30	0.832392 ± 0.504921	2.497175 ± 1.365848	50	8.333	0.76390-0.78050
Tefé	48	0.744956 ± 0.616042	0.744956 ± 0.556151	56	9.333	0.74710 - 0.78728
Manaus	44	0.814577 ± 0.454371	4.072884 ± 2.050618	57	9.500	0.77209 - 0.79933
Porto Velho	39	0.742657 ± 0.420245	3.713287 ± 1.896070	58	9.667	0.75951 - 0.77773
Total	**161**			**221**		

N= N° de indivíduos; EHW= Equilíbrio de Hardy-Weinberg; H_O= Heterozigosidade Observada; H_E= Heterozigosidade Esperada.

Tabela 5: Número de alelos encontrados por loco, heterozigosidade observada, heterozigosidade esperada e o valor de p.

		BV_6	BV_17	BV_21	BV_23	BV_29	BV_30
Japurá	N	30	28	30	27	29	28
	Na	9	12	8	5	13	3
	H_O	0.86667	0.82143	0.86667	0.62963	0.82759	0.57143
	H_E	0.83559	0.88247	0.84181	0.63173	0.87780	0.61364
	p	0.19119	0.14439	0.54945	0.78504	0.20590	0.09471
Tefé	N	40	42	46	45	40	45
	Na	10	12	9	8	12	5
	H_O	0.72500	0.83333	0.78261	0.75556	0.87500	0.51111
	H_E	0.85696	0.88067	0.81151	0.75805	0.82595	0.59051
	p	0.67067	0.00902	0.53677	0.02534	0.56962	0.15852
Manaus	N	44	43	45	43	44	36
	Na	9	14	9	8	12	5
	H_O	0.65909	0.93023	0.75000	0.79070	0.86364	0.63889
	H_E	0.82994	0.88974	0.81740	0.73981	0.86964	0.64945
	p	0.02593	0.84994	0.80977	0.25886	0.78790	0.45736
Porto Velho	N	38	39	44	41	37	41
	Na	11	16	10	6	11	4
	H_O	0.71053	0.84211	0.84615	0.60526	0.78378	0.76923
	H_E	0.86491	0.87544	0.82051	0.68877	0.82932	0.58741
	p	0.05469	0.34130	0.26280	0.05196	0.56346	0.18029
Na Total		**39**	**54**	**36**	**27**	**48**	**17**

N= N° de indivíduos; Na= N° de alelos encontrados; H_O= heterozigosidade observada;H_E= heterozigosidade esperada; $p < 0,008$, após correção de Bonferroni.

II.3.2 Análise de estrutura populacional

II.3.2.1 DNA mitocondrial

A Análise da Variância Molecular (AMOVA) foi testada para verificar a possível existência de grupos populacionais entre rios, se existe a diferença entre calha e tributários, e para avaliar o grau de variabilidade genética dentro e entre populações. Os resultados mostraram uma alta diversidade genética para todas as amostras populacionais e a variação genética dentro das populações (intrapopulacional) foi de 100% (Tabela 6).

Tabela 6: AMOVA para as localidades de piramutaba

Fonte de variância	Componentes da variância	Porcentagem de variação
Entre populações	0.00	0.00
Dentro populações	0,50	100,00
Total	**0,50**	**100,00**

A diferenciação genética (*Φst)* revelou valores muito baixos ou negativos indicando que as populações de piramutaba não se encontram diferenciadas geneticamente (não existe a formação de grupos), o que é corroborado pelo elevado número de migrantes por geração (*Nm),* onde todas as combinações apresentaram número infinito de migrantes, indicando alto fluxo gênico entre as localidade amostradas (Tabela 7). O Teste de Mantel não foi significativo mostrando que não existe a correlação entre as matrizes de distância genética (*Φst*) e geográfica (Km).

Tabela 7: Diferenciação genética (*Φst*) acima da diagonal e estimativa indireta de fluxo gênico (*Nm*) abaixo da diagonal

	Japurá	Tefé	Manaus	Porto Velho
Japurá		0,02236	0,00962	0,02486
Tefé	Inf*		-0,00875	-0,01290
Manaus	Inf*	Inf*		-0,00804
Porto Velho	Inf*	Inf*	Inf*	

(*Inf=infinito)

Para verificar se aconteceu uma rápida expansão demográfica, foi gerado um gráfico de distribuição *mismatch* (*mismatch distribution),* porém os resultados mostram que não ocorreu expansão populacional súbita, pois não se mostraram

uma concordância entre as curvas observadas e esperadas. Os valores esperados mostraram uma curva unimodal enquanto o que se foi observado mostra uma distribuição multimodal (Figura 6).

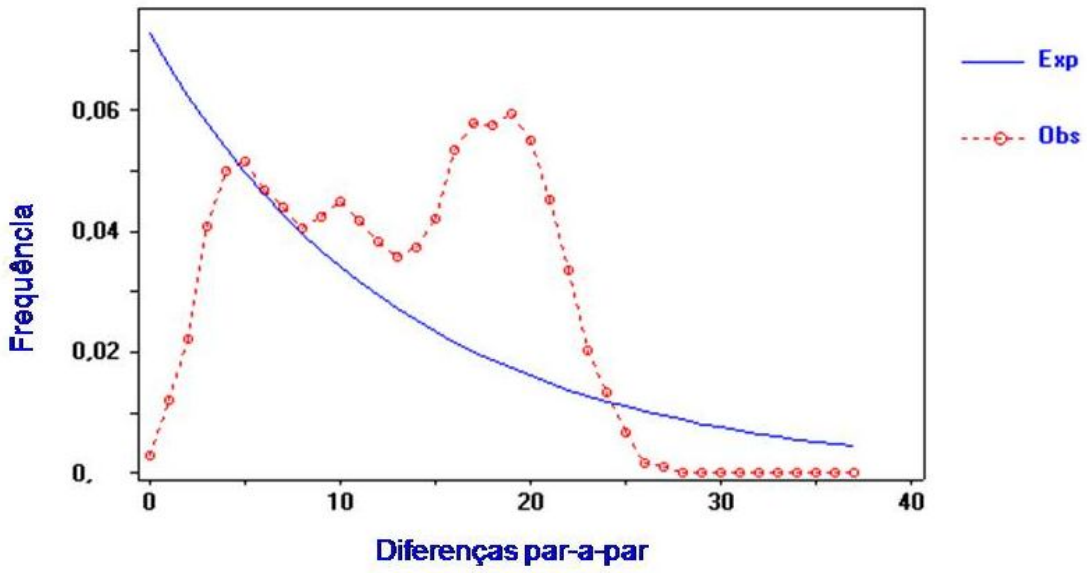

Figura 6: Gráfico de distribuição *mismatch* (*mismatch distribution)* indicando que não há a existência de expansão súbita (distribuição bimodal).

A análise da rede de haplótipos feita no programa TCS (Clement *et al*., 2000) não foi resolutiva e apresentou muitos *loops*. Por essa razão optou-se por fazer uma árvore de distância de Evolução Mínima (*Minimum Evolution*-ME) sem raiz, onde soma todos os comprimentos dos ramos da árvore (S) e a topologia que apresentar menor valor de S é escolhida como a melhor árvore (Figura 7). Verificou-se a existência de compartilhamento entre os haplótipos entre dois indivíduos de Manaus com um de Tefé (4258Tf, 3142Mao, 5467Mao); um de Tefé e rio Madeira (3438Tf e 1252Md), um de Tefé e Manaus (3604Tf e 1554Mao), Manaus (1551Mao e 4044Mao); entre Manaus e rio Madeira (9178Mao e 1257Md); Madeira (1160Md e 1248Md) e entre o rio Japurá (1360Ja e 1274Ja).

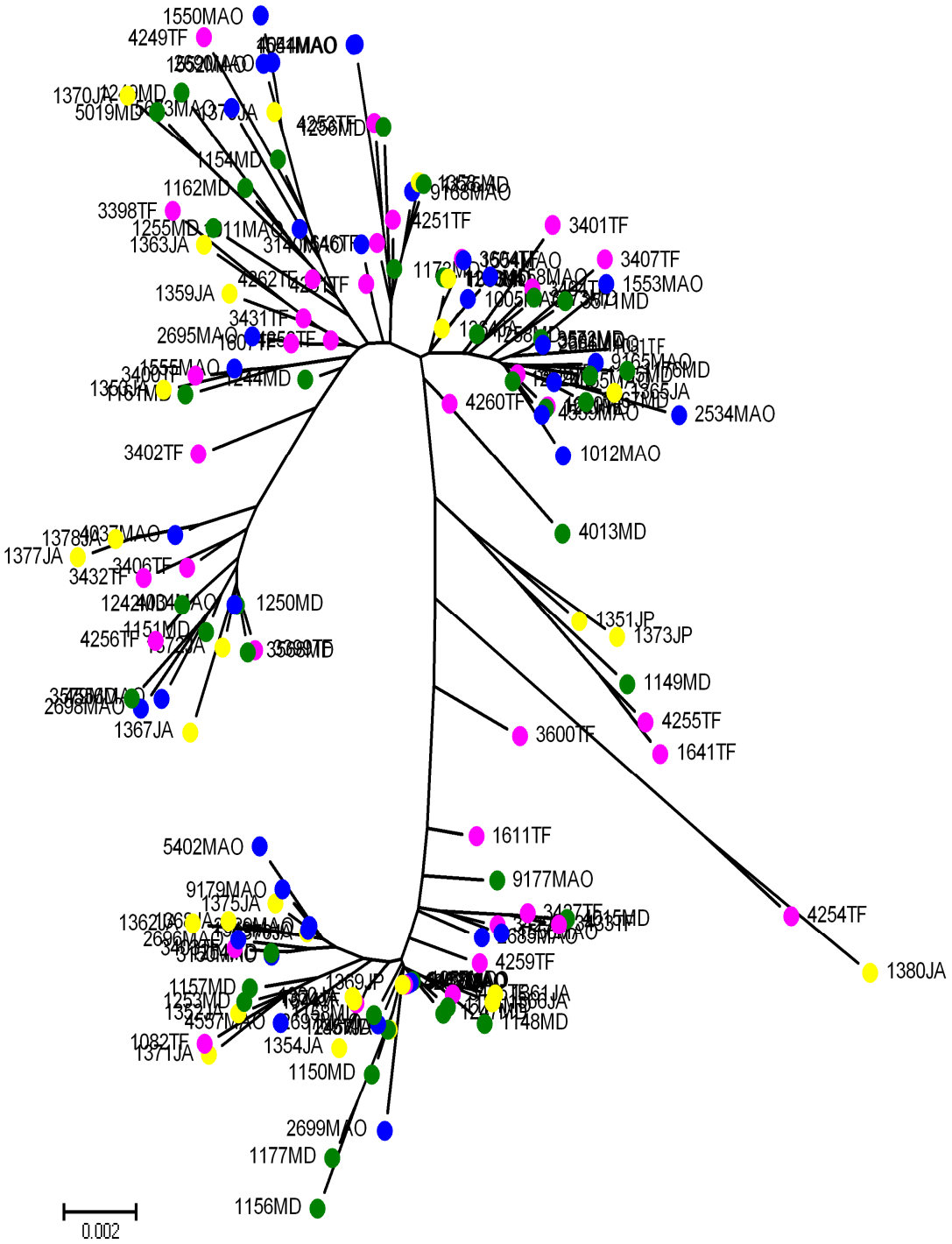

Figura 7: Árvore de Evolução Mínima (ME) sem raiz para as localidades amostradas. Em verde: amostras provenientes do rio Madeira (Porto Velho), em rosa amostras de Tefé, em amarelo amostras do rio Japurá (Vila Bittencourt) e em azul amostras de Manaus.

II.3.2.2 Microssatélites

Na tabela 8 observa-se o resultado da Análise de Variância Molecular (AMOVA) (Excoffier *et al*., 1992) a qual observou-se a ausência de estrutura genética (Global Fst= 0,02286). O cálculo do F_{st} usa o modelo dos alelos infinitos e assume que qualquer alelo tem a mesma relação evolutiva com qualquer um dos alelos alternativos Os resultados mostraram uma alta diversidade genética para todas as amostras populacionais e uma variação genética dentro de populações maior que 99%, sendo que somente 2,29% da variância ocorre entre populações.

Tabela 8: Análise de Variância Molecular (AMOVA)

Fonte de variância	Componentes da variância	Porcentagem de variação
Entre populações	0,01691	2,29
Entre indivíduos dentro populações	-0,00993	-1,34
Dentro populações	0,73292	99,06
Total	**0,73990**	**100,00**

Para verificar e confirmar se existe ou não estrutura populacional entre as amostras das diferentes localidades foi utilizado o programa Structure 2.2 (Pritchard *et al*., 2000). O resultado obtido pelo Structure mostra uma população panmítica, ou seja, não existe formação de grupos K (*clusters*) entre as amostras populacionais. Para essa análise foi utilizado o modelo de ancestralidade misturada (*admixture*) com a correlação dos alelos na separação dos grupos com o K variando de 1 a 5. O valor de K com maior probabilidade *a posteriori* encontrado foi K=1, com p= -3595,9 (Figura 8).

As taxas de migração entre as regiões foram estimadas no programa Migrate 2.1 (Beerli e Felsenstein, 2001). Os resultados da análise Bayesiana mostraram que o índice de diversidade genética Theta (Θ) é maior em Porto Velho (Θ=2,675) e o

menor Theta está no rio Japurá (Θ=0,725), mostrados na Figura 9**.** Os índices de migração (Tabela 9) ocorrem em maior quantidade de Manaus para Porto Velho (24,74375) e em menor quantidade entre Porto Velho e Japurá (5,9812).

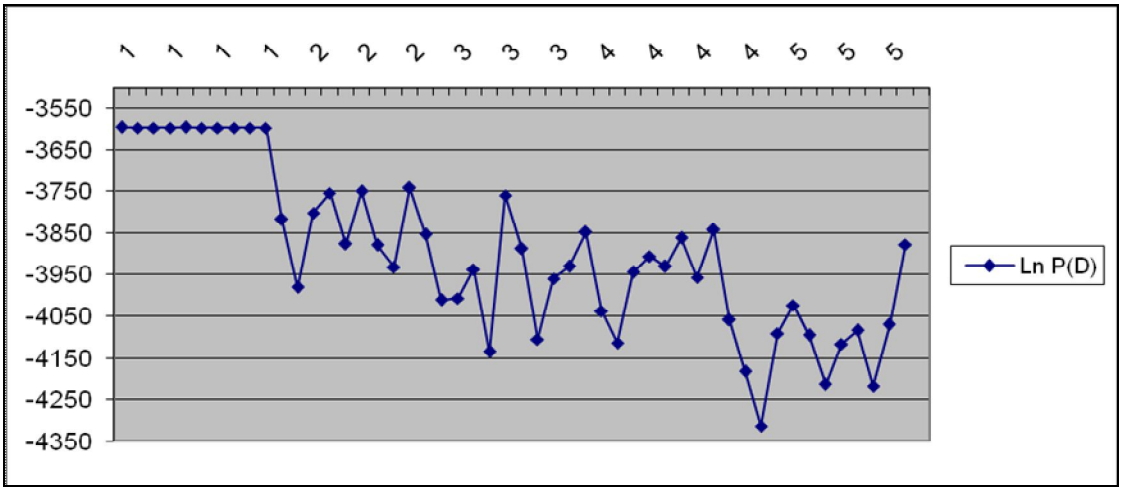

Figura 8: Gráfico do Structure mostrando uma população panmítica. O maior valor para K=1foi de p= -3595,9. Os valores na vertical são os valores de p da média de verossimilhança; valores na horizontal são os números de agrupamentos K (*clusters*) possíveis.

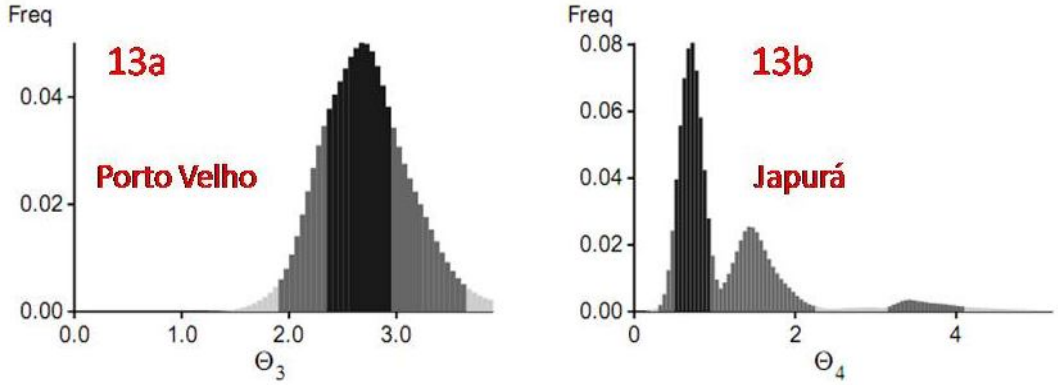

Figura 9: Maior índice de diversidade genética Θ encontrado. Na figura 13a, Θ para a Porto Velho (Θ=2,675) e em 13b o menor Θ encontrado (Θ=0,725) para o rio Japurá.

Tabela 9: Índices de migração entre as localidades. Observa-se um maior valor de migrantes de Manaus para Porto Velho e um menor valor de Porto Velho para o rio Japurá, em destaque. Valores abaixo da diagonal correspondem ao número estimado de imigrantes, e os valores abaixo da diagonal, correspondem ao número estimado de emigrantes entre as localidades.

		Tefé ←	**Manaus** ←	**Porto Velho** ←	**Japurá** ←
	Θ (Theta)				
Tefé	2,325		11,04375	8,71875	6,39375
Manaus	2,575	10,94375		9,65625	8,36875
Porto Velho	2,675	15,38125	**24,74375**		8,69375
Japurá	0,725	9,96875	6,34375	**5,98125**	

A seta (←) indica a direção de migração.

II.4 DISCUSSÃO

II.4.1 Análise da diversidade genética

A obtenção de informações genéticas geradas pelos marcadores moleculares complementa e fortalece as pesquisas a respeito dos estoques pesqueiros. Os marcadores moleculares são utilizados para responder questões ecológicas, definir e caracterizar geneticamente estoques pesqueiros. Estudos baseados no sequenciamento do DNAmt para peixes amazônicos estão em expansão (Porto, 1999; Schmitt, 2005; Sivasundar *et al.,* 2001; Hrbek *et al*., 2005; Toffoli, 2006; Batista e Alves-Gomes, 2006; Santos *et al.,* 2007; Schneider, 2007; Farias e Hrbek, 2008; Souza, 2008; Meliciano, 2008; Terencio, 2009; Batalha, 2009; Machado, 2009).

A composição nucleotídica dos 942 pares de base da região controle dos 149 indivíduos de piramutaba foi de: 32,59% para timina; 31,28% para adenina; 21,85% para citosina e de 14,29% para guanina. Esses maiores valores de A/T (adenina/timina), parece uma tendência observada em peixes (Meyer, 1993; Santos, 2004; Schneider, 2007; Orti *et al*., 2008; Souza, 2008; Terencio, 2009). Ainda, um indivíduo (3429) apresentou uma inserção de 46pb, com um alto conteúdo de A/T, nos sítios 411-456. Segundo Meyer (1993) em regiões de inserção é comum verificar uma elevada frequência de A/T por estas serem menos estáveis que regiões de C/G (citosina/guanina) e por isso são mais propensas ao deslizamento da fita e formação de alças. Inserções de pares de bases na região controle já foi observado em outras espécies de peixes, como visto em *Colossoma macropomum* (Santos, 2004). Eventos de inserções podem ocorrer por *crossing-over* desigual, deslizamento na replicação, mau pareamento da fita ou transposição de DNA, o que pode favorecer a variabilidade genética (Li, 1997).

A variabilidade genética é um componente fundamental para a sobrevivência e adaptação de uma espécie. A alta diversidade genética é proporcional às chances de sobrevivência da espécie (Frankham *et al*., 2002). Como a piramutaba é um dos peixes mais capturados e exportados, é de extrema importância o conhecimento da sua variabilidade genética e conservação de seu estoque.

Conforme mostrado na Tabela 3, foi observada uma alta variabilidade genética nas quatro localidades estudadas. O elevado número de haplótipos únicos, (134/141) encontrados revela que não há um compartilhamento significativo de haplótipos. Isso pode estar relacionado com o fato da piramutaba realizar longas migrações e durante esse período ocorre a mistura de diversos grupos de várias coortes e de diferentes rios. As quatro localidades apresentaram diversidade haplotípica (HD) alta (maior que 99%) e consequentemente, a diversidade nucleotídica (PI) apresentou um valor baixo.

Esse mesmo padrão foi verificado nos trabalhos de Formiga-Aquino (2004), Batista e Alves-Gomes (2006), HD>99% e HD>88%, respectivamente. Sivasundar *et al.* (2001), verificaram uma alta diversidade genética para o curimatá (*Prochilodus lineatus)* de 12 localidades da bacia do Paraná. Santos *et al*. (2007) utilizaram a região controle do DNAmt do tambaqui (*Colossoma macropomum*) em cinco localidades da calha do rio Amazonas, verificaram uma elevada variabilidade genética para a espécie. Machado (2009) para o mesmo fragmento de DNA de curimatá (*Prochilodus nigricans*), em 21 localidades da Amazônia, encontrou elevados índices de diversidade genética. Garber *et al*., (2005) analisaram sequências da região controle de uma espécie de peixe marinho *Acanthocybium solandri*, em sete localidades centrais dos oceanos Pacífico e Atlântico e verificaram que esta espécie é panmítica.

Ainda em relação aos valores da Tabela 3, os valores do Teste *D* de Tajima não foram significativos indicando que as localidades estão em equilíbrio genético, com relação ao DNA mitocondrial. Entretanto, os valores do *Fs* de Fu foram significativos ($P < 0,05$) para todas as localidades sugerindo expansão populacional. Quando esses testes apresentam valores negativos significa que há um excesso de mutações recentes e os mesmos são interpretados como evidência de crescimento populacional ou seleção (Tajima, 1989; Fu, 1997). A união dos resultados dos testes de neutralidade juntamente com a grande quantidade de haplótipos únicos encontrados sugere que estas populações passaram por um crescimento populacional recente, pois segundo Avise *et al*. (1994) populações que passaram por um rápido crescimento populacional tendem a acumular novas mutações.

Para que se tivesse um maior suporte nos resultados, além das sequências do DNA mitocondrial, foram utilizados também os marcadores microssatélites, pois eles estão entre os mais utilizados e indicados para responder questões em níveis genéticos, ecológicos e populacionais, essa preferência se deve ao fato deles serem multialélicos, altamente polimórficos e co-dominantes (Goldstein e Pollock, 1997; Selkoe e Toonen, 2006). O número de alelos por loco e a quantidade de locos polimórficos são utilizados como índices de diversidade genética, pois é possível caracterizar e estimar a variabilidade genética dentro e entre populações. Dentre os índices quantificados estão: o número de alelos por loco, a heterozigosidade observada e esperada, o índice de fixação de *F*, o theta (Θ) e o equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Rodrigues *et al.*, (2009) isolaram e desenvolveram 15 locos microssatélites para a piramutaba e testaram a transferibilidade para quatro indivíduos das outras seis espécies do gênero *Brachyplatystoma* (ver capítulo I). Esses 15 locos mostraram-se altamente polimórficos e destes, seis foram escolhidos para a análise populacional de piramutaba para o presente trabalho.

Os locos analisados apresentaram um perfil particular para o tipo de alelo encontrado. Os alelos foram conferidos e foi construída uma matriz com os genótipos. Somente o loco BV_6 apresentou alelos nulos para Tefé, Manaus e Porto Velho, porém não apresentou desequilíbrio de ligação ou de Hardy-Weinberg durante a caracterização (Capítulo I). Alelos nulos são os alelos de um loco microssatélite que não são amplificados no PCR, causado por mutações nas regiões flanqueadoras dos *primers* ou a ocorrência de mutações nas unidades de repetições, ocasionando mudanças no tamanho do produto amplificado. O déficit de heterozigotos numa população pode ser devido à presença de alelos nulos (O'Connell e Wright, 1997). Esse loco pode estar sob o efeito da endogamia, ou amostragem não aleatória ou sob o Efeito Wahlund onde o grau de subdivisão da população é medido como um todo tendendo a reduzir a frequência dos heterozigotos (Futuyma, 1997; Xu *et al.*, 2001). É difícil saber qual a causa da deficiência de heterozigotos, provavelmente sejam vários fatores que estejam contribuindo para isso, já que não temos como prever ou saber exatamente como as

populações se comportam nos mais diversos rios da Amazônia. O loco BV_6 merece um cuidado especial ao ser analisado em futuros estudos populacionais de piramutaba.

O equilíbrio entre as taxas de mutação e a deriva genética é refletido nos diferentes níveis de variabilidade entre as diversas classes de marcadores. A taxa de mutação dos microssatélites varia de 10^{-3} a 10^{-6} por loco, por gameta e por geração e se deve às alterações no número da unidade de repetição (Schlötterer, 2000).

Dos 161 indivíduos genotipados, para os seis locos microssatélites, foram encontrados 221 alelos. Os valores mais extremos encontrados dos índices de diversidade genética (por localidade) analisados foram: a média da diversidade gênica (0,742657 ± 0,420245 para Porto Velho), (0,832392 ± 0,504921 para o rio Japurá); o número médio de diferenças par a par; a média de alelos encontrados e a média das heterozigosidades observada e esperada (0,74710 - 0,78728 para Tefé), (0,77209 - 0,79933 para Manaus) (Tabela 4). Esses valores mostram uma diversidade genética alta e uma homogeneidade entre as localidades, sugerindo que não existe formação de grupos geneticamente diferenciados.

Milhares de anos de evolução resultaram na diversidade genética que se tem hoje, todavia as perdas são irrecuperáveis e ocorrem rapidamente (Nielsen e Kenchington, 2001). Segundo Nei (1987) a alta diversidade genética encontrada em populações naturais, como no caso da piramutaba, se deve ao fato destas possuírem um grande tamanho populacional, um ambiente heterogêneo e características ligadas à história de vida da espécie que favorecem um crescimento populacional rápido.

O número de alelos (Na) é o número absoluto de alelos encontrados na população e depende do número amostral (Tabela 5), as heterozigosidades observada e esperada e o valor de p também podem ser visualizados na mesma tabela. A maior riqueza alélica foi encontrada no loco BV_17 com 54 alelos e a menor riqueza alélica foi encontrada no loco BV_30 com 17 alelos. O loco BV_17 é um microssatélite imperfeito e bastante complexo, possui repetição do tipo $(AG)_{10}$ gg

$(AG)_{12}$ a complexidade deste loco favorece mutações nas unidades de repetição, favorecendo alelos de tamanhos variados, o que explica a alta riqueza alélica encontrada. Já o loco BV-30 é um microssatélite simples e perfeito, possui repetição do tipo $(TG)_7$ talvez por ser mais conservado, as mutações ocorrem em menos frequência, por isso a menor riqueza alélica foi encontrada neste loco.

No rio Japurá foi realizada uma única coleta, de um cardume anual, e para as outras três localidades, foram realizadas de quatro a nove coletas, em anos diferentes. De uma forma geral, não foi verificado padrões muito discrepantes da diversidade genética, de localidade para localidade, com os dois marcadores moleculares utilizados, mesmo com uma única amostragem do rio Japurá. A comparação entre os extremos Norte-Sul (rio Japurá e Porto Velho), no sentido Leste-Oeste (Manaus-Tefé) ou entre as quatro localidades, apresentou uma homogeneidade nos valores.

II.4.2 Piramutaba: uma população panmítica

A análise da estrutura populacional é extremamente importante para a identificação de unidades de conservação e impede a perda irreversível do material genético (Waples, 1998). A avaliação genética de uma população distribuída em diferentes rios indica a intensidade com que o fluxo gênico ocorre entre as populações (Hilsdorf *et al.*, 2006).

A Análise de Variância Molecular (AMOVA) (Tabela 6), utilizando as sequências de DNA, revelou que a maior fonte de variação genética encontra-se nos indivíduos dentro dos grupos, mostrando uma alta diversidade genética para todas as amostras populacionais. O mesmo resultado foi encontrado por Formiga-Aquino (2004) com sequências da região controle do DNA mitocondrial, para a mesma espécie deste presente estudo, no qual analisou cinco localidades do eixo Estuário/Amazonas/Solimões. Foi encontrada uma alta variabilidade genética para a piramutaba e que esta espécie compõe uma única população migradora na calha principal do rio Amazonas.

Resultado similar foi encontrado para outra espécie do gênero *Brachyplatystoma* por Batista e Alves-Gomes (2006), os autores utilizaram a região controle do DNA mitocondrial para analisar a estrutura genética da dourada (*B. rousseauxii)* em três localidades situadas ao longo do estuário/Amazonas/Solimões. Foi verificado que na calha principal do rio esta espécie forma uma única população, portanto com uma alta diversidade genética, porém à medida que essa espécie entrava nos tributários, a variabilidade genética diminuía. Ainda em estudos com bagres, Coronel *et al.* (2004) utilizaram alozimas e fragmentos de PCR-RFLP de DNAmt de dourada e de surubim (*Pseudoplatystoma fasciatum*) oriundos dos rios Ichilo e Beni na Bolívia, e foi encontrado uma alta variabilidade genética para as duas espécies.

O teste da AMOVA utilizando os microssatélites também detectou ausência de estrutura genética, corroborando com o resultado encontrado com o sequenciamento da região controle do DNA mitocondrial. A porcentagem de variância ocorre 99,06% dentro da população e de 2,29% entre populações.

Outra forma de analisar a estrutura genética com sequências de DNA mitocondrial é dado pelo *Φst,* que estima a diferenciação genética (Tabela 7). Os baixos valores ou valores negativos de *Φst* indicam que as populações de piramutaba não se encontram geneticamente diferenciadas, portanto não existe a formação de grupos. Esse resultado é fortalecido pelo elevado número de migrantes por geração (*Nm)* onde todos os valores apresentaram um número infinito de migrantes, ou seja, existe um alto fluxo gênico entre as localidades. Essa alta variabilidade pode ser um reflexo do grande tamanho efetivo populacional de fêmeas, já que a região controle do DNA mitocondrial revela somente a dinâmica populacional da linhagem materna.

O gráfico (Figura 6) de distribuição *mismatch* (*mismatch distribution)* utilizado para verificar e/ou confirmar se aconteceu uma rápida expansão demográfica, revelou uma discordância entre as curvas observada e esperada. Para que fosse considerada expansão súbita, tanto a curva do esperado quanto a do observado teriam que ser idênticas. O padrão multimodal verificado mostra que as populações de piramutaba estão em equilíbrio (mutação-deriva) com relação à dinâmica

evolutiva do DNA mitocondrial. Definir biologicamente uma população é extremamente importante para tomada de decisão da gestão dos recursos biológicos e para a conservação destes (Waples, 1998). Os parâmetros genéticos auxiliam no direcionamento de tomadas de decisões coerentes que objetivam a melhor manutenção do recurso pesqueiro.

Uma última análise feita com sequências de DNA para confirmar a panmixia de piramutaba, foi verificada pela análise de haplótipos na árvore de distância de Evolução Mínima (*Minimum Evolution*-ME) sem raiz (Figura 7). A árvore mostra uma mistura dos indivíduos de piramutaba, existência de haplótipos únicos e poucos haplótipos compartilhados. Isso corrobora com os demais resultados obtidos sugerindo que a piramutaba realiza longas migrações o que permite o fluxo gênico entre os milhares de quilômetros.

As informações sobre a estrutura de populações fornecem e auxiliam na obtenção de diretrizes para as estratégias de conservação e manejo de um recurso, como no estudo de Hrbek *et al*. (2007) que analisaram sequências do DNAmt e 14 locos microssatélites do pirarucu (*Arapaima gigas*), em sete localidades da Amazônia, encontraram um elevado fluxo gênico entre as localidades e que esta espécie forma uma população contínua com um discreto isolamento por distância revelado somente com os microssatélites. Neste trabalho os autores sugerem a criação de um modelo de manejo e conservação para o pirarucu, objetivando a preservação da diversidade genética atual; o fornecimento de imigrantes às populações com redução populacional e a preservação das áreas centrais de várzea.

Pelo fato da piramutaba ser uma espécie altamente visada pela pesca e estar em sobrepesca, o seu estilo de vida, as longas migrações, a alta dispersão e sua adaptabilidade parecem favorecer a sua conservação. O grande tamanho efetivo populacional e o curto intervalo de tempo de explotação de piramutaba (menos de 40 anos), ainda não foram suficientes para serem detectados em nível de DNA, por isso que a sobrepesca ainda não afetou a variabilidade genética da piramutaba. Um padrão similar foi encontrado para o tambaqui (*Colossoma macropomum*) (Santos *et al*., 2007), um peixe bastante apreciado na região Amazônica, que também está

sobrepescado. Os autores analisaram cinco localidades da calha principal, por meio de sequências da região controle e verificaram que o tambaqui possui uma elevada variabilidade genética e que também compõe um único estoque panmítico, reflexo de um grande tamanho efetivo populacional. Outro exemplo de que o grande tamanho efetivo favorece a diversidade genética, mesmo em áreas de sobrepesca, é com bacalhau (*Gadus mohua*). Esse peixe é super explotado e seu estoque está em colapso, porém em nível de DNA, não foi possível verificar mudanças, já que a variabilidade genética continua alta (Poulsen *et al*., 2006).

Populações com um grande tamanho efetivo, com um fluxo gênico elevado e com hábitos migratórios tendem a diminuir o efeito da deriva genética (Turner *et al*., 2004). Por mais que não tenha sido revelada redução populacional, nem perda da diversidade genética e por se tratar de um único estoque genético, isso não significa dizer que se pode pescar piramutaba à vontade, sem qualquer fiscalização, em qualquer período do ano. Tendo em vista que levantamentos de captura e relato de pescadores indicam que cada vez mais, menos piramutaba são pescadas.

Os resultados do estudo não mostraram diferenças entre as localidades amostradas, nem com as sequências de DNA e nem com os microssatélites, sugerindo que não há escolha preferencial por um determinado rio para se reproduzir, ou seja, a piramutaba não retorna ao rio onde nasceu para se reproduzir, ou seja, não possui um comportamento de *homing*. Esse comportamento conhecido por *homing* ou filopatria é amplamente estudado em salmonídeos (Dittman e Quinn, 1996; Stamford, 2001). Em espécies neotropicais o comportamento de *homing* tem sido sugerido para algumas espécies. No estudo da dourada (*B. rousseauxii*), com sequências de DNA, foi sugerido que à medida que esta espécie vai entrando nos tributários, a diversidade genética diminui, quando comparada a diversidade da calha amazônica (Batista e Alves-Gomes, 2006). O pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*), em seis tributários diferentes da bacia do Paraná-Paraguai, com sete locos microssatélites, também pode estar realizando *homing* (Pereira *et al*., 2009). Para o matrinchã (*Brycon hilarii*) da sub-bacia do rio Miranda (bacia do Paraguai), com sete locos microssatélites, foi sugerido que esta espécie realiza *homing* devido

às variações genéticas encontradas entre as localidades analisadas (Sanches, 2007).

O fluxo gênico está relacionado com a taxa de migração entre as populações. Essa taxa de migração vai depender da distância entre as localidades, da distribuição geográfica, da habilidade da espécie em se dispersar e de quantas populações se deseja analisar, ou seja, quanto maior o número de localidades analisadas é provável que maior seja o número de migrantes (Frankham *et al.*, 2002). As taxas de migração da piramutaba entre as regiões, estimadas pelo programa Migrate, mostraram que o índice de diversidade genética Theta (Θ) apresentou maior valor em Porto Velho (Θ=2,675) e menor valor no rio Japurá (Θ=0,725) (Figura 9)**.** O baixo valor de Theta para o rio Japurá pode ser devido ao fato de, nesta localidade, ter sido realizada somente uma única coleta de um cardume anual. Nas outras três localidades foram feitas de quatro a nove coletas em diferentes anos. Isso pode explicar o valor discrepante e baixo do rio Japurá, que pode ter sido proveniente da coleta de indivíduos de um único cardume, em comparação com as outras três localidades, que mostraram valores de Theta similares (de 2,325 a 2,675). Os índices de migração (Tabela 9) ocorrem em maior quantidade de Manaus para Porto Velho (24,74375) e em menor quantidade entre Porto Velho e Japurá (5,9812).

II.4.3 A problemática do rio Madeira

Por se tratar de uma população panmítica e depender de vários rios diferentes para realizar as migrações, todos os rios tem sua importância para uma determinada época para os cardumes de piramutaba. Porém, o rio Madeira (Porto Velho) por ser o maior tributário de águas brancas do Amazonas e consequentemente ser um tributário responsável por abrigar uma rica biodiversidade, ele é extremamente importante para a manutenção da variabilidade genética da piramutaba. Isso é preocupante tendo em vista à construção de duas estações hidrelétricas nessa região. Sabe-se que as barragens hidrelétricas é um problema que afeta diversos peixes migradores e que a fragmentação de habitats

causada por essas barragens afeta não só a estrutura genética da população local, como das populações do entorno. Como conseqüência disso, altera a diversidade genética intra e interpopulacional (Vrijenhoek, 1998; Agostinho e Gomes, 2002). Talvez o maior problema resultante de uma hidrelétrica para as espécies aquáticas é a mudança de um ambiente lótico (água corrente) para o lêntico (água parada). Como consequência disso ocorre variações físicas e químicas da água, variação térmica e a perda de nutrientes devido à sedimentação causada pela diminuição da velocidade do curso d'água (Müller, 1995; Larinier, 2000; Agostinho e Gomes, 2002).

Para tentar reduzir os danos e conservar as espécies de peixes migradores em áreas de usinas hidrelétricas, tem-se a construção de escadas ou corredores que permitem que os cardumes migrem em direção às áreas de desova. Porém as migrações não ocorrem num único sentido, os cardumes ora avançam, ora recuam devido à exaustão ou repouso. Também há as linhas de corrente que são desfavoráveis e a estagnação devido à intransponibilidade como é verificado em barragens que são desprovidas de Sistemas de Transposição de Peixes (STPs) (Martins, 2000).

Estudos genéticos com espécies de peixes em áreas de barragens são feitos geralmente com peixes de pequeno e médio porte e também relatam a eficiência dos corredores ou escadas de transposição. (Sivasundar *et al.,* 2001; Wasko e Galetti Jr., 2002; Sanches, 2002; Hatanaka e Galetti Jr., 2003; Hatanaka *et al*., 2006). Mas e para a piramutaba, um peixe de grande porte? Essas escadas seriam realmente eficientes a ponto de o cardume conseguir ultrapassá-las?

As barragens podem causar em espécies migradoras: obstrução total, em todos os indivíduos; parcial, em uma parte dos indivíduos ou temporária, em épocas específicas do ano (Larinier, 2000). Com a interrupção da migração, a variabilidade genética e as frequências alélicas de peixes migradores podem sofrer alterações (Hatanaka e Galetti Jr., 2006). Isso ao longo do tempo pode causar alterações na variabilidade genética podendo até extinguir espécies.

Os altos índices de diversidade genética da piramutaba neste estudo pode estar relacionado ao ciclo de vida da espécie em realizar longas migrações. A

migração, o grande tamanho efetivo populacional e a alta dispersão da piramutaba parecem favorecer a variabilidade genética e sua conservação. Portanto a migração parece atuar como um homogeneizador desse *pool* gênico. Mesmo que a sobrepesca ainda não tenha afetado a variabilidade genética da piramutaba, é importante lembrar que o intervalo de tempo analisado, desde o início da explotação pela pesca industrial, no final dos anos 60, é muito curto para que as alterações genéticas sejam detectadas. É preciso, desta forma, se fazer o monitoramento genético em longo prazo da piramutaba.

II.4.4 Implicações para a conservação e manejo

Considerando a importância ecológica e econômica da piramutaba, os dados gerados neste estudo são importantes e podem ser utilizados nos programas de manejo a fim de se criarem estratégias para a conservação da piramutaba. Para se fazer um bom plano de manejo e para que este dê certo é necessário se fazer um manejo integrado, com a união de informações de estudos de diferentes áreas, como: ecológicos, comportamentais, de monitoramento, de desembarque pesqueiro, do conhecimento tradicional, sócio econômico, os estudos genéticos e até mesmo estudos políticos pois estes cardumes migram em águas internacionais. Tão importante quanto à conservação do estoque de piramutaba, é a conservação do ambiente do ecossistema de várzea, pois não tem como se conservar esta espécie se o ambiente estiver degradado (Fabré *et al*., 2005).

Mesmo com o período de defeso da piramutaba de 75 dias (de 15 de setembro a 30 de novembro) para a pesca industrial, a proibição do uso da rede de arrasto na foz dos rios Amazonas e Pará, a limitação do número de embarcações e a definição do tamanho da malha do saco do túnel da rede de arrasto de 100 mm (MMA, 2004), ainda falta uma fiscalização mais rígida. Se a fiscalização fosse seguida a rigor, não veríamos piramutabas menores de 40 cm nos mercados, tamanho em que ela atinge a idade reprodutiva. Também é necessária a criação de uma cota, estipulando o tamanho mínimo de captura e um limite de quantidade a ser capturado pela pesca artesanal, pois este tipo de pesca continua ocorrendo mesmo

no período de defeso. A criação de um limite de cota não significa a proibição da pesca de piramutaba aos pescadores artesanais ou de subsistência, já que a renda destes depende da venda do pescado, mas sim uma tentativa de quantificar (em biomassa e comprimento) o que poderia ser o ideal a ser pescado. Além disso, também tentar proteger os pré-adultos e adultos que são os que contribuem geneticamente para a manutenção da poplução. Portanto é imprescindível fazer o monitoramento em longo prazo, inclusive o monitoramento genético.

Por se tratar de um bagre que realiza grandes migrações em rios amazônicos de água branca, é necessário um acordo de plano de manejo em conjunto com outros países que compartilham deste mesmo recurso natural, como o Peru, a Bolívia, o Equador e a Colômbia. Não somente a criação de leis específicas de manejo é importante, como também o comprometimento por parte dos pescadores é imprescindível. Desta forma as estratégias de manejo e de monitoramento serão mais eficazes.

A manutenção da diversidade genética intra e interpopulacional além de ser bastante importante para conservação das espécies, também fornece informações úteis e necessárias para uma política de manejo adequada. Aproximadamente 30% dos peixes de água doce do mundo estão ameaçadas (IUCN, 2000). A IUCN (*World Conservation Union*) reconhece que a diversidade genética é de extrema importância e tem que ser uma das prioridades da conservação numa escala mundial (McNeely *et al.*, 1990).

Enfim, os dados genéticos obtidos no presente estudo complementam e fortalecem estudos em outras áreas como os ecológicos, de monitoramento e de desembarque pesqueiro. A genética é uma ferramenta útil e confiável para dar um maior suporte às pesquisas a respeito da piramutaba. Os resultados obtidos no presente trabalho podem ser usados como referência para futuros programas de conservação e assim garantir a diversidade genética da piramutaba.

3 CONCLUSÕES GERAIS

- As estimativas de variabilidade genética tanto com os marcadores de DNAmt (*D-loop*) como de microssatélites mostraram-se congruentes, ou seja, com ambos, as amostras analisadas apresentaram índices de variabilidade similares e consistentes.

- Os 15 locos microssatélites isolados e caracterizados para a piramutaba mostraram-se ótimos marcadores genéticos para esta espécie e para outros *Brachyplatystoma*.

- Baseado nos dois marcadores genéticos utilizados, a piramutaba apresenta uma única população panmítica (um único *pool* gênico), não existindo diferenças entre calha e tributários e também, não foram observadas diferenças significativas no sentido Norte-Sul da distribuição geográfica.

- Não houve diferença na performance das informações genéticas geradas pelos dois marcadores moleculares.

- É necessária a continuidade do monitoramento genético.

- Os resultados podem fornecer subsídios para os programas de conservação.

4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Agostinho, A.A.; Gomes, L.C. 2002. As escadas de peixes no contexto da conservação dos recursos naturais. *Boletim da Sociedade Brasileira de Ictiologia*. Porto Alegre,RS.

Almeida, O. T. 2006. *A indústria pesqueira na Amazônia*. Manaus: IBAMA /Pro Várzea, Coleção Estudos Estratégicos, Manaus, 110 pp.

Amado, M.V.; Hrbek, T.; Gravena, W.; Fantin, C.; Assunção, E.N.; Astolfi-Filho, S.; Farias, I.P. 2008. Isolation and characterization of microsatellite markers for the ornamental discus fish *Symphysodon discus* and cross-species amplification in other Heroini cichlid species. *Molecular Ecology Research,* 8 (6): 1451 – 1453.

Alonso, J.C.; Pirker, L.E.M. 2005. Dinâmica populacional e estado atual da exploração de piramutaba e de dourada. *In:* Fabré, N.N; Barthem, R.B. *O manejo da pesca dos grandes bagres migradores: piramutaba e dourada no eixo Solimões-Amazonas*. IBAMA, PróVárzea, Coleção Documentos Técnicos, Manaus, 114 pp.

Avise, J. C. 1994. *Molecular markers, natural history and evolution.* Chapman & Hall, New York, 511 pp.

Avise, J.C. 2004. *Molecular Markers, Natural History and Evolution*, 2nd edition Sinauer Associates, Sunderland, MA. 684pp.

Barthem, R.B. 1990. *Ecologia e pesca da piramutaba (Brachyplatystoma vaillantii).*Tese de Doutorado.UNICAMP. 268 pp.

Barthem, R. B.; Guerra, H. & Valderrama, M., 1995. *Diagnóstico de los Recursos Hidrobiologicos de la Amazonia*. Tratado de Cooperación Amazonica. Secretaria Pro Tempore. 162 pp.

Barthem, R. B.; Goulding, M. 1997. *Os bagres balizadores: Ecologia, Migração e Conservação de peixes amazônicos.* Sociedade Civil Mamirauá, CNPq. Brasília, 140pp.

Barthem, R.B.; Goulding, M. 2007. *An unexpected ecosystem: the Amazon revealed by the fisheries*. Gráfica Biblos, Lima/Botanical Garden Press.

Barthem, R. B.; Petrere, M. 1995. Fisheries and Population Dynamics of *Brachyplatystoma vaillantii* (Pimelodidae) in the Amazon Estuary. *In:* Armantrout, N.B. (ed.). *Condition of the World's Aquatic Habitat.* Proceedings of the World Fisheries Congress, Theme 1. Oxford and IBH Publishing Co. Pvt., New Delhi.

Batalha, K. 2009. *Genética populacional do jaraqui de escama grossa* (*Semaprochilodus insignis – Prochilodontidae, Characiformes*). Programa de Pós-graduação em Diversidade Biológica, PPG-MDB. Universidade Federal do Amazonas. 57p

Batista, J.S.; Formiga, K.; Farias, I.P.; Alves-Gomes, J.A. 2004. Genetic variability studies of piramutaba (*Brachyplatistoma vaillantii)* and dourada (*B. rousseauxii*) (Pimelodidae: Siluriformes) in the Amazon: basis for management and conservation. International Congress on the Biology of Fish, Manaus, AM, Brazil

Batista, J.S.; Formiga, K.; Farias, I.P.; Alves-Gomes, J.A. 2005. Variabilidade genética da dourada e da piramutaba na bacia amazônica. *In*: Fabré, N.N; Barthem, R.B. *O manejo da pesca dos grandes bagres migradores: piramutaba e dourada no eixo Solimões-Amazonas.* IBAMA, PróVárzea, Coleção Documentos Técnicos, Manaus, 114 pp.

Batista, J.S.; Alves-Gomes, J.A. 2006. Phylogeography of *Brachyplatystoma rousseauxii* (Siluriformes – Pimelodidae) in the Amazon Basin offers preliminary evidence for the first case of "homing" for an Amazonian migratory catfish - *Genetics and Molecular Research* 5 (4): 723-740.

Bayley P. B. & Petrere Jr., M. 1989. Amazon Fisheries: Assessment methods, current status and management options. *Canadian Special Publication on Fisheries and Aquatic Sciences*, 106, 385-398.

Beheregaray, L.B; Möller, L.M.; Schwartz, T.S.; Chao, N. L.; Caccone, A. 2004a. Microsatellite markers for the cardinal tetra *Paracheirodon axelrodi*, a commercially important fish from central Amazônia. *Mol. Ecol. Notes,* 4 (3): 330-332.

Beheregaray, L.B.; Schwartz, T.S.; Möller, L.M.; Call, D.; Chao, N.L.; Caccone, A. 2004b. A set of microsatellite DNA markers for the onelined pencilfish *Nannostomus unifasciatus*, an Amazonian flooded forest fish. *Mol. Ecol. Notes*, 4 (3): 333-335.

Beheregaray, I. B; Piggott, M.; Chao, N. L.; Caccone, A. 2006. Development and characterization of microsatellite markers for the Amazonian blackwing hatchetfish, *Carnegiella marthae* (Teleostei, Gasteropelecidae). *Mol. Ecol. Notes* 5: 787-788.

Boore, J. L. 1999. Animal mitochondrial genomes. *Nucleic Acids Reseach* 27 (8): 1767-1780.

Britto, R.C.C.; Santos,D.A.B.; Torres, M.A.S.F; Braga,M.S. 1975. *A pesca empresarial do Pará*. Belém, IDESP. 72pp.

Brown, W.M. 1980. Polymorphism in mitochondrial DNA of human as revealed by restriction endonocleases analysis. *Proceedings of National Academy of Sciences*, 77: 3605-3609p.

Brown, W.M.; Prager, E.M.; Wang, A.; Wilson, A.C.1982. Mitochondrial DNA sequences of primates: Tempo and mode of evolution. *J. Mol. Evol*., 18: 225-239p.

Brown, S.M.; Hopkins,M.S.; Mitchell,S.E.; Senior,M.L.; Wang, T.Y.; Duncan,R.R.; Gonzalez-Candelas,F.; Kresovich,S. 1996. Multiple methods for the

identification of polymorphic simple sequence repeats (SSRs) in sorghum (*Sorghum bicolor* (L) Moench). *Theoretical and Applied Genetics*, 39: 190-198.

Burgess,W.E.1989. An Atlas of freshewater and marine catfishes. A preliminary survey of the Siluriformes. Apud: Pirker, L. E. M. 2001. *Determinação da Idade e Crescimento da piramutaba Brachyplatystoma vaillantii (Valencienes, 1840), (Siluriformes: Pimelodidae) capturada no Estuário Amazônico*. Dissertação de Mestrado. UFPa/MPEG. Belém-Pará. 76pp.

Chase, M.; Kessely, R.; Bawa, K. 1996. Microsatellite markers for population and conservation genetics of tropical trees. *American Journal of Botany*, v.83, n. 1, p.51-57.

Clement, M.; Posada, D.; Crandall, K. A. 2000. TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Molecular Ecology*, 10: 1657-1660.

Coronel, J. S., Maes, G. E., Claus, S., Van Damme, P. A., Volckaert, F. A. M. 2004. Differential population history in the migratory catfishes *Brachyplatystoma flavicans* and *Pseudoplatystoma fasciatum* (Pimelodidae) from the Bolivian Amazon assessed with nuclear and mitochondrial DNA markers. *Journal of Fish Biology*, 65, 859 – 868.

Da Silva, T.J.; Hrbek, T.; Farias, I.P. 2009. Microsatellite markers for the silver arowana (*Osteoglossum bicirrhosum*, Osteoglossidae, Osteoglossiformes). *Molecular Ecology Resources* 9: 1016-1019.

De Pinna, M.C.C. 1998. Phylogenetic Relationships of Neotropical Siluriformes (Teleostei: Ostariophysi). Historical overview and synthesis of hypothesis.*In*: Malabarba, L.R.; Reis, R.E.; Vari, R.P.; Lucena, Z.M.; Lucena, C.A. (Eds). *Phylogeny and classification of Neotropical fishes*. EDIPUC, Porto Alegre. P. 279-330.

Dias-Neto,J.; Mesquita,J.X. 1988. Potencialidade e explotação dos recursos pesqueiros do Brasil. *Ciencia e Cultura*. 40(5):427-441.

Dittman, A. H.; Quinn. T. P. 1996. Homing in Pacific salmon: mechanisms and ecological basis. *J. Exp. Biol*. 199:83-91

Eigenmann, C.H.; Eigenmann, R.S. 1890. A revision of South American Nematognathi or catfishes. *Occasional Papers of the California Academy of Sciences*, 1:1-8

Excoffier, L.; Smouse, P.E.; Quattro, J.M. 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: Application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics*, 131: 479-491.

Excoffier, L.; Laval, G.; Schneider, S. 2005. Arlequin ver. 3.11: an integrated software package for population genetics data analysis. *Evol. Bioinform.* Online 1:47–50

Fabré, N. N.; Barthem, R.; Carvalho, A.; Angelim, R. 2005. Sistema integrado para o manejo dos grandes bagres migradores. *In:* Fabré, N.N; Barthem, R.B. *O manejo da pesca dos grandes bagres migradores: piramutaba e dourada no eixo Solimões-Amazonas*. IBAMA, PróVárzea, Coleção Documentos Técnicos, Manaus, 114 pp.

Fabré, N. N.; Barthem, R. B. 2005. *O manejo da pesca dos grandes bagres migradores: piramutaba e dourada no eixo Solimões-Amazonas*. Coleção Documentos Técnicos: Estudos Estratégicos. Manaus: IBAMA, Pro Várzea. 114pp.

Farias, I.P.; Hrbek, T.; Brinkmann, H.; Sampaio, I.; Meyer, A. 2003. Characterization and isolation of DNA microsatellite primers for *Arapaima gigas*, an economically important but severely over-exploited fish species of the Amazon basin. *Mol.Ecol. Notes*, 3: 128-130.

Farias, I.P.; Hrbek, T. 2008. Patterns of diversification in the discus fishes (Symphysodon spp., Cichlidae) of the Amazon basin. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 49: 32–43.

Ferreira, M.E.; Grattapaglia, D. 1996. *Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética*. 2.ed. Brasília: Embrapa, Cenargen, 220pp

Formiga-Aquino, K. 2004. *Variabilidade genética da piramutaba - Brachyplatystoma vaillantii (Valenciennes, 1840) (Siluriformes: Pimelodidae) no sistema Estuário-Amazonas-Solimões***.** Dissertação de Mestrado. INPA/UFAM. Manaus. 76pp.

Frankham, R.; Ballou, J.R.; Briscoe, D.A. 2002. *Introduction to Conservation Genetics.* Cambridge University Press, Cambridge, England, 617pp.

Futuyma, D.J. *Biologia evolutiva.* 2.ed. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 1997. 646pp.

Fu, Y.X. 1997. Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics* 1447:915-925.

Garber, A. F.; Tringali, M. D.; Franks, J. S. 2005. Population genetic and phylogeographic structure of wahoo, *Acanthocybium solandri*, from the western central Atlantic and central Pacific Oceans. *Marine Biology*.

Godoy, M.P. 1979. Marcação e migração da piramutaba *Brachyplatystoma vaillantii* (Val., 1840) na bacia amazônica (Pará e Amazonas), Brasil Pisces, Nematognathi, Pimelodidae. B. FCAP. Belém, 11:1-21.

Goldstein, D.B.; Pollock, D.D. 1997. Lauching microsatellities. *Jounal of Heredity*, 88:335-342.

Goldstein, D.B.; Schlötterer, C., editors.1999. Microsatellites: evolution and applications. *Oxford University Press*, New York, NY, 352 pp.

Goodnight, K.F.; Queller, D.C. 1999. Computer software for performing likelihood tests of pedigree relationship using genetic markers. *Molecular. Ecoology*. 8: 1231-1234

Goulding, M. 1979. *Ecologia da pesca no rio Madeira*. CNPq/INPA. Manaus. 172pp.

Hatanaka, T.; Silva, F. H.; Galetti Jr., P. M. 2006. Population substructuring in a migratory freshwater fish *Prochilodus argenteus* (Characiformes, Prochilodontidae) from the São Francisco River. *Genetica,* 126: 153-159.

Hilsdorf, A. W. S.; Marques, D. K. S.; Resende, E. K. 2006. Genética e Conservação de Estoques Pesqueiros de Águas Continentais no Brasil: Situação Atual e Perspectivas. Corumbá: Embrapa Pantanal, 43pp.

Hrbek, T., Farias, I. P.; Crossa, M.; Sampaio, I.; Porto, J. I. R.; Meyer, A. 2005. Population genetic analysis of *Arapaima gigas*, one the largest freshwater fishes of the Amazon basin: implications of this conservation. *Animal Conservation*. 8: 297-308.

Hrbek, T.; Crossa, M.; Farias, I.P. 2007. Conservation strategies for *Arapaima gigas* (Schinz, 1822) and the Amazonian varzea ecosystem. *Brazilian Journal of Biology*, 67: 909-917

IBAMA 1999. V *Reunião do Grupo Permanente de Estudos sobre a Piramutaba*. Brasília: IBAMA, Coleção Meio Ambiente, Série Estudos de Pesca: 92 pp.

IUCN. World Conservation Union. 2000. The 2000 IUCN red list of endangered species. Switzerland: IUCN

Jeffreys, A.J.; Tamaki,K.; Macleod,A.; Monckton,D.G.;Neil,D.L.; Armour,J.A.L. 1994. Complex gene conversion events in germline mutation at human minisatellites. *Nature Genetics*, 6: 136-145.

Kumar, S.; Tamura, K.; Nei, M. 2004. MEGA3: integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. *Briefings in Bioinformatics* 5: 150-163.

Larinier, M. 2000. Environmental issues: dams and fish migration. *In: Thematic review: dams, ecosystem functions and environmental restoration.* Word Commission on Dams. (www.dams.org). Acesso: 24/07/2009

Levinson, G.; Gutman, G.A. 1987b. Slipped-strand mispairing: a major mechanisms for DNA sequence evolution. *Molecular Biology and Evolution*, 4:.203-221

Li, W.H. 1997. *Molecular Evolution*. University of Texas Helth Science Center at Houston. p. 27-30.

Librado P, Rozas J (2009) DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25: 1451-1452

Lundberg, J. G. & Littmann, M. W. 2003. Family Pimelodidae (Long-whiskered catfishes). In: Reis, R. E.; Kullander, S. O. & Ferraris, Jr., C. J. eds. *Check List of the Freshwater Fishes of South and Central America*. Edipucrs, Porto Alegre. p. 432-446

Lundberg, J. G., Akama, A. 2005. *Brachyplatystoma capapretum*: a New Species of Goliath Catfish from the Amazon Basin, with a reclassification of Allied Catfishes (Siluriformes: Pimelodidae). *Copeia,* 3, 492 – 516.

Machado, V.N. 2009. *Análise da variabilidade genética da curimatã, Prochilodus nigricans (Agassis, 1829) na calha do rio Amazonas e seus principais tributários.* Programa de Pós-graduação em Ciências Pesqueiras nos Trópicos – PPG-CIPET. Universidade Federal do Amazonas. 65pp.

Mantel, N. 1967. The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Research*, 27: 209-220.

Martins, S.L. 2000. *Sistemas para a transposição de peixes*. Dissertação de mestrado. Escola Politécnica, Universidade de São Paulo, SP.

McNeely, J. A.; Miller, K. R.; Reid, W. V.; Mittmeier, R. A.; Werner, T. B. 1990. Conserving the world's biological diversity. Switzerland: World Conservation Union, Publication Services

Mees, R. 1974. The Auchenipteridae and Pimelodidae of Suriname (Pisces, Nematognathi). *Zool. Verh*, 132:1-256

Meliciano, N.V. 2008. *Estudo filogeográfico do gênero Pterophyllum, Heckel, 1840 (Cichlidae / Heroini) na Bacia Amazônica, utilizando o gene do citocromo b e morfometria geométrica*. Programa de Pós-Graduação em Genética, Conservação e Biologia Evolutiva. INPA/UFAM. 112p.

Meyer, A. 1993. Evolution of mitochondrial DNA in fishes. *Biochemistry and Molecular Biology of Fishes,* 2: 1–38.

MMA, Instrução Normativa nº 5, de 10 de julho de 2002. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 10 de julho de 2002.

MMA, Instrução Normativa nº 6, de 10 de julho de 2002. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 10 de julho de 2002.

MMA, Instrução Normativa nº 5, de 09 de setembro de 2003. Diário Oficial da União, Brasília, DF, de setembro de 2003.

MMA, Instrução Normativa nº 6, de 07 de junho de 2004. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 07 de junho de 2004.

MMA, Instrução Normativa nº 2, de 01 de março de 2005. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 01 de março de 2005.

MMA, Instrução Normativa nº 7, de 25 de maio de 2005. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 25 de maio de 2005.

MMA, Instrução Normativa nº 16, de 14 de setembro de 2005. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 14 de setembro de 2005.

MMA, Instrução Normativa nº 22, de 30 de novembro de 2005. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 25 de maio de 2005.

MMA, Instrução Normativa nº 7, de 16 de fevereiro de 2006. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 16 de fevereiro de 2006.

Muller, A.C. 1995. *Hidrelétricas, meio ambiente e desenvolvimento*. Itaipu Binacional. Makron Books.

Mullis, K.; Faloona, S. 1987. Specific synthesis of DNA in vitro via Polymerase Chatalysed Chain Reaction. *Methods Enzymol.* 55: 335-350.

Nelson, J. S. 1994. *Fishes of the World*. 4rd edition edn. Jonh Wiley & Sons, Inc. USA. 600pp.

Nelson, J.S. 2006. *Fishes of the World,* 4rd edition edn. John Wiley and Sons, Inc., New York, NY.

Narum, S. R.; Boe, S.; Moran, P.; Powell, M. 2006. Small-scale genetic structure and variation in steelhead of the Grande Ronde River, Oregon, USA. *Transactions of American Fisheries Society*, 135: 979-986.

Nei, M. 1987. *Molecular Evolutionary Genetics.* Columbia University Press, New York, 512 pp.

Nielsen, E.E.; Kenchington, E. 2001. Prioritising marine fish and shell fish populations for conservation: a useful concept? *Fish and Fisheries,* 2: 328-343.

O'Connel, M.; Wright, J.M. 1997. Microsatellite DNA in fishes. *Fish Biol..*7: 314-363.

Ortí, G., Sivasundar A.; Dietz K.; Jégu M. 2008. Phylogeny of the Serrasalmidae (Characiformes) based on mitochondrial DNA sequence. *Genetics and Molecular Biology*. 31: 343-351.

Pereira, L. H. G.; Foresti, F.; Oliveira, C. 2009. Genetic structure of the migratory catfish *Pseudoplatystoma corruscans* (Siluriformes: Pimelodidae) suggests homing behaviour. *Ecology of Freshwater Fish*. 18: 215–225

Porto, J. I. R. 1999. *Análises cariotípicas e sequenciamento de mtDNA de populações de Mylesinus paraschomburgkii (Characiformes, Serrasalmidae) da bacia Amazônica*. Tese de Doutorado. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia/Universidade Federal do Amazonas. Manaus, Amazonas. 120pp.

Poulsen, N. A.; Nielsen, E. E.; Schierup, M. H.; Loeschcke, V.; Gronkjaer, P. 2006. Long-term stability and effective population size in North Sea and Baltic Sea cod (*Gadus morhua*). *Molecular Ecology* 15: 321–331.

Pritchard, J. K.; Stephens, M.; Donnelly, P. 2000. Inference of Population Structure Using Multilocus Genotype Data. *Genetics,* 155: 945–959

Rafalski, J.A.; Vogel, J.M.; Morgante, M.; Powell, W.; Andre, C.; Tingey, S.V. 1996. Generating and using DNA markers in plants. *In*: Birren, B.; Lai, E. *Analysis of non-mammalian genomes - a practical guide*. New York: Academic Press, p.75-134.

Rodrigues, F.C.; Farias, I.P.; Batista, J.S.; Alves-Gomes, J. 2009. Isolation and characterization of microsatellites loci for ‘‘piramutaba’’ (*Brachyplatystoma vaillantii,* Siluriformes: Pimelodidae), one of the commercially most important migratory catfishes in the Amazon Basin. *Conservation Genet Resour. In press.*

Rodríguez, C. A. 1991. Bagres, malleros y cuerderos en el bajo río Caquetá (Amazonia Colombiana). Comercial fisheries in the lower Caqueta River. Estudios de La Amazonia Colombiana. Colombia. 2 : 152 p.

Rozas, J.; Sánchez-DelBarrio, J. C.; Messeguer, X.; Rozas, R. 2003. DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. Bioinformatics, 19: 2496-2497

Rozen, S.; Skaletsky, H.J. 2000. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: Krawetz S, Misener S (eds) *Bioinformatics methods and protocols: methods in molecular biology*. Humana Press, Totowa, NJ

Sambrook, J.; Fritsch, .EF.; Maniatis, T. 1989. Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Springs Harbor Laboratory Press, Cold Springs Harbor, NY

Sanches, A. 2002. *Análise de RAPD em Brycon microlepis (Characidae): um estudo populacional e suas implicações na conservação da espécie*. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de São Carlos, São Paulo,SP. 97p.

Sanches, A. 2007. *Estrutura genética populacional de Brycon hilarii (Characidae) da sub-bacia do rio Miranda e seu significado para programas de conservação.* Tese de doutorado. Universidade Federal de São Carlos. 113pp.

Sanger, F.; Nicklen, S.; Coulson, A. R. 1977. DNA Sequencing with chain terminating inhibitors. *Proceedings of National Academy of Science.* USA, 74: 5463-5467

Santos, Md. C. F. 2004. *Estimativa da variabilidade genética intra e interpopulacional de Tambaqui (Colossoma macropomum, Cuvier) 1818 na bacia Amazônica.* Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de São Carlos. 94pp.

Santos, Md. C. F.; Ruffino, M. L.; Farias, I. P. 2007. High levels of genetic variability and panmixia of the tambaqui *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1816) in the main channel of the Amazon River. Journal of Fish Biology. 71: (Supplement A), 33-44.

Santos, Md.C.F.; Hrbek, T.; Farias, I.P. 2009. Microsatellite markers for the tambaqui (*Colossoma macropomum*, Serrasalmidae, Characiformes), an economically important keystone species of the Amazon River floodplain. *Molecular Ecology Resources* 9: 874 - 876

SANYO TECHNO MARINE. 1998. The fishery resourses study of the Amazon and Tocantins River mouth áreas in the Federative Replublic of Bazil: Final report. Japan International Cooperation Agency (JICA); Museu Paraense Emílio Goeldi (MPEG); Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Renováveis (IBAMA). 331p.

Schmitt, R. 2005. *Filogeografia de Hypopygus lepturus Hoedeman, 1962 (Gymnotiformes: Rhamphycthyidae) ao longo do médio rio Negro, Amazônia*. Dissertação de Mestrado. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia /Universidade Federal do Amazonas. Manaus, Amazonas. 143pp.

Schneider, C.H. 2007. *Filogeografia do peixe ornamental Carnegiella strigata (Characiformes, Gasteropelecidae) de três rios de água preta da Amazônia Central*. Dissertação de Mestrado. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia/ Universidade Federal do Amazonas. Manaus, Amazonas. 70pp.

Schuelke, M. 2000. An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. *Nat. Biotechnol*. 18:233–234

Schlötterer, C. 2000. Evolutionary dynamics of microsatellite DNA. *Chromosoma*, 109: 365–371.

Selkoe, K.A.;Toonen, R.J. 2006. Microsatellites for ecologists: a practical guide to using and evaluating microsatellite markers. *Ecology Letters*, 5: 615-629.

Sivasundar, A.; Bermingham, E.; Ortí, G. 2001. Population structure and biogeography of migratory freshwater fishes (*Prochilodus*: Characiformes) in major South American rivers. *Molecular Ecology* 10: 407-417.

Solé-Cava, A.M. 2001. Biodiversidade molecular e genética da conservação. In: Matioli, S.R.(Eds.). *Biologia Molecular e Evolução*. Holos, Ribeirão Preto, p.172-192.

Souza, E. R. 2008. *Filogeografia do gênero neotropical Fluviphylax (Cyprinodontiformes: Poeciliidae) das bacias do Amazonas e do Orinoco.* Dissertação de Mestrado. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia/ Universidade Federal do Amazonas. Manaus, Amazonas. 122pp.

Sparre, P.; & Venema, S. C. 1995. Introducción a la evolución de recursos pesqueros tropicales. Parte 1. Manual. *FAO Documento Técnico de Pesca*. 306. 1.440 p.

Stamford, M. D. 2001. Mitochondrial and microsatellite DNA diversity throughout the range of a cold adapted freshwater salmonid: Arctic grayling (*Thymallus arcticus*). Peace/Williston Fish and Wildlife Compensation Program, Report No. 248. 90pp.

Tajima, F. 1989. Statistical methods for testing the neutral mutation hypotesis by DNA polymorphism. *Genetics*, 123:585-595.

Tautz, D.; Renz, M. 1984. Simple Sequence are ubiquitous repetitive components of eukaryotic genomes. *Nucleic Acids Research*. 12:4127-4138.

Tautz, D.; Schlötterer,C. 1994. Simple sequences. Current Opinion in Genetics & Development, 4: 832-837

Tenzer I, Ivanissevich Sd, Morgante M, Gessler C .1999. Identification of microsatellite markers and their application to population genetics of *Venturia inaequalis*. *Phytopathology*, 89, 748–753.

Terencio, M.L. 2009*. Estimativa da variabilidade genética da região controle do DNA mitocondrial de Nannostomus eques (Characiformes, Lesbiasinidae) da bacia do rio Negro.* Dissertação de Mestrado. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia/ Universidade Federal do Amazonas. Manaus, Amazonas. 102pp.

Thompson, J. D.; Higging, D. G.; Gibson, T. J. 1994. ClustalW : Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and matrix choice. *Nucleic Acids Research*, 22: 4673-4680

Toffoli, D. R. 2006. *História evolutiva de espécies do gênero Potamotrygon Garman, 1877 (Potamotrygonidae) na Bacia Amazônica*. Dissertação de Mestrado. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia/ Universidade Federal do Amazonas. Manaus, Amazonas. 82pp.

Turner, T.F.; McPhee, M.V.; Campbell, P.; Winemiller, K.O. 2004. Phylogeography and intraspecific genetic variation of prochilodontid fishes endemic to rivers of northern South America. *Journal of Fish Biology*, 64: 186-201.

Vieira, E. Legislação e plano de manejo para a pesca de bagres na bacia amazônica. In: Fabré, N. N.; Barthem, R. B. 2005. *O manejo da pesca dos grandes bagres migradores: piramutaba e dourada no eixo Solimões-Amazonas.* Coleção Documentos Técnicos: Estudos Estratégicos. Manaus: IBAMA, Pro Várzea. 114pp.

Van Oosterhout, C.; Hutchinson, W.F.; Wills, D.P.M.; Shipley, P. 2004. Micro-checker: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Mol Ecol Notes.* 4:535–538

Vrijenhoek, R. C. 1998. Conservation genetics of freshwater fish. *Journal of Fish Biology.* (Supplement A), 53:394-412.

Xia, X.; Xie, Z. 2001. DAMBE: Data analysis in molecular biology and evolution. *J. Hered.,* 92:371-373.

Xu, Z.; Primavera, J. H.; De La Pena, L. D.; Petit, P.; Belak, J.; Alcivar-Warren, A. 2001. Genetic diversity of wild and cultured Black Tiger Shrimp *Penaeus monodon* in the Philippines using microsatellites. *Aquaculture*, 199: 13-40

Waples, R. S. 1998. Evolutionary significant units, distinct population segments, and endangered species act: reply to Pennock and Dimmick. *Conservation Biology* 12(3): 718-721.

Wasko, A.P.; Galetti Jr., P.M. 2002. RAPD analysis in the Neotropical fish *Brycon lundii*: genetic diversity and its implications for the conservation of the species. *Hydrobiologia*, 474: 131-137

Willis, S.C.; Nunes, M.; Montaña, C.G.; Farias, I.P.; Lovejoy, N.R. 2007. Systematics, biogeography, and evolution of the Neotropical peacock basses*Cichla* (Perciformes: Cichlidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution,* 44: 291fa-307

Wolstenholme, D. R. 1992. Animal Mitochondrial DNA: Structure and Evolution. *International Review of Cytology*, 141: 173-216.

Wright, S. 1969. Evolution and the Genetics of Populations. The Theory of Gene Frequencies. University of Chicago Press.

ANEXO I

Sítios Polimórficos da região controle do DNA mitocondrial de piramutaba (*Brachyplatystoma vaillantii*). Haplótipos compartilhados em destaque vermelho.

(TF= Tefé; MD= rio Madeira; JA e JP= rio Japurá; MAO=Manaus)

```
                5         15        25        35        45        55        65        75        85        95        105       115       125
4255TF    TTTCGATAGG GTAATGAACC ACCGAAATTT GTAAGCGCTT TTCATAAATT GGAACTCTTC GAGCTACAAT ATCCCTGAAC AGATAATAAT AGATACTTGT ACTGAATATC CC??TCC??A CCGAAAT
3402TF    TTTCGATAGG GCAATGAATC ATCGAAATTT GTAAGCGCTT TTCGTAGATT GGAACTCCTT AAGCTACAAT ATCTCTAAAC AGATAATAAT AGATACCTAT ACTGGATAAC CCC?TCC??A CCGAAAT
4256TF    TTTCGGTAGG GCAATGAATC ATCGAA?TTT GTAAGCGCTT TTCGTAGATT AGAATTCCTT AAGCTACAAT ATCTCTAAAC AGATAAGAAT AGGTACCTGT ACTAGATAAC CCC?TCCC?A CCGAAAT
4259TF    TTTCGATAGG GCAATGAACC ATCGGAATTT GTAAGCGCTT TTCATAAATT GGAACTCTTC GAGCTACAAT ATCTCCGAAC AGATAATAAT AGATATCTGT ATTGAGTATC CC??T?????A CCGAAAT
4254TF    TTTCGGTAGG GCAGTGAGTC ACATAAATTT GTAAGCGCTT TTCATAAGTC GGAATTCCTC AAGCTACAAT ATCTCCGAAC AAACAATAGT AGATACCTGT ATTGAATATC CCC?TC???A CCGAAAT
1082TF    TTTCGATAGG GCAATGAACC ACCAAAATTT GTAAGCGCTT TTCATAAATT GGAACCCTTC GAACTACAAT ATCTCCGGAC AGATAATGAT AGATATCTGT ATTGAGTATC CC??TCCC?A CCGAAAT
1607TF    TTTCGGTAGG GCAATGAATC ATCGAAA?TT GTAAGCGCTT TTCGTAAATT GGAACTCCTT AAGCTACAAT ATCCCTAAAC AGACAATAAT AGATACCTGT ACTGAATGAC CCC?TC???A CCGAAAT
1620TF    TCTCGGTAGG GCAATGAATC ACCGAAATTT GTAAGCGCTT TTCGTAAATT GGAACTCCTT AAGCTACAAT ATCCCTAAAC AAATAATAGT AGATACCTGT ACTGAATAAC CCC?TCC??A CCGAAAT
3398TF    TTTCGGTAGG GCAATGAATC ATTGAAATTT GTAAGCGCTT TTCGTAAATT GGGACTCCTT AAGCTACAAT GTCCCTAAAC AAACAGTAAT AGATACCTGT ACTGAATAAC CCC?TC???A CCGAAAT
1644TF    TTTCGATAGG GCAATGAACC ACCGAAATTT GTAAGCGCTT TTCATAAATT GGAACTCTTC GAGCTACAAT ATCTCCGAAC AGATAATGAT AGATATCTGT ATTGAGTATC CCC?TCC??A CCGAAAT
1641TF    TTTCGATAGG GCAATGAACC ACCGAAATTT GTAAGCGCTT TTCATAAATT GGAACTCTTC GAGCTACAAT ATCTCTGAAC AGATAATAAT AGATACTTGT GCTGAATATC CCC?TC???A CCGAAAT
1611TF    TTTCGATAGG GCAATGAATC ATCGAAATTT GTAAGCGCTT TTCATAAATT GGAACTCTTC AAGCTACAAT ATCTCCGAAC AGATAATAAT AGATATCTGT ATTGAGTATC CCC?T????A CCGAAAT
3400TF    TTTCGGTGAG GCAATGAATC ATCGAAA?TT GTAAGCGCTT TTCGTAAATT GGAACTCCTT AAGCTACAAT ATCCCTGAAC AGACAATAAT AGGTACCTGT ACTGAATAAC CCC?TC???A CCGAAAT
3401TF    TCTCGGTAGG GCAATGAATC ACCGAAATTT GTAAGCGCTT TTCATAAATT GGAACTCCTT AAGCTACAAT ATCCCTAAAC AGATAATAAC AGATACCTGT GCTGAATAAC CCC?TC???A CCGAAAT
3404TF    TCTCGGTAGG GCAATGAATC ACCGAAATTT GTAAGCGCTT TTCGTAAATT GGAACTCCTT AAGCTACAAT ATCCCTTAAC AGATGATAAT AGATACCTGT ACTGAATAAC CCC?TCC??A CCGAAAT
3405TF    TTTCGATAGG GCAATGAACC ACCGAAATTT GTAAGCGCTT TTCATAAATT GGAACTCTTC GAGCTACAAT ATCTTCGAAC AGATAATAAT AGATATCTGT ATTGAGTATC CCC?TCC??A CCGAAAT
3406TF    TTTCGGTAGG GCAATGAATC ATCGAAATTT GTAAGCGCTT TTCGTAGATT AGAATTCCTT AAGCTACAAC ATCTCTAAAC AGACAATAAT AGATACCTGT ACTGGATAAC CC??TC???A CCGAAAT
3407TF    TCTCGGTAGG GCAATGAATC ACCGAAATTT GTAAGCGCTC TTCGTAAATT GGAGCTCCTT AAGCTACAAT ATCCCTAAAC AGATAATAAT AGGTACCTGT ACTGAATAAC CCC?TCC??A CCGAAAT
3403TF    TTTCGATAGG GCAATGAACC ACCAAAATTT GTAAGCGCTT TTCATAAATT GGAACTCTTC GGGCTACAAT ATCTCCGAGC AGATAATGAT AGATATCTGT ATTGAGTATC CC??TCC??A CCGAAAT
3427TF    TTTCGATAGG GCTATGAACC ACCAAAATTT GTAAGCGCTT TTCATAAATT GGAACTCTTC AAGCTACAAT ATCTCCGAAC AGATAATAAT AGATATCTGT ATTGAGTATC CCC?TCCC?A CCGAAAT
3429TF    TTTCGGTAGG GCAATGAACC ACCAAAATTT GTAAGCGCTT TTCATAAATT GGAACTCTTC GAGCTACAAT ATCTCCGAAC AGATAATAAT AGATATCTGT ATTGAGTATC CCC?TCC??A CCGAAAT
3432TF    TTTCAGTAGG GCAATGAATC ATCGAAATTT GTAAGCGCTT TTCGTAGATT AGAATTCCTT AAGCTACAAT ATCTCTAAAC AGACAAGAAT AGATACCTGT ACTGGATAAC CCC?TC???A CCGAAAT
```

3431TF TTTCGGTAGG GCAATGAATC ATCGAAATTT GTAAGCGCTT TTCGTAAATT GGAACTCCTT AAGCTACAAT ATCCCTAAAC AAACAATAAT AGATACCTGT ACTGAATAAC CCC?TCC??A CCGAAAT

4251TF TTTCGGTAGG GTAATGAATC ATCGAAA?TT GTAGGCGCTT TTCGTAAATT GGAACTCCTT AAGCTACAAT ATCCCTAAAC AGATAATAAT AGATACCTGT ACTGAATAAC CC??TCCC?A CCGAAAT

4253TF TTTCGGTAGG GTAATGAATC ATCGAAATTT GTAAGCGCTT TTCGTAAATC GGAACTCCTT AAGCTACAAT ATCCCTAAAC AGATGATAGT AGATACCCGT ACTGAATAAC CCC?TCCC?A CCGAAAT

4261TF TTTCGGTAGG GCAATGAATC ATCGAAATTT GTAAGCGCTT TTCGTAAATT GGAACTCCTT AAGCTACAAT ATCCCTAAAC AAATAATAAT AGATACCTGT ACTGAATAAC CCC?TC???A CCGAAAT

4249TF TTTCGATAGG GCAATGAATC ATCGAAATTT GTAAGCGCTT TTCGTAAATT GGAACTCTTC AAGCTACAAT ATCCCTAAAC GGACAATAAT AAATACCCGT ACTGAATAAC CC??TCCC?G CCGAAAT

3433TF TTTCGATAGG GTTATGAACC ACCAAAACTT GTAAGCGCTT TTCATAAATT GGAACTCTTC AAGCTACAAT ATCTCCGAAC AGATAATAAT AGATATCTGT ATTGAGTATC CCC?TCCC?A CCGAAAT

3600TF TTTCGGTAGG GCAATGAACC ACCGAAATTT GTAAGCGCTT TTCATAAATT AGAACTCTTT AAGCTACAAT ATCTCCGAAC AGATAATAAT AGATATCTGT ATTGAATAAC CCC?TC???A CCGAAAT

4260TF TTTCGATAGG GCAATGAATC ACCGAAATTT GTAAGCGCTT TTCGTAAATT GGAACTCCTT AAGCTACAAT ATCCCTAAAC AGATAATAAT AGATACCTGT ACTGAATAAC CCC?TC???A CCGAAAT

4262TF TTTCGGTAGG GCAATGAATC ATCGAAATTT GTAAGCGCTT TTCGTAAATT GGAACTTCTT AAGCTACAAT ATCCCTAAAC AGATAATAAT AGATACCTGT ACTGAATAAC CCC?TC???G CCGAAAT

1081TF TCTCGATAGG GCAATGAATC ACCGAAATTT GTAAGCGCTT TTCGTAAATT GGAACTCCTT AAGCTACAAT ATCCCTTAAC AGATAATAGT AGATACCCGT ACTGAATAAC CC??TCCC?A CCGAAAT

1646TF TTTCGGTAGG GTAATGAATC ATCGAAA?TT GTAAGCGCTT TTCGTAAATT GGAACTCCTT AAGCTACAAT ATCCCTGAAC AGATAATAAT AGATACCTGT ACTGAATAAC CC??TCCC?A CCGAAAT

3399TF TTTCGGTAGG GCAATGAATC ATCGAAATTT GTAAGCGCTT TTCGTAGATT AGAATTCCTT AAGCTACATT ATCTCTAAAC AGACAATAAT AGGTACCTGT ACTGGATAAC CCC?T????A CCGAAAT

4252TF TTTCGGTAGG GCAATGAATC ATCGAAATTT GTAAGCGCTT TTCGTAAATT GGAACTCCTT AAGCTACAAT ATCCCTAAAC AGACAATAAT AGATACCTGT ACTGAATAAC CCC?TCC??A CCGAAAT

1148MD TTTCGATAGG GCAATGAACC ACCGAAATTT GTAAGCACTT TTCATAAATT GGAACTCTTC GAGCTACAAT ATCTTCGAAC AGATAATAAT AGATATCTGT ATTGAGTATC CCC?TCC??A CCGAAAT

1149MD TTTCGATAGG GCAATGAACC ACCGAAATTT GTAAGCACTT TTCATAAATT GGAACTCTTC GAGCTACAAT ATCCCTAAAA AGATAATAGT AGATACCTGT ACTGAATAAC CCC?TCC??A CCGAAAT

1150MD TTTCGATAGG GCAATGAACC ACCGAAATTT GTAAGCGCTT TTCATAAATT GGAACTCTTC GAGCTACAGC ATCTCCGAAC AGATAATAAT AGATATCTGT ATTGAGTATC CC??TCC???A CCGAAAT

1151MD TTTCGGTAGA GCAATGAATC ATCGAAATTT GTAAGCGCTT TTCGTAGATT AGAATTCCTT AAGCTACAAT ATCTCTAAAC AGATAATAAT AGGTACCTGT ACTGGATAAC CCCCTCCC?A CCGAAAT

1154MD TTTCGATAGG GCAATGAATC ATCGAAATTT GTAAGCGCTT TTCGTAAATT GGAACTTCTT AAGCTACAAT ATCCCTAAAC GGACAATAAT AGATACCTGT ACTGAATAAC CCC?TCC??G CCGAAAT

1155MD TCTCGGTAGG GCAATGAATT ACCGAAATTT GTAAGCGCTT TTCGTAAATT GGAGCTCCTT AAGCTACAAT ATCCCTAAAC AGATAATAGT AGATACCTGT ACTGAATAAC CCC?T?????A CCGAAAT

1156MD TTTTGATAGG GCAATGAACC ACCGAAATTT GTAAGCGCTT TTCATAAATT GGAACTCTTC GAGCTACAAC ATCTCCGAGC AGATAATAAT AGATATCTGT ATTGAGTATC CCC?TC????A CCCGA?T

1157MD TTTCGATAGG GCAATGAACC ACCAAAATTT GTAAGCGCTT TTCATAAATT GGAACTCTTC AAGCTACAAT ATCTCCGGAC AGATAATGAT AGATATCTGT ATTGAGCATC CCC?TCC??A CCGAAAT

1158MD TTTCGATAGG GCAATGAACC ACCGAAATTT GTAAGCGCTT TTCATAAATT GGAACTCTTC GAGCTACAAT ATCTCCGAAC AAATAATAAT AGATATCTGT ATTGAGTATC CCC?TCC??A CCGAAAT

1161MD TTTCGGTAAG GCAATGAATC ATCGAAA?TT GTAAGCGCTT TTCGTAAACT GGAACTCCTT AAGCTACAAT ATCCCTAAAC AGACAATAAT AGGTACCTGT GCTGAATAAC CC??TCC??A CCGAA?T

1162MD TTTCGGTAGG GCAATGAATC ATCGAAATTT GTAAGCGCTT TTCATAAATT GGAACTTCTT AAGCTACAAC ATCCCTAAAC AGACAATAAT AGATACCTGT ACTGAATAAC CCC?TC???G CCGAAAT

1173MD	TTTCGGTAGG GTAATGAATC ATCGAAA?TT GTAAGCGCTT TTCGTAAATT GGAACTCCTT AAGCTACAAT ATCCCTAAAC AGATAATAAT AGATACCTGT ACTGAATAAC CC??TCCC?A CCGAAAT
1174MD	TTTCGATAGG GCAATGAACC ACCGAAATTT GTAAGCGCTT TTCATAAATT GGAACCCTTC GAGCTACAAT ATCTCCGAAC AGATAATAAT AGATATCTGT ATTGAGTATC CCC?TC???A CCGAAAT
1175MD	TTTCGGTAGG GTAATGAATC ATCGAAA?TT GTAAGCGCTT TTCGTAAATT GGAACTCCTT AAGCTACAAT ATCCCTAAAC AGACAATAAT AGATACCTGT ACTGAATAAC CCC?TCCC?A TCGAAAT
1176MD	TCTCGGTAGG GCAACGAATC ACCGAAATTT GTAAGCGCTT TTCGTGAATT GGAGCTCCTT AAGCTACAAT ATCCCTAAAC AGATAATAGT AGATACCTGT ACTGAATAAC CCC?TC???A CCGAAAT
1177MD	TTTCGATAGG GCAATGAACC ACCGAAATTT GTAAGCGCTT TTCATAAATT GGAACTCTTC GGGCTACAAC ATCTCCGAAC AGATAATAAT AGATATCTGT ATTGAGTATC CC??TCC???A CCCGAAT
1242MD	TTTCGGTAGG GCAATGAATC ATCGAAATTT GTAAGCGCTT TTCGTAGATT AGAATTCCTT AAGCTACAAT ATCTCTAAAC AGATAATAAT AGGTACCTGT ACTAGATAAC CCC?TCCC?A CCGAAAT
1244MD	TTTCGGTAGG GCAATGAATC ATCGAAA?TT GTAAGCGCTT TTCGTAAATT GGAACTCCTT AAGCTACAAT ATCTCTAAAC AGACAATAAT AGATACCTGT ACTGAATAAC CC??TC????A CCGAAAT
1246MD	TTTCGATAGG GCAATGAACC ACCGAAATTT GTAAGCGCTT TTCATAAATT GGAACTCTTC GAGCTACAAC ATCTCCGAAC AGATAATAAT AGATATCTGT ATTGAGTATC CCC?TCCCCA CCGAAAT
1247MD	TTTCGATAGG GCAATGAACC ACCGAAATTT GTAAGCGCCT TTCATAAATT GGAACTCTTC GAGCTACAAT ATCTCCGAAC AGATAATAAT AGATATCTGT ATTGAGTATC CCC?TCCCCA CCGAAAT
1160MD_1248MD	TTTCGGTAGG GCAATGAATC ACCGAAATTT GTAAGCGCTT TTCGTAAATT GGAACTCCTT AAGCTACAAT ATCCCTAAGC AGATAATAAT AGATACCTGT ACTGAATAAC CCC?TCC??A CCGAAAT
1249MD	TTTCGGTAGG GCAATGAATC ATCGAAATTC GTAAGCGCTT TTCATAAATT GGAGCTTCTT AAGCTACAAT ATCCCCGAAC AGACAATAAT AGATACCTGT ACTGAATAAC CCCCTCC??G CCGAAAT
1250MD	TTTCGGTAGG GCAATGAATC ATCGAA?TTT GTAAGCGCTT TTCGTAGATT AGAATTCCTT AAGCTACAAT ATCTCTAAAC AGACAATAAT AGGTACCTGT ACTGGATAAC CCC?TC???A CCGAAAT
1251MD	TCTCGGTAGG GCAATGAATC ACCGAAATTT GTAAGCGCTT TTCGTAAATT GGAACTCCTT AAGCTACAAT ATCCCTAAAC AAATAATAGT AGATACCTGT ACTGAATAAC CCC?TC???A CCGAAAT
3438TF_1252MD	TCTCGGTAGG GCAATGAATC ACCGAAATTT GTAAGCGCTT TTCGTAAATT GGAACTCCTT AAGCTACAAT ATCCCTAAAC AGATAATAGT AGATACCTGT ACTGAATAAC CCC?TC???A CCGAAAT
1253MD	TTTCGATAGG GCAATGAACC ACCAAAATTT GTAAGCGCTT TTCATAAATT AGAACTCTTC GAGCTACAAT ATCTCCGGAC AGATAATGAT AGATATCTGT ATTGAGTATC CC??TCCC?A CCGAA?T
1254MD	TTTCGATAGG GCAATGAACC ACCAAAATTT GTAAGCGCTT TTCATAAATT GGAACTCTTC GGGCTACAAT ATCTCCGAAC AGATAATGAT AGATATCTGT ATTGAGTATC C???TCCC?A CCGAAAT
1255MD	TTTCGGTAGG GCAATGAATC ATCGAAATTT GTAAGCGCTT TTCGTAAATT GGAACTCCTT AAGCTACAAC ATCCCTAAAC GGACGATAAT AGATACCTGT ACTGAATAAC ????TCC??G CCGAAAT
1256MD	TTTCGGTAGG GTAATGAATC ATCGAAATTT GTAAGCGTTT TTCGTAAGTT GGAACTCCTT AAGCTACAAT ATCCCTAAAC AGATAATAAT AGATACCTGT ACTGAATAAC CCCCTC???G CCGAAAT
1258MD	TCTCGGTAGG GCAATGAATC ACCGAAATTT GTAAGCGCTT TTCGTAAATT GGAACTCCTT AAGCTACAAT ATCCCTAAAC AGATAATAAT AGATACCTGT ACTGAATAAC CCC?TC???A CCGAAAT
3561MD	TCTCGGTAGG GCAATGAATC ACCGAAATTT GTAAGCGCTT TTCGTAAATT GGAACTCCTT AAGCTACAAT ATCCCTGAAC AGATAATAGT AGATACCTGT ACTGAATAAC CCCCT????A CCGAAAT
3567MD	TCTCGGTAGG GCAATGAATC ACCGAAATTT GTAAGCGCTT TTCGTAAATT GGAACTCCTT AAGCTACAAT ATCCCTAAAC AGATGATAGT AGATACCTGT GCTGAATAAC CCC?TC???A CCGAAAT
3568MD	TTTCGGTAGG GCAATGAATC ATCGAAATTT GTAAGCGCTT TTCGTAGATT AGAATTCCTT AAGCTACAAT ATCTCTAAAC AGACAATAAT AGGTACCTGT ACTGGATAAC CCC?TCC??A CCGAAAC
3571MD	TCTCGGTAGG GCAATGAATC ACCGAAATTT GTAAGCGCTC TTCGTAAATT GGAACTTCTT AAGCTACAAT ATCCCTAAAC AGATAATAGT AGATACCTGT ACTGAATAAC CC??TC???A CCGAAAT
3572MD	TCTCGGTAGG GCAATGAATC ACCGAAATTT GTAAGCGCTT TTCGTAAATT GGAACTCCTT AAGCTACAAT ATCCCTGAAC AGATAATAGT AGATACCTGT ACTGAATAAC CCC?TCC??A CCGAAAT

3573MD	TCTCGGTAGG GCAATGAATC ACCAAAATTT GTAAGCGCTT TTCGTAAATT GGAACTCCTT AAGCTACAAT ATCCCTGAAC AGATAATAAT AGATACCTGT ACTGAATAAC CCC?TCC??A CCGAAAT
3579MD	TTTCGGTAGA ACAATGAATC ATCGAAATTT GTAAGCGCTT TTCGTAGATT AGAATTCCTT AAGCTACAAT ATCTCTAAAC AGGCAATAAT AGGTACCTGT ACTGGATAAC CCC?TC???A CCGAAAT
4013MD	TTTCGATAGG GCAATGAATT GCCGAAATTT GTAAGCGCTT TTCGTAAATT GGAATTCCTT AAGCTACAAT ATCTCTAAAC AGATAATAAT AGATACCTGT ACTGAATAAC CC??TCCCCA CCGAAAT
4015MD	TTTCGATAGG GCTATGAACC ACCAAAATTT GTAAGCGCTT TTCATAAATT GGAACTCTTC AAGCTACAAT ATCTCCGGAC AGATAATAAT AGATATCTGT ATTGAGTATC CCC?TCC??A CCGAAAT
5019MD	TTTCGGTAGG GCAATGGATT ATCGAAATTT GTAAGCGCTT TTCGTAAATT GGAACTTCTT AAGCTACAAT ATCCCTGAAT AGACAATAAT AGATACCTGC ACTGAATAAC CCC?TCCC?G CCGAAAT
1352JA	TTTCGATAGG GCAATGAACC ACCAAAATTT GTAAGCGCTT TTCATAAATT GGAACTCTTC GAGCTACAAT ATCTCCGGAC AGATAATGAT AGACATCTGT ATTGAGTATC CC??TCC??A CCGAAAT
1353JA	TTTCGGTAAG GCAATGAATC ATCGAAA?TT GTAAGCGCTT TTCGTAAATT GGAACTCCTT AAGCTACAAT ATCTCTGAAC AGACAATAAT AGGTACCTGT ACCGAATAAC CCC?TC???A CCGAAAT
1354JA	TTTCGATAGG GCAATGAACC ACCGAAATTT GTAAGCGCTT TTCATGAATT GGAACTCTTC GAGCTACAAT ATCTCCGAAC AGATAATGAT AGATATCTGT ATTGAGTATC CC??TCCC?A CCGAAAT
1356JA	TTTCGGTAGG GCAATGAATC ACCGAAATTT GTAAGCGCTT TTCGTAAATT GGAACTCCTT AAGCTACAAT ATCCCTAAGC AGATAATAAT AGATACCTGT ACTGAATAAC CC??TC???A CCGAAAT
1357JA	TTTCGATAGG GCAATGAACC ACCGAAATTT GTAAGCGCTT TTCATAAATT GGAACTCTTC GAGCTACAAC ATCTCCGAAC AGATAATAAT AGATATCTGT ATTGAGTATC CCC?TCCC?A CCGAAAT
1358JA	TTTCGGTAGG GTAATGAATC ATCGAAACTT GTAAGCGCTT TTCGTAAATT GGAACTCCTT AAGCTACAAT ATTCCTAAAC AGACAATAAT AGATACCTGT ACTGAATAAC CCC?TC???A CCGAAAT
1359JA	TTTCGGTAGG GCAGTGAATC ATCGAAATTT GTAAGCGCTT TTCGTAAATT GGAACTCCTT AAGCTACAAT ATCCCCAAAC AAACAATAAT AGATACCTGT ACTGAATAAC CCC?TCCC?A CCGAAAT
1361JA	TTTCGATAGG GCAATGAACC ACCGAAATTT GTAAACGCTT TTCATAAATT GGAACTCTTC GAGCTACAAT ACCTCCGAAC AGATAATAAT AGATATCTGT ATTGAGTATC CCC?TC???A CCGA?AT
1362JA	TTTCGATAGG GCAATGAACC ACCAAAATTT GTAAACGCTT TTCATAAATT GGAACTCTTC GGGCTACAAC ATTTCCGAAC AGATAATAAT AGATATCTGT ATTGAGTATC C???TCCC?A CCGAAAT
1363JA	TTTCGGTAGG GCAATGAATC ATCGAAATTT GTAAGCGCTT TTCGTAAATT GGAACTCCTT AAGCTACAAC ATCCCTAAAC AAACAGTAAT AGATACCTGT ACTGAATAAC CCC?TCC??A CGGAAAT
1364JA	TTTCGGTAGG GCAATGAATC ACCGAAATTT GTAAGCGCTT TTCGTAAATT GGAACTCCTT AAGCTACAAT ATCCCTAAAC AGATAATAAT AGATACCTGT ACTGAATAAC CCC?TCCCCA CCGAAAT
1365JA	TCTCGGTAGG GCAATGAATC ACCGAAATTT GTAAGCGCTT TTCGTAAATT GGAACTCCTT AAGCTACAAT ATCCCTAAAC AGATGATAGT AGACACCTGT ACTGAATAAC CCC?TC???A CCGAAAT
1366JA	TTTCGATAGG GCAATGAACC ACCGAAATTT GTAAACGCTT TTCATAAATT GGAACTCTTC GAGCTACAAT ATCTTCGAAC AGATAATAAT AGATATCTGT ATTGAGTAT? CC??TCCC?A CCGAAAT
1367JA	TTTCGGTAGG GCAATGAATC ATCGAAATTT GTAAGCGCTT TTCGTAGATT AGAATTCCTT AAGCTACAAT ACCTCTAAAC AAACAATAAT AGGTACCTGT ACTGGATAAC CCC?TCC??A CTGAAAT
1368JA	TTTCGATAGG GCAATGAACC ACCAAAATTT GTAAACGCTT TTCATAAATT GGAACTCTTC GGGCTACAAT ATCTCCGAAC AGATAATAAT AGATATCTGT ATTGAGTATC C???CCCC?A CCGAAAT
1370JA	TTTCGGTAGG GCAATAGATT ATCGAAATTT GTAAGCGCTT TTCGTAAATT GGAACTTCTT AAGCTACAAT ATCCCTGAAT AAACAATAAT AGATACCTGT ACTGAATAAC CC??TCC??G CCGAAAT
1371JA	TTTCGATAGG GCAATGAACC ACCAAAATTT ATAAGCGCTT TTCATAAATT GGAACTCTTC GAGCTGCAAT ATCTCCGGAC AGATAATGAT AGATATCTGT ATTGAGTATC CC??TCCC?A CCGAAAT
1372JA	TTTCGGTAGG GCAATGAATC ATCGAAATTT GTAAGCGCTT TTCGTAGATT AGAATTCCTT AAGCTACAAT ATCTCTAAAC AGACAATAAT AGGTACCTGT GCTGGATAAC CCC?TCC??A CCGAAAT
1360JA_1374JA	TTTCGATAGG GCAATGAACC ACCGAAATTT GTAAGCGCTT TTCATAAATT GGAACTCTTC GAGCTACAAT ATCTCCGAAC AGATAATGAT AGATATCTGT ATTGAGTATC CC??TCC??A CCGAAAT

1375JA	TTTCGATAGG GCAATGAACC ACCAAAATTT GCAAGCGCTT TTCATAAATT GGAACTCTTC GGGCTACAAT ATCTCCGAAC AGATAATAAT AGATATCTGT ATTGAGTATC CC??TC???A CCGAAAT
1376JA	TTTCGATAGG GCAATGAACC ACCAAAATTT GTAAGCGCTT TTCATAAATT GGAACTCTTC GGGCTACAAT ATCTCCGAAC AGATAATAAT AGATATCTGT ATTGAGTATC CC??TC???A CCGAAAT
1377JA	TTTCGGTAGG GCAATGAATC ATCGAAATTT GTAAGCGCTT TTCGTAGATT AGAATTCCTT AAGGTACAAT ATCTCTGAGC AGACAATAAT AGGTACCTGT ACCGAATAAC CCC?TC???A CCGAAAT
1378JA	TTTCGGTAGG GCAATGAATC ATCGAAATTT GTAAGCGCTT TTCGTAGATT AGAATTCCTT AAGCTACAAT ATCTCTGAGC AGACAATAAT AGGTACCTGT ACCGAATAAC CCC?TC???A CCGAAAT
1379JA	TTTCGATAGG GCAATGAATC ATCGAAATTT GTAAGCGCTT TTCGTAAATT GAAACTTCTT AAGCTACAAT ATCCCTAAAC AGACAATAAT AGATACCCGT ACTGAATAAC CCC?TCCC?G CCGAAAT
1380JA	TTTCGATAGG GTAGTGAGTC ACAGAAATTT GTAAGTGCTT CTCATAAGTC GGAATTCCTC AAGCTACAAT ATTTCCGAAC AGACAATAGT AGATACCTGT ATTGAATATC CC??TCC??A CCGAAAT
1369JP	TTTCGATAGG GCAATGAACC ACCGAAATTT GTAAGCGCTT TTCATAAATT GGAACTCTTC GAGCTACAAT ATCTCCGAAC AGATAATAAT AGATATCTGT ATTGAGTATC CC??TCCC?A CCGAAAT
1373JP	TTTCGGTAGG GTAATGAATC ATCGAAATTT GTAAGCGCTT TTCATAAATT GGAACTCTTC GAGCTACAAT ATCCCCAAAC AGATAATGAT AGATACCCGT ACTGAATAAC CC??TCCC?A CCGAAAT
1351JP	TTTCGATAGG GCAATGAATC ATCGAAATTT GCAAGCGCTT TTCATAAATT GGAACTCTTC GAGCTACAAT ATCCCTAAAC AGATAATAAT AGATACCCGT ACTGAATAAC CC??TCCCCA CCGAAAT
9179MAO	TTTCGATAGG GCAATGAACC ACCAAAATTT GTAAGCGCTT TCCATAAATT GGAACTCTTC GGGCTACAAT ATCTCCGAAC AGATAATAAT AGATATCTGT ATTGAGTATC CC??TCC??A CCGAAAT
1011MAO	TTTCGATAGG GCAATGAATC ATCGAAATTT GTAAGCGCTT TTCGTAAATT GGAACTTCTT AAGCTACAAT ATCCCTAAAC AGATAATAAT AGATACCTGT ACTGAATAAC CCC?TCCCCG CCGAAAT
1012MAO	TCTCGGTAGG GCAATGAATC ACCGAAATTT GTAAGCGCTT TTCGTAAATT GGAACTCCTT AAGCTACAAT ATCCCTAAAC AGATAGTAGT GGATACCTGT ACTGAATAAC CCC?T????A CCGAAAT
1549MAO	TTTCGATAGG GCAATGAACC ACCAAAATTT GTAAGCGCTT TTCATAAATT GGAACTCTTC GGGCTACAAT ATCTCCGAAC AGATAATAAT AGATATCTGT ATTGAGTATC CCC?TCCC?A CCGAAAT
1550MAO	TTTCGATAGG GCAATGAATC GTTGAAATTT GTAAGCGCTT TTCGTAAATT GAAACTTCTT AAGCTACAAT ATCCCTAAAC AGACAATAAT AGATACCCGT ACTGAATAAC CC??TCCC?G CCGAAAT
1552MAO	TTTCGAGAGG GCAATGAATC ATCGAAATTT GCAAGCGCTT TTCGTAAATT GAAACTTCTT AAGCTACAAT ATCCCTAAAC AGACAATAAT AGATACCCGT ACTGAATAAC CCC?TCCC?G CCGAAAT
1005MAO	TTTCGGTAGG GCAATGAATC ACCGAAATTT GTAAGCGCTT TTCGTAAATT GGAACTTCTT AAGCTACAAT ATCCCTAAAC AGATAATAAT AGATACCTGT ACTGAATAAC CC??TC???A CCGAAAT
1553MAO	TCTCGGTAGG GCAATGAATC ACCGAAATTT GTAAGCGCTT TTCGTAAATT GGAACTCCTT AAGCGACAAT ATCCTTGAAC AGATAATAGT AGATACCTGT ACTGAATAAC CCCCTC???A CCGAAAT
3604TF_1554MAO	TTTCGGTAGG GCAATGAATC ACCGAAATTT GTAAGCGCTT TTCGTAAATT GGAACTCCTT AAGCTACAAT ATCCCTGAGC AGATAATAAT AGATACCTGT ACTGAATAAC CCC?TCC??A CCGAAAT
1555MAO	TTTCGG?AAG GCAATGAATC ATCGAAA?TT GTAAGCGCTT TTCGTAAATT GGAACTCCTT AAGCTACAAT ATCCCTGAAC AGACAATAAT AGGTACCTGT ACTGAATAAC CCC?TC???A CCGAAAT
1556MAO	TTTCGGTAGG GCAATGAACC ACCAAAATTT GTAAGCGCTT TTCATAAATT GGAACTCTTC AGGCTACAAT ATCTCCGAAC AGATAATAAT AGATATCTGT ATTGAGTATC CCC?TC???A CCGAAAT
2534MAO	TTTCGGGAGG GCAACGAATC ACCGAAATTT GTAAGCGCTT TTCGTAAATT GGAACTCTTT AAGCTACAAT ATCCCTAAAC AGATGATAGT AGACACCTGT ACTGAATAAC CCC?TC???A CCGAAAT
2697MAO	TTTCGATAGG GCAATGAACC ACTGAAATTT GTAAGCGCTT TTCATAAATT GGAACTCTTC GAGCTACAAT ATCTCCGAAC AGATAATAAT AGATATCTGT ATTGAGTATC CC??TCCC?A CCGAAAT
2685MAO	TTTCGATAGG GCAATGAACC ACCGAGATTT GTAAGCGCTT TTCATAAATT GGAACTCTTC AAGCTACAAT ATCTCCGAAC AGATAATAAT AGATATCTGT ATTGAGTATC CCC?TCCC?A CCGAAAT
2686MAO	TCTCGGTAGG GCAATGAATC ACCGAAATTT GTAAGCGCTT TTCGTAAATT GGAACTCCTT AAGCTACAAT ATCCCTGAAC AGATAATAGT AGATACCTGT ACTGAATAAC CCC?T????A CCGAAAT

2690MAO	TTTCGATAGG GCAATGAATC ATTGAAATTT GTAAGCGCTT TTCGTAAATT GAAACTTCTT AAGCTACAAT ATCCCTAAAC AGACAATAAT AGATACCCGT ACTGAATAAC CC??TCC??G CCGAAAT
2696MAO	TTTCGGTAGG GCAATGAACC ACCAAAATCT GTAAGCGCTT TTCATAAATT GGAACTCTTC GGGCTACAAT ATCTCCGAAC AGATAATGAT AGATATCTGT ATTGAGTATC CC??TC???A CCGAAAT
2698MAO	TTTCGGTAGA GCAATGAATC ATCGATATTT GTAAGCGCTT TTCGTAGATT AGAATTCCTT AAGCTACAAT ATCTCTAAAC AGACAATAAC AGGTACCTGT ACTGGATAAC CCC?TCC??A CCGAAAT
2699MAO	TTTTGATAGG GCAATGAACC ACCGAAATTT GTAAGCGCTT TTCATAAATT GGAACTCTCC GAGCTACAAT ATCTCCGAAC AGATAATAAT AGATATCTGT ATCGAGTATC CCC?T????A CCGAAAT
2695MAO	TTTCGGTAGG GCAATGAATC ATCGAAATTT GTAAGCGCTT TTCGTAAATT GGAACTCCTT AAGCTACAAT ATCCCTAAAC AGACAATAAT AGATGCCTGT ACTGAATGAC CC??TC???A CCGAAAT
4034MAO	TTTCGGTAGG GCAATGAATC ATCGAA?TTT GTAAGCGCTT TTCGTAGATT AGAATTCCTT AAGCTACAAT ATCTCTAAAC AGACAATAAT AGGTACCTGT ACTGGATAAC CCC?TCC??A CCGAAAT
4037MAO	TTTCGGTAGG GCAATGAATC ATCGAAATTT GTAAGCGCTT TTCGTAGATT AGAATTCCTT AAGCTACAAT ATCTCTAAAC AGACAATAAT AGGTACCTGT ACCGAATAAC CCC?TC???A CCGAAAT
1551MAO_4044MAO	TTTCGGTAGG GTAATGAATC ATCGAAATTT GTAAGCGCTT TTCGTAAATC GGAACTCCTT AAGCTACAAT ATCCCCAAAC AGATAATGAT AGATACCCGT ACTGAATAAC CCC?TCC??G CCGAAAT
4555MAO	TCTCGGTAGG GCAATGAATC ACCGAAATTT GTAAGCGCTT TTCGTAAATT GGAACTCCTT AAGCTACAAT ATCCCTAAAC AGATGATAGT AGATACCTGT ACTGAATAAC CC??TCCC?A CCGAAAT
4556MAO	TTTCGGTAGA GCAATGAATC ATCGAAATTT GTAAGCGCTT TTCGTAGATT AGAATTCCTT AAGCTACAAT ATCTCTGAAC AGACAATAAT AGGTACCTGT ACCGGATAAC CCC?TCC??A CCGAAAT
4557MAO	TTTCGATAGG GCAATGAACC ACCAAAATTT GTAAGCGCTT TTCATAAATT GGAACTCTTC GAGCTACAAT ATCTCCGAAC AGATAATAAC AGATATCTGT GTTGAGTATC CCC?TC???A CCGAAAT
5402MAO	TTCCGATAGG GCAATGAACC ACCAAAATTT GTAAGCGCTT TTTATAAATT GGAACTCTTC GGGCTACAAT ATCTCCGAAC AGATAATAAT AGATATCTGT ATTGAGTATC CCC?TCC??A CCGAAAT
4559MAO	TCTCGGTAGG GCAATGAATC ACCGAAATTT GTGAGCGCTT TTCGTAAATT GGAACTCCTT AAGCTACAAT ATCCCTAAAC AGATAATAGT AGATACCTGT ACTGAATAAC CCC?TC???A CCGAAAT
3140MAO	TTTCGGTAGG GCAATGAATC ATCGAAATTT GTAAGCGCTT TTCGTAAATT GGAACTTCTT AAGCTACAAT ATCCCTAAAC AAATAATAAT AGATACCTGT ACTGAATAAC CC??TCCC?A CCGAAAT
4258TF_3142MAO_5467MAO	TTTCGATAGG GCAATGAACC ACCGAAATTT GTAAGCGCTT TTCATAAATT GGAACTCTTC GAGCTACAAT ATCTCCGAAC AGATAATAAT AGATATCTGT ATTGAGTATC CCC?TC???A CCGAAAT
5673MAO	ATTCGATAGG GCAATGAATC ATCGAAATTT GTAAGCGCTT TTCGTAAATT GGAACTTCTT AAGCTACGAT ATCCCTAAAC AGATAATAAT AAATACCTGT ACTGAATAAC CCC?TCCC?G CCGAAAT
9165MAO	TCTCGGTAGG GCAACGAATC ACCGAAATTT GTAAGCGCTT TTCGTAAATT GGAACTCCTT AAGCTAGAAT ATCCCTAAAC AGATAATAGT AGATACCTGT ACTGAATAAC CCC?TC???A CCGAAAT
9168MAO	TTTCGGTAGG GTAATGAATC ATCGAAA?TT GTAAGCGCTT TTCGTAAATT GGAACTTCTT AAGCTACAAT ATCCCTAAAC AGACAATAAT AGATACCTGT ACTGAATAAC CC??TCC??A CCGAAAT
9177MAO	TTTCGAGAGG GCAATGAACC ACCGAAATTT GTAAGCGCTT TTCACAAATT GGAACTCTTC AAGCTACAAT ATCTCCAAAC AGATAATAAT AGATATCTGT ATTGAGTATC CCC?TC???A CCGAAAT
1257MD_9178MAO	TTTCGATAGG GCAATGAACC ACCGAAATTT GTAAGCGCTT TTCATAAATT GGAACTCTTC GAGCTACAAT ATCTCCGAAC AGATAATAAT AGATATCTGT ATTGAGTATC CCC?TCC??A CCGAAAT
2689MAO	TTTCGATAGG GCAATGAACC ACCAAAATTT GTAAGCGCTT TTCATAAATT GGAACTCTTC GGGCTACAAT ATCTCCGAAC AGATAATAAT AGATATCTGT ATTGAGTATC CC??TCCCCA CCGAAAT
4558MAO	TTTCGGTAGG GCAATGAATC ACCGAAATTT GTAAGCGCTT TTCGTAAATT GGAACTTCTT AAGCTACAAT ATCCCTAAAC AGATGATAAT AGATACCTGT ACTGAATAAC CCC?TC???A CCGAAAT
3150MAO	TTTCGATAGG GCAATGAACC ACCAAAATTT GTAAGCGCTT TTCATAAATT GGAACTCTTC GGGCTACAAT ATCTCCGAAC AGATAATGAT AGATATCTGT ATTGAGTATC CC??TCC??A CCGAAAT

ANEXO II

Conservation Genet Resour
DOI 10.1007/s12686-009-9084-x

TECHNICAL NOTE

Isolation and characterization of microsatellites loci for "piramutaba" (*Brachyplatystoma vaillantii*, Siluriformes: Pimelodidae), one of the commercially most important migratory catfishes in the Amazon Basin

Fabiola C. Rodrigues · Izeni P. Farias · Jacqueline S. Batista · José Alves-Gomes

Received: 14 August 2009 / Accepted: 20 August 2009
© Springer Science+Business Media B.V. 2009

Abstract The piramutaba (*Brachyplatystoma vaillantii*) is one of the largest and most important migratory catfishes of the Amazon Basin. Due to its historical commercial importance, this species is now considered overfished. Fifteen polymorphic microsatellite markers were characterized in order to be used as tools to address aspects of the biology and conservation of this species. The number of alleles varied from 4 to 26 per locus, with an average of 11.33 alleles per locus, in 36–48 individuals tested. The observed and expected heterozygosities varied from 0.30176 to 0.95281, and from 0.25532 to 0.97778, respectively. All the microsatellites were found to be in Hardy–Weinberg equilibrium, and no linkage disequilibrium was observed. The transferability of these markers was tested in others *Brachyplatystoma* with seven to 12 loci being polymorphic per species. The results indicate that these markers are adequate for genetic studies applied to the management and conservation of the piramutaba, and others *Brachyplatystoma* species.

F. C. Rodrigues · J. S. Batista · J. Alves-Gomes
Laboratório Temático de Biologia Molecular (LTBM), Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Av. André Araújo, No. 2936, CEP 69060-001 Manaus, AM, Brazil

I. P. Farias (✉)
Laboratório de Evolução e Genética Animal, Departamento de Biologia, Universidade Federal do Amazonas, Av. Rodrigo Octávio Jordão Ramos 3000, 69077-000 Manaus, AM, Brazil
e-mail: izeni_farias@ufam.edu.br

J. S. Batista · J. Alves-Gomes
Coordenação de Pesquisas em Biologia Aquática, Laboratório de Fisiologia Comportamental e Evolução (LFCE), Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Av. André Araújo, No. 2936, CEP 69060-001 Manaus, AM, Brazil

Keywords Piramutaba · Microsatellites · *Brachyplatystoma vaillantii* · Migratory catfish · Amazon

Introduction

The "piramutaba" (*Brachyplatystoma vaillantii*) is a large migratory catfish belonging to the Family Pimelodidae (Nelson 2006). In the course of its life cycle, the species makes long migrations for reproduction and preliminary genetic results indicate that a single stock inhabits the entire Amazonian Basin (Batista et al. 2004). The current hypothesis suggests that shoals of adults migrate upriver to spawn in the head waters of the white-water affluent of western Amazon Basin. The larvae are then carried downstream by the current towards the estuary which acts as a nursery and growth area. Upon reaching adulthood, the cycle is repeated (Barthem and Goulding 2007).This species occurs in greatest abundance in the main channel and the tributaries of the Solimões-Amazonas basin and in the mouth of the Amazonas River (Barthem and Goulding 1997).

The piramutaba is one of the most commonly caught species by the industrial and artisanal fishing fleets in the Amazon. Its commerce encompass a great deal of international trade, including several Amazonian countries and generates revenues amounting to several millions of dollars (Almeida 2006; Barthem and Goulding 2007). However, surveys of unloaded fish catches show that the piramutaba yield has been suffering a decline over the years and, in fact, evidence point to a progressive overfishing, as indicated by constant reductions in size commercialized (Alonso and Pirker 2005). In view of the fact that this species is an important source of income for thousands of

Published online: 12 September 2009

Table 1 Characterization of the 15 microsatellites loci in 36–48 individuals of piramutaba (*Brachyplatystoma vaillantii*) from municipality of Tefé, Amazonas, Brazil

GenBank accession no.	Locus	Primer (5′–3′)	Repeat motif	T_a (°C)	Size range (bp)	N	N_A	H_O	H_E	P
GQ468587	BV_5	F-CCTCAGTGACCTGCAGAGG R-ACCCCACAACCTCCACCT	$(GA)_7$ ca $(GA)_7$ca $(GA)_5$	60	209–227	36	7	0.667	0.769	0.319
GQ468588	BV_6	F-CACATCAACAGTGCCTTGC R-AGACAGGCCGTGAACCTG	$(CA)_{14}$	52	273–293	40	10	0.725	0.857	0.697
GQ468589	BV_8	F-TAGCGGCATCACCATCATC R-TTTCCTGCAGCTTGCACAC	$(TC)_{25}$	60	163–249	45	26	0.756	0.953	0.000*
GQ468590	BV_10	F-AGAATCGCACGTGTTCTGC R-CAGTCAGCCAAGAGGAAATG	$(TC)_{24}$	52	213–237	44	13	0.909	0.909	0.900
GQ468591	BV_11	F-TGGAGCTGTTGGATGTGTC R-ATGACTGAGCTGCCAGGACT	$(CT)_9$ gt $(CT)_4$ $(CA)_{12}$	64	149–189	45	15	0.978	0.903	0.538
GQ468592	BV_13	F-CCTAGTGCCTATGGAGCCTCT R-CATCTGACGAGAGGCGAGT	$(CT)_{25}$	52	173–211	46	18	0.913	0.915	0.088
GQ468593	BV_17	F-CGGGTTGTGGATATGGTTC R-CCGCAAAGACACACAAAGC	$(AG)_{10}$ gg $(AG)_{12}$	60	195–229	42	12	0.833	0.881	0.013
GQ468594	BV_18	F-CCACCCACCCACCTGTTA R-TGTTTCCAAGGCAACCAC	$(AG)_5$ cg $(AG)_5$ cg $(AG)_7$ at $(AG)_6$	52	171–185	47	4	0.255	0.302	0.060
GQ468595	BV_20	F-TGCACAGATGAGGCAGCTA R-CCGGTTTCCTCTTACAGTCC	$(AC)_{11}$	52	142–154	48	9	0.729	0.837	0.057
GQ468596	BV_21	F-CGGACCATACAGCAAAACG R-CTCAGTCTGTCCCACAAGCA	$(TC)_8$ tg $(TC)_7$	53	162–182	46	9	0.783	0.812	0.512
GQ468597	BV_23	F-GAGTCTGTCGTCTGGGTGGT R-AGGTGCCCAGTCAGCATC	$(AG)_8$	64	170–196	45	8	0.756	0.758	0.023
GQ468598	BV_25	F-TCACTGAGGTTCAGGTTAGGG R-CAGCCACCAACATTTGTC	$(TG)_{10}$	54	173–215	46	15	0.891	0.892	0.145
GQ468599	BV_27	F-CTGCTGGTTTCTCATTCAGC R-TGACCTAGCGAGAGTACCTG	$(AG)_7$ aagcagaa $(AG)_5$ aa $(AG)_7$	64	177–199	46	7	0.609	0.635	0.042
GQ468600	BV_29	F-CCCACACAGAGACCATTATC R-GGCTGAGCTGAATGAAGCA	$(GA)_7$ a $(AG)_5$ aa $(AG)_7$	64	274–304	40	12	0.875	0.826	0.489
GQ468601	BV_30	F-CAGACAGAGACCTAGAAAGAGG R-CCGCCATCTCTTTCTCACTT	$(TG)_7$	54	174–182	45	5	0.511	0.591	0.172

T_a, PCR annealing temperature, N the number of successfully genotyped individuals sampled for each locus, N_A number of alleles, H_O observed heterozygosity, H_E expected heterozygosity

* Significant after Bonferroni correction

Table 2 Cross-species amplification results of 15 microsatellite loci developed for *Brachyplatystoma vaillantii* and tested in other *Brachyplatystoma* species

Locus	*B. platynemum* $N = 4$	N_A	*B. juruense* $N = 4$	N_A	*B. tigrinum* $N = 4$	N_A	*B. capapretum* $N = 4$	N_A	*B. filamentosum* $N = 4$	N_A	*B.rousseauxii* $N = 4$	N_A
BV_5	243	1	245	1	–		–		253	1	–	
BV_6	219–231	3	–		–		–		–		–	
BV_8	175–181	4	179–201	3	179–201	3	187	1	–		201–205	2
BV_10	239–247	3	235–247	5	259–273	2	259	1	255–293	5	267–293	5
BV_11	192–206	7	186–192	3	184–202	2	184	1	196–200	3	182–188	3
BV_13	212–228	4	162–232	5	230–232	2	170–222	3	158–190	4	146–198	7
BV_17	216–242	4	212–228	2	212	1	212	1	218–228	3	218–234	7
BV_18	185–201	6	189–197	5	175–189	3	171–199	3	175–189	4	177–189	3
BV_20	170	1	168–178	3	144–176	4	144–176	2	144–172	2	144–186	3
BV_21	184–198	3	184–198	3	182–196	4	184–196	2	184–196	2	184–196	2
BV_23	201–207		201–203		199–237		197–237		221		219–231	
BV_25	211–237	3	211	1	209–231	5	211–229	2	205–229	3	197–239	6
BV_27	207		205		205–227		205		203–205		213–239	
BV_29	–		–		–		–		–		–	
BV_30	199	1	149–199	3	147–197	3	151–197	3	149–199	4	149–197	3

N number of individual tested, N_A number of alleles, –, no amplification

families in the Amazon, and given its excessive catch rate, it became necessary to learn further about its biology, life cycle and genetic diversity. Such information is crucial for stock management.

With suitable molecular markers such as microsatellites one can provide information on the genetic diversity of the natural populations of piramutaba, and generate data for use in sustainable management and conservation planning. Therefore, we isolated and characterized 15 polymorphic microsatellite markers for piramutaba, which were also tested in six other *Brachyplatystoma* species.

Total genomic DNA was extracted from a pool of seven individuals collected in the municipality of Tefé (Amazonas, Brazil). The tissues were dissolved and digested with a proteinase K/sodium dodecyl sulphate (SDS) solution followed by phenol and chloroform extraction (Sambrook et al. 1989). Microsatellite loci were isolated and identified from a partial genomic library enriched for CT 13 repeats following the protocol of Tenzer et al. (1999) as modified by Farias et al. (2003). Enriched DNA was ligated into an Invitrogen pCR II-TOPO cloning vector and transformed into chemically competent *Escherichia coli* cells supplied in the TOPO TA cloning kit following the manufacturer's recommendations. The transformed cells were grown overnight on a 1 × circle grow/Amp (Sambrook et al. 1989) agar plate. Individual colonies were picked, and regrown for 16 h in a 96-well culture plate containing 150 µl of liquid 1 × LB/Amp (100 µg/ml) solution. Polymerase chain reaction (PCR) amplification using M13 forward (−20) and M13 reverse primers was performed directly on the bacterial cultures following the manufacturer's protocol. PCR products were purified using GFX spin-columns (GE Healthcare), and sequencing reactions were performed with the M13 primers using DYEnamic ET *dye terminator* kit (GE Healthcare). Sequencing products were resolved on a MegaBACE 1000 (GE Healthcare).

Three hundred and eight-seven clones were sequenced and microsatellite repeats were found in 222 sequenced clones. Primers annealing to flanking regions were designed for 30 clones using the program Primer3 (Rozen and Skaletsky 2000). Each forward primer had an M13 sequence tail added to its 5′ end to allow for dynamic fluorescent labeling (FAM-labeled M13 primer) following the economic protocol of Schuelke (2000).

Genotyping PCRs were performed in 10 µl reaction volumes containing 1.20 µl of DNA (about 10 ng/µl), 2.5 µl of dNTP mix (0.25 mM each dNTP), 1.0 µl 10× buffer (10 mM Tris–HCl, 50 mM KCl, 1 mM EDTA), 0.30 µl of $MgCl_2$ (50 mM), 0.6 µl of Biotools *Taq* DNA Polymerase (1U/µl), 0.6 µl of primer forward primer (5 µM), 1.2 µl of reverse primer (5 µM), 0.6 µl of FAM-M13 Label primer (0.5 µM). PCRs were run in an Eppendorf thermocycler with the following steps: An initial

denaturation step (92°C, 1 min) was followed by 25 cycles of 20 s at 94°C, 40 s at 52–64°C (Table 1), 30 s at 68°C; followed by 20 fluorescent labeling cycles of 20 s at 93°C, 30 s at 53°C, 30 s at 72°C and a final extension step for 30 min at 72°C. PCR fragments were resolved in MegaBACE1000 (GE Healthcare). Allele sizes were scored against the size standard ET-400 ROX (GE Healthcare) and analyzed on *Fragment Profiler* 1.2 (GE *Healthcare*).

Out of 30 primer pairs designed, 15 were optimized. Microsatellite characterizations were performed in about 48 individuals collected in the municipality of Tefé, Amazonas, Brazil (Table 1). Observed and expected heterozygosities and linkage disequilibrium between loci inferred with Arlequin 3.11 (Excoffier et al. 2005) showed no deviation from the expectation, after Bonferroni corrections (Rice 1989) (Table 1), excepted for the locus BV_8. Observed and expected heterozygosities ranged from 0.25532 to 0.97778 and from 0.30176 to 0.95281, respectively. Number of alleles varied from four (BV_18) to 26 (BV_8). Test for the presence of potential null alleles was carried out using the program Microchecker 2.2.3 (Van Oosterhout et al. 2004), and potential null alleles were inferred for the loci BV_6 and BV_8. Therefore, these two loci should be used with caution for population studies.

We also performed a cross-species amplification test in six other *Brachyplatystoma* species (Table 2). Nearly all locus/species combinations amplified with number of alleles varying from two to seven for polymorphic loci. The 15 characterized loci therefore appear to be useful genetic markers for population genetic studies of *Brachyplatystoma vaillantii* and for similar studies of other *Brachyplatystoma* species.

Acknowledgments This research was supported by grants from CNPq/PPG-7 (557090/05) to I.P.F., FAPEAM (903/03) to J.A.A.G. and CNPq/CT Amazônia (554054/06-0) to J.S.B. Permission to conduct fieldwork and collect tissue samples was granted by IBAMA (Licença no. 14278-1 and no. 130). The authors would like to especially thank Kyara Formiga for her crucial help during several phases of this project. The Projeto Pirada (LTBM/INPA) provided samples and support in the laboratory. We are grateful to Tomas Hrbek for technical assistance and manuscript review. This study forms a portion of a dissertation of F.C.R. at the Genética, Conservação e Biologia Evolutiva program of INPA. F.C.R. was supported by a fellowship from CAPES/FAPEAM.

References

Almeida OT (2006) A indústria pesqueira na Amazônia. In: IBAMA/Pro Várzea CEE (ed) IBAMA/Pro Várzea, Manaus, p 10

Alonso JC, Pirker LEM (2005) Dinâmica populacional e estado atual da exploração de piramutaba e de dourada. In: Fabré NN, Barthem RB (eds) O manejo da pesca dos grandes bagres migradores: piramutaba e dourada no eixo Solimões-Amazonas. IBAMA/Pro Várzea, Coleção Estudos Estratégicos, Manaus

Barthem R, Goulding M (1997) Os Bagres Balizadores: Ecologia, Migração e Conservação de Peixes Amazônicos. Sociedade Civil Mamirauá, MCT—CNPq, IPAAM, Brasilia, Brazil

Barthem RB, Goulding M (2007) An unexpected ecosystem: the Amazon revealed by the fisheries. Gráfica Biblos, Lima/Botanical Garden Press, MO

Batista JS, Formiga K, Farias IP, Alves-Gomes JA (2004) Genetic variability studies of piramutaba (*Brachyplatistoma vaillantii*) and dourada (*B. rousseauxii*) (Pimelodidae: Siluriformes) in the Amazon: basis for management and conservation. International Congress on the Biology of Fish, Manaus, AM, Brazil

Excoffier L, Laval G, Schneider S (2005) Arlequin ver. 3.11: an integrated software package for population genetics data analysis. Evol Bioinform Online 1:47–50

Farias IP, Hrbek T, Brinkmann H, Sampaio I, Meyer A (2003) Characterization and isolation of DNA microsatellite primers for *Arapaima gigas*, an economically important but severely overexploited fish species of the Amazon basin. Mol Ecol Notes 3:128–130

Nelson JS (2006) Fishes of the world, 4th edn. Wiley, New York, NY

Rice WR (1989) Analyzing tables of statistical tests. Evolution 43:223–225

Rozen S, Skaletsky HJ (2000) Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: Krawetz S, Misener S (eds) Bioinformatics methods and protocols: methods in molecular biology. Humana Press, Totowa, NJ

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Springs Harbor Laboratory Press, Cold Springs Harbor, NY

Schuelke M (2000) An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. Nat Biotechnol 18:233–234

Tenzer I, degli Ivanissevich S, Morgante M, Gessler C (1999) Identification of microsatellite markers and their application to population genetics of *Venturia inaequalis*. Phytopathology 89:748–753

Van Oosterhout C, Hutchinson WF, Wills DPM, Shipley P (2004) Micro-checker: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. Mol Ecol Notes 4:535–538