INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA
PROGRAMAS DE PÓS-GRADUAÇÃO DO INPA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA, CONSERVAÇÃO E BIOLOGIA EVOLUTIVA

Caracterização genética da dourada - *Brachyplatystoma rousseauxii,* Castelnau, 1855 (Siluriformes: Pimelodidae) na Amazônia por meio de marcadores moleculares mitocondriais e microssatélites: subsídios para conservação e manejo

JACQUELINE DA SILVA BATISTA

Manaus, Amazonas
Março, 2010

JACQUELINE DA SILVA BATISTA

Caracterização genética da dourada - *Brachyplatystoma rousseauxii,* Castelnau, 1855 (Siluriformes: Pimelodidae) na Amazônia por meio de marcadores moleculares mitocondriais e microssatélites: subsídios para conservação e manejo

ORIENTADOR: Dr. José Antônio Alves Gomes
CO-ORIENTADOR (A): Dra. Izeni Pires Farias

Tese apresentada aos Programas de Pós-Graduação do INPA como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Genética, Conservação e Biologia Evolutiva.

Manaus, Amazonas
Março, 2010

B333 Batista, Jacqueline da Silva
Caracterização genética da dourada - *Brachyplatystoma rousseauxii,* Castelnau, 1855 (Siluriformes-Pimelodidae) na Amazônia por meio de marcadores moleculares mitocondriais e microssatélites: subsídios para conservação e manejo/ Jacqueline da Silva Batista.--- Manaus : [s.n.], 2010.
xx, 148 f. : il. color.

Tese (doutorado)-- INPA, Manaus, 2010
Orientador : José Antônio Alves Gomes
Co-orientador : Izeni Pires Farias
Área de concentração : Genética, Conservação e Biologia Evolutiva

1. Dourada (peixe) 2. Amazônia. 3. Microssatélites.
4. Variabilidade genética. 5. Conservação I. Título.

CDD 19. ed. 597.520415

Sinopse:

Brachyplatystoma rousseauxii é um grande bagre migrador de longa distância e de maior importância comercial para a pesca na Amazônia. Foi estimada a variabilidade genética dessa espécie amostrada em 15 localidades distribuídas na Amazônia brasileira e peruana, utilizando a região controle do DNA mitocondrial e microssatélites como marcadores moleculares. Foi verificado que a dourada forma um único estoque genético distribuído na Amazônia brasileira e peruana.

Palavras-chave: variabilidade genética, conservação, sobrepesca, unidade de manejo.

Dedicatória

Aos meus pais Darcy e Aldeir

Agradecimentos

Muito tenho a agradecer para que essa Tese se tornasse realidade.

Em primeiro lugar agradeço a Deus, divina providência, que sempre me deu forças, permitindo realizações, dentro de meus merecimentos, e me concedendo oportunidades de evolução desde o mais ínfimo começo.

Ao Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA) por propiciar as condições necessárias para que eu me dedicasse ao doutoramento, bem como as condições técnicas, de infra-estrutura e logística para a execução do plano de Tese.

A Secretaria Municipal de Educação de Manaus (SEMED) pelo apoio e proporcionar minha dedicação ao doutorado.

A Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM) pelo financiamento da bolsa de estudo (Edital Posgrad).

Ao MMA-PPG7/IBAMA (Projeto: Bases para o Manejo dos Grandes Bagres Migradores), IFS (A/3303), PROCAD-Amazônia-INPA/UNICAMP/UFRGS/CAPES (023/2006), FAPEAM (PIPT - 205/2003 e Temático – 902/2003), CNPq/SPC&T Fase II/PPG7/PNUD (557090/2005), CNPq/CT-Amazônia (554054/2006-0) e INPA (PPI #: 1-3550/2004; 1-0405/2005, PRJ-0457/2006, 2007) pelo apoio financeiro.

Ao Instituto de Investigação da Amazônia Peruana – IIAP e a Dra. Carmen Rosa Garcia pelo apoio e concessão das amostras de dourada das localidades situadas na Amazônia peruana.

Ao IBAMA pela concessão das Licenças de Coleta e de Transporte de material biológico (amostras de tecido) na Amazônia Brasileira (Nº. 017, 130 e 14278-1).

À Coordenação Geral de Pós-graduação do INPA.

À Coordenação do programa GCBEv, Conselho e todas as secretárias, pela dedicação e apoio no decorrer do desenvolvimento da Tese. A todo o corpo docente do programa pelas contribuições durante a jornada.

Ao Laboratório Temático de Biologia Molecular do INPA onde realizei o trabalho laboratorial necessário.

Ao Dr. José Antônio Alves Gomes pela orientação, ensinamentos, paciência ao logo de uma década de convivência e pelas contribuições imprescindíveis e valiosas durante o doutorado.

À Dra. Izeni Pires Farias (a Fofa) pela orientação, motivação, sugestões e por me acompanhar nas diversas fases (as “boas” e as “ruins”).

A minha amiga e companheira de trabalho Kyara Formiga, que desde o início do curso de graduação me acompanha em minha vida acadêmica. Pela força e incondicional

ajuda e por junto comigo lidar com as “flores” e com os “espinhos” e acreditar que esse sonho tornar-se-ia realidade.

Ao Dr. Tomas Hrbek pela valiosa contribuição durante a fase de análise de dados e discussão de alguns resultados da Tese.

À Dra. Vera Val (LEEM/INPA) e Frida Mesel por tornar o sequenciamento de DNA da biblioteca genômica dos microssatélites no ABI 3130 possível no LEEM/INPA.

Ao Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética (CBMEG) da Unicamp (Campinas –SP) onde a segunda biblioteca genômica foi construída. Em especial à Dra. Anete Souza e a M.Sc. Adna Cristina (CBMEG/UNICAMP) pela importante assistência durante esse processo e aos ensinamentos e experiências compartilhadas.

Ao Centro Multidisciplinar e ao Dr. Spartaco Filho e Enedina Nogueira por oportunizar a utilização do equipamento analisador automático de DNA MEGABECE 1000 da UFAM. Ao Jonson pela substancial contribuição, paciência e por voluntariamente injentar as mais de 40 placas de genotipagem no referido equipamento com as amostras de DNA de dourada proveniente de 13 localidades da Amazônia.

Aos membros da banca de avaliação do plano de doutorado (Dr. Juan Carlos Alonso, Dr, Tomas Hrbek e Dra. Iracilda Sampaio), da aula de qualificação (Dra. Nídia Fabré, Dra. Izeni Farias, Dra. Lúcia Py-Daniel, Dra. Maria das Neves e Dr. Jansen Zuanon) e da presente Tese (Dra. Maria Imaculada Zucchi, Dra. Carmen Rosa García, Dr. Alberto Prioli, Dr. Marcelo Valinotto e Dr. Rodrigo Torres) pelas contribuições.

Aos estudantes e bolsistas do projeto PIRADA (PIRA de piramutaba e piraíba e ADA de dourada) pela paciência, força e compreensão. A Naiara Vogt, Lucicleide Araújo, Rosa Jaqueline, Larissa Melo e Giselle Moura pela valiosa contribuição e ajuda nas “muitas pipetadas de DNA de dourada”.

Ao companheirismo da Suzana e Graciela e pelo compartilhamento de momentos de descontração na bancada.

à Jane pela colaboração incondicional no laboratório.

Ao “grande cardume” (colaboradores e instituições) que “migrando” me ajudou na coleta das amostras de dourada em várias localidades da Amazônia: em Tefé (Prefeitura Municipal, Universidade Estadual do Amazonas, Colônia de Pescadores, Professor Márcio, Raquel, Boaventura), em Cruzeiro do Sul (Secretaria Municipal de Agricultura), Em Eirunepé (Marinês), em diferentes cidades localizadas no rio Madeira (Násser, Ricardo, Ariovaldo, Caolina Dória/UNIR, Igor Santana, Colônia de Pescadores de Guajará-Mirim, Pescadores da Cachoeira de Teotônio e da Colônia de Pescadores Tenente Santana em Porto Velho-RO, Frigorifico de pescado de Porto Velho-RO, Secretaria Municipal do Meio Ambiente de Porto Velho – RO), em Lábrea-AM (Colônia de Pescadores, Francisca e Fabíola), no rio Branco (Romério Briglia e Sebastião), em Tabatinga (Prefeitura Municipal, Colônia de Pescadores e

Psi) e no rio Japurá (Sigueru "*in memorian*" e Boaventura). Aos integrantes do Grupo Pyrá/UFAM (Coordenado pela Dra. Nídia Fabré e Dr. Vandick Batista), Grupo do LEGAL/UFAM (Coordenado pela Dra. Izeni Farias), Grupo PIRADA (LFCE/CPBA/INPA), ao Dr. Juan Carlos Alonso (coleta de amostras em diferentes pontos da calha e tributários) e a todos os pescadores e feirantes das diferentes cidades onde ocorreu coleta de amostras de tecido de dourada.

Ao apoio e fundamental ajuda dos mentores HP "nessa" jornada. Aos ensinamentos obtidos na FUJ e pelo suporte e incentivo espiritual. Por me proporcionarem informações úteis para também entender melhor as questões biológicas, relacionadas às leis que regem a evolução e o Universo, e me ajudarem a melhorar como pessoa.

A toda minha família (avós, pais, irmãos, tios, tias, primos, cunhadas e sobrinhos) pela paciência e compreensão ao ouvir tantos "não posso" aos convites de eventos familiares. Aos meus pais Darcy e Aldeir, por terem me concedido o melhor presente "a vida" e que com muito amor e dedicação me criaram, educaram e me ensinaram valores morais que incluem honestidade, justiça e responsabilidade. Aos meus irmãos Albery e Dalbert pelo incentivo e motivação.

Ao M.Sc. Danniel Bevilaqua pela ajuda em algumas análises estatísticas e em diferentes fases da elaboração dessa Tese. Por muitas vezes junto comigo pensar e delirar sobre a dourada e outros aspectos da biologia pesqueira desse recurso. Ao meu amor Danniel Bevilaqua, que surgiu durante essa fase importante em minha vida e em um momento impar. Pelo seu amor, paciência e compreensão. Pelo espírito motivacional com a sempre frase "Sem sacrefício não há vitória" (Optimus Primer).

A Dra. Miriam Rafael, a tia que de perto me acompanhou. Sou grata pelo seu incentivo, apoio fundamental e motivação desde o início de minha carreira acadêmica.

A minha avó Terezinha que me inclui fervorosamente em suas orações e sempre acreditou que um dia eu iria conseguir.

Ao amigo Adonai pelos ensinamentos holísticos e o apoio incondicional nas primeiras fases dessa jornada.

A dourada, a protagonista dessa história, que migrando pelos rios da Amazônia pôde não só servir de alimento e renda, mas também servir como objeto de estudo nesse trabalho. Para a qual desejo que esse trabalho possa contribuir para a compreensão de seu ciclo de vida, conservação e manejo.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para que esse sonho se tornasse realidade. Afinal, "*sonho que se sonha só é só um sonho que se sonha só, mas sonho que se sonha junto é realidade*" (Raul Seixas).

"*Se pude ver mais longe, foi por ter-me apoiado em ombros de gigantes*" (Isaac Nilton).

Valeu !

Jacqueline da Silva Batista

Epígrafe

“Não é o mais forte da espécie que sobrevive, nem o mais inteligente,
mas sim o que melhor se adapta às mudanças”
(Charles Darwin)

Resumo

A dourada (*Brachyplatystoma rousseauxii)* é um bagre migrador de longa distância e provavelmente a espécie de bagre de maior importância comercial para a pesca na região Amazônica. Em função da intensa captura realizada em cima desse recurso pesqueiro, dados recentes apontam que esta espécie encontra-se em sobrepesca de crescimento. Essa espécie realiza extensas migrações incluindo áreas distintas de criação, alimentação e reprodução a fim de realizar o seu ciclo de vida. Dada à distribuição geográfica, abrangendo o território político de mais de cinco países amazônicos, a dourada é capturada ao longo do sistema Estuário-Solimões-Amazonas (EAS) e seus tributários, pela frota comercial e artesanal desde Belém, no estuário do rio Amazonas, até Pucallpa, no Peru, a aproximadamente 5000 Km a Oeste, próximo aos sopé dos Andes peruanos. Considerando a importância sócio-econômica e ecológica na Amazônia, foi estimada a variabilidade genética de *B. rousseauxii* em 15 localidades distribuídas na Amazônia brasileira e peruana, a fim de verificar, por intermédio de marcadores moleculares de sequências de DNA mitocondrial (região controle) e nucleares (microssatélites), se esta espécie constitui um único estoque, de larga distribuição e geneticamente homogêneo, ou se a pescaria é exercida sobre vários estoques, geneticamente diferenciáveis. Trinta e seis marcadores microssatélites foram isolados e caracterizados em 35 indivíduos da espécie amostrados em 10 cidades do Pará, Brasil. Foram obtidos um total de 349 alelos, variando entre 2 a 22 alelos por loco, com uma média de 9,70. A heterozigosidade observada (H_o) e esperada (H_e) variou entre 0,143 a 0,914 (média de 0,614) e 0,215 a 0,929 (média de 0,712), respectivamente. A amplificação heteróloga resultou entre 15 a 27 locos polimórficos entre seis espécies do gênero *Brachyplatystoma [B. capapretum* (filhote capapreta)*, B. vaillantii* (piramutaba)*, B. filamentosum* (piraíba)*, B. platynemum* (babão)*, B. tigrinum* (dourada zebra) *e B. juruense* (flamengo)]. Os marcadores microssatélites obtidos podem ser utilizados em estudos genéticos que poderão não só subsidiar políticas de conservação e manejo da dourada, mas também das demais espécies comerciais do gênero *Brachyplatystoma.* A região controle (DNAmt) foi obtida para 652 indivíduos amostrados em 15 localidades e compreendeu 911 pb, 301 haplótipos, 240 haplótipos únicos, diversidade gênica (HD) de 0,979 ± 0,002, diversidade nucleotídica (Pi) de 0,0089 ± 0,005, a média nucleotídica par a par (K) igual a 8,079 ± 3,760, média da distância genética variando entre 0,1 a 3,6% com uma média de 1,0 % (±0,07). Oito locos microssatélites foram utilizados nas analises de genética populacional envolvendo 483 indivíduos amostrados em 13 localidades, mostrando um número total de 98 alelos, com uma média de 12,3 alelos, média das heterozigosidades observada de 0,607 ± 0,178 e esperada de 0,588 ± 0,008 por loco. Os resultados obtidos não permitem a confirmação do comportamento de *homing* em dourada. Porém, algumas tendências de estruturação genética encontradas não permitem o descarte completo da hipótese. Com o resultado dos dois marcadores moleculares, corrobora-se a hipótese migratória da espécie desde o estuário no Brasil a Pucallpa no Peru, incluindo os tributários do rio Solimões/Amazonas, e que essa espécie é composta por um único estoque genético de ampla distribuição na Amazônia.

Abstract

The dourada (*Brachyplatystoma rousseauxii*) is a long distance migratory catfish and probably a catfish species of greatest importance to commercial fishing in the Amazon region. Because of the intense catch made up of fishery resource, recent data indicate that this species is in growth overfishing. This species perform extensive migrations and has differentiated breeding, feeding and reproduction areas in order to carry out its life cycle. Given the geographical distribution, covering the political territory of more than five Amazonian countries, the dourada is captured along the Estuary-Amazonas-Solimões (EAS) and its tributaries, by fleet and commercial craft from Belem at the mouth of the Amazon River to Pucallpa, Peru, about 5000 km to the west, near the the Peruvian Andes. Considering the socio-economic and ecological effects of this fish resources in the Amazon, the genetic variability of *B. rousseauxii* was estimated from samples collected in 15 locations around the Brazilian and Peruvian Amazon, to verify, through molecular markers of mitochondrial DNA sequences (control region) and nuclear (microsatellites), if this species is a single stock, widely distributed and genetically homogeneous or if the fishery is carried on various stocks, genetically distinguishable. Thirty-six microsatellite markers were isolated and characterized in 35 individuals of the species sampled in Belém-PA. The total number of alleles were 349, ranging from 2 to 22 per locus with an average of 9,70. The observed (H_o) and expected (H_e) heterozygosity ranged from 0,143 to 0,914 (average 0,614) and from 0,215 to 0,929 (average 0,712), respectively. Cross-amplification in six con-generic species resulted between 15 and 27 polymorphic loci, depending upon the species (*(B. capapretum, B. vaillantii, B. filamentosum, B. platynemum. B. tigrinum e B. juruense)*. These polymorphic microsatellites should be useful for management policies of *B. rousseauxii* in the Amazon as well as for the others *Brachyplatystoma* species of commercial value. The control region (mtDNA) was obtained for 652 individuals sampled in 15 locations and comprised 911 bp, 301 haplotypes, 240 singletons, gene diversity (HD) of 0,979 ± 0,002, nucleotide diversity (Pi) of 0,0089 ± 0,005, the pairwise average nucleotide (K) equal to 8,079 ± 3,760, average genetic distance ranging from 0,1 to 3,6% with an average of 1,0% (± 0,07). Eight loci were used in the analyses of population genetics involving 483 individuals sampled in 13 localities, showing a total of 98 alleles, with an average of 12,3 alleles, average observed heterozygosity of 0,607 ± 0,178 and expected 0,588 ± 0,008 per locus. The results do not allow the confirmation of the behavior of *homing* in dourada. However, some trends of genetic structure found not allow the complete discarted of the hypothesis. The results of the two molecular markers support the migratory hypothesis of the dourada from the estuary in Brazil to Pucallpa in Peru, including the tributaries of the Solimões /Amazonas river, and that the dourada is composed by a single genetic stock with a range distribuition in the Amazon.

.

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO 1

1.1. Os grandes bagres migradores (Siluriformes: Pimelodidae) da bacia Amazônica..... 1

1.2. A pesca e a importância comercial da dourada na Amazônia 2

1.3. A biologia de *Brachyplatystoma rousseauxii* 5

1.3.1. Classificação taxonômica da dourada..... 5

1.3.2. Distribuição geográfica da dourada 6

1.3.3. Ciclo de vida da dourada 6

1.4. A filopatria (*Homing*) 10

1.5. Variabilidade genética e a importância dos marcadores moleculares 12

1.5.1. O DNA mitocondrial e a Região Controle na genética de peixes 13

1.5.2. Marcadores Moleculares Microssatélites 16

***2.*OBJETIVOS 21**

2.1. Objetivo geral 21

2.2. Objetivos específicos 21

CAPÍTULO I : MARCADORES DE DNA MICROSSATÉLITES PARA A DOURADA (*BRACHYPLATYSTOMA ROUSSEAUXII*, SILURIFORMES: PIMELODIDAE), O BAGRE DE MAIOR IMPORTÂNCIA PARA A PESCA NA AMAZÔNIA: DESENVOLVIMENTO, CARACTERIZAÇÃO E AMPLIFICAÇÃO INTERESPECÍFICA 22

CAPÍTULO II : ESTIMATIVA DA VARIABILIDADE GENÉTICA POPULACIONAL DA DOURADA – *BRACHYPLATYSTOMA ROUSSEAUXII* (SILURIFORMES: PIMELODIDAE) NA AMAZÔNIA UTILIZANDO MARCADORES MITOCONDRIAIS E MICROSSATÉLITES33

1. INTRODUÇÃO 34

2. MATERIAL E MÉTODOS 37

2.1. Locais de coleta, obtenção e preservação do material biológico..... 37

2.2. Extração de DNA dos exemplares de *Brachyplatystoma rousseauxii* 40

2.3. Região Controle (DNAmt) 40

2.3.1. Amplificação e sequenciamento da Região controle (DNAmt) de *Brachyplatystoma rousseauxii* 40

2.3.2. Análise da diversidade molecular das sequências nucleotídicas da Região Controle do DNA mitocondrial *de Brachyplatystoma rousseauxii* 41

2.3.3. Estrutura populacional, correlação entre distância geográfica, fluxo gênico e distância genética 42

2.3.4. Análise de simulação do comportamento filopátrico (*homing*) 44

2.3.5. Análise de estoque relacionado (*Mixstock analyses*) 45

2.4. Marcadores Moleculares Microssatélites 45

2.4.1. Amplificação e genotipagem das amostras de DNA de *Brachyplatystoma rousseauxii* 45

2.4.2. Estimativa do tamanho dos alelos, tratamento e montagem do banco de dados de genotipagem 47

2.4.3. Análises estatísticas de genética intrapopulacional 48

2.4.4. Estrutura populacional, correlação entre distância geográfica, fluxo gênico e distância genética 48

2.4.5. Análise de simulação do comportamento filopátrico (*homing*) 49

2.4.6. Análise de estoque relacionado (*Mixstock analyses*) 50

3. RESULTADOS 51

3.1. Região controle do DNA mitocondrial 51

3.1.1. Análise geral da diversidade molecular em *Brachyplatystoma rousseauxii* 51

3.1.2. Análise e distribuição de haplótipos de *Brachyplatystoma rousseauxii* 51

3.1.3. Análise da diversidade genética de *Brachyplatystoma rousseauxii* 53

3.1.1. Análise da distribuição da diversidade genética *(*AMOVA) em *Brachyplatystoma rousseauxii* 53

3.1.4. Análise de correlação entre a distância genética e distância geográfica (teste de Mantel) em *Brachyplatystoma rousseauxii* 56

3.1.5. Distância genética e fluxo gênico em *Brachyplatystoma rousseauxii* 56

3.1.1. Análise de simulação do comportamento filopátrico 56

3.1.2. Análise de estoque relacionado (*Mixstock analyses*) 60

3.1.3. Análise de expansão demográfica em *Brachyplatystoma rousseauxii* 60

3.2. Microssatélites 63

3.2.1. Diversidade genética em *Brachyplatystoma rousseauxii* 63

3.2.2. Análise da distribuição da diversidade genética (AMOVA) em *Brachyplatystoma rousseauxii* 69

3.2.3. Análise de simulação do comportamento filopátrico 73

3.2.4. Análise de estoques relacionados em *Brachyplatystoma rousseauxii (Mixstock analyses)* 73

4. DISCUSSÃO 76

4.1. Variabilidade genética em *Brachyplatystoma rousseauxii* 77

4.2. Identificação de estoque em *Brachyplatystoma rousseauxii* na Amazônia brasileira e peruana 84

4.3. A questão do *homing*/filopatria em *Brachyplatystoma rousseauxii* 88

4.4. Análise de estoque relacionado (*Mixstock analyses*) em *Brachyplatystoma rousseauxii* 90

4.5. Implicação para conservação e manejo de *Brachyplatystoma rousseauxii* na Amazônia 91

5. CONCLUSÕES GERAIS 94

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 95

APÊNDICE A 108

APÊNDICE B 114

APÊNDICE C 122

Lista de Tabelas

Capitulo I

Tabela 1. Caracterização de seis locos microssatélites polimórficos, desenvolvidos a partir da biblioteca genômica 01, em 35 indivíduos de *Brachyplatystoma rousseauxii* amostrados em 10 cidades do Estado do Pará, Brasil. 29

Tabela 2. Caracterização de 30 locos microssatélites polimórficos, desenvolvidos a partir da biblioteca genômica 02, em 33-35 indivíduos de *Brachyplatystoma rousseauxii* amostrados em 10 cidades do Estado do Pará, Brasil. 30

Tabela 3. Amplificação interespecífica de 36 locos microssatélites desenvolvidos para a *Brachyplatystoma rousseauxii*..... 32

Capitulo II

Tabela 1. Regiões/localidades, rios, locais de coleta e número de indivíduos coletados de *Brachyplatystoma rousseauxii* na Amazônia brasileira e peruana..... 39

Tabela 2. Locos microssatélites utilizados nas analises populacionais de *Brachyplatystoma rousseauxii* amostrada em 13 localidades da Amazônia brasileira e peruana..... 46

Tabela 3. Sistemas Multiplex utilizado para a genotipagem dos indivíduos de *Brachyplatystoma rousseauxii* amostrados nas 13 localidades da Amazônia, desenvolvidos a partir da combinação do tamanho dos alelos (pb) e das fluorescências FAM e HEX. 47

Tabela 4. Percentual (%) de haplótipos da região controle (DNAmt) de *Brachyplatystoma rousseauxii* compartilhados entre as 15 localidades amostradas e distribuídas na Amazônia brasileira e peruana. Em destaque, os menores e maiores valores de compartilhamento encontrados. 52

Tabela 5. Parâmetros de diversidade genética da *Brachyplatystoma rousseauxii*, amostrada em 15 localidades da Amazônia, a partir da análise da região controle (DNAmt). N: número de indivíduos seqüenciados; H: número de haplótipos; Hu: número de haplótipos únicos; H/N: razão entre o número de haplótipos e o número de indivíduos; %Hu: percentual do número de haplótipos únicos em relação ao número de haplótipos; S: número de sítios polimórficos; ETA: número total de mutações; MR: mutações restritas; HD: diversidade

haplotípica K: média das diferenças nucleotídicas par a par; Pi: diversidade nucleotídica; D: teste de neutralidade de Tajma (D); Fs: testes de Fu (Fs) e Hri: índice de Raggedness (estimativa de expansão demográfica e distribuição mismatch). Em destaque, os menores e maiores valores obtidos, excetuando os obtidos para o rio Tapajós. 54

Tabela 6. Partição da variabilidade genética de *Brachyplatystoma rousseauxii,* estimada a partir da frequência e distribuição dos 301 haplótipos (região controle do DNAmt), distribuida em 15 localidades da Amazônia brasileira e peruana. Porcentagem da variância molecular (%) e estimativa da probabilidade estatística (P) para sete grupos alternativos em seis níveis hierárquicos (análises) a partir da análise da AMOVA. 57

Tabela 7. Média da distância genética (%) para a par (corrigida com o modelo HKY+I+G) de *Brachyplatystoma rousseauxii* estimada entre e dentro das 15 localidades amostradas, distribuídas na Amazônia brasileira e peruana, utilizando a região controle (DNAmt). 58

Tabela 8. Fluxo gênico (par a par) estimado entre as 15 localidades amostradas para *Brachyplatystoma rousseauxii,* a partir dos valores de *Nm* (número de migrantes por geração baseado nos valores de F_{ST}), utilizando a região controle (DNAmt) como marcador molecular. 59

Tabela 9. Valores de distância genética média e Maxima obtida para *Brachyplatystoma rousseauxii*, amostrada em 14 localidades distribuídas na Amazônia brasileira e peruana, antes (inicial) e depois da análise de simulação (média, com 95% de corte e com correção de Bonferroni) realizada para verificar a existência de comportamento filopatrico. 60

Tabela 10. Polimorfismo Informativo (PIC) e o índice de Endogamia (F_{IS}) obtidos para cada um dos oito locos microssatélites em 483 indivíduos de *Brachyplatystoma rousseauxii*, amostrados em 13 localidades. Os valores médios para cada um desses índices também são apresentados. 63

Tabela 11. Alelos exclusivos (em pb) e suas freqüências (valores entre parênteses) observados em oito locos microssatélites de *Brachyplatystoma rousseauxii* em sete das 13 localidades amostradas. 64

Tabela 12. Índices de diversidade genética obtidos em oito locos microssatélites de *Brachyplatystoma rousseauxii* amostrada em 13 localidades. N – Número de indivíduos analisados em cada localidade; *A* – Número de alelos; H_o - Heterozigosidade observada; H_e - Heterozigosidade esperada; F_{IS} – Coeficiente de endogamia; HWE – Probabilidade do teste de Equilíbrio de Hardy Weinberg. 65

Tabela 13. Índices genéticos obtidos a partir de oito locos microssatélites em *Brachyplatystoma rousseauxii* amostrada em 13 localidades distribuídas na Amazônia brasileira e peruana: média do número de alelos por loco ou riqueza alélica (A_R), diversidade genética média, número total de alelos (A_T), média da heterosigozidade total observada (H_o) e esperada (H_e) e o coeficiente de endogamia (F_{IS}). 68

Tabela 14. Valores de F_{ST} estimados entre os indivíduos de *Brachyplatystoma rousseauxii* de cada duas (par a par) das 13 localidades amostradas, utilizando oito locos microssatélites. Valores máximos e mínimos obtidos em destaque. 70

Tabela 15. Análise de variância molecular (AMOVA) em *Brachyplatystoma rousseauxii*, a partir de distância euclidiana estimada com os valores de F_{ST}, utilizando oito locos microssatélites, em 13 localidades distribuídas na Amazônia brasileira e peruana. 71

Tabela 16. Valores de atribuição (Q) dos exemplares de *Brachyplatystoma rousseauxii* de cada localidade em cada um dos três *clusters* estimado por ΔK (Evanno et al., 2005). Os valores de atribuição (Q) de cada uma das 13 localidades foram equivalentes em todos os clusters sendo que todas as localidades compartilham o mesmo material genético. 72

Tabela 17. Fluxo gênico (par a par) estimado entre as 13 localidades amostradas para *Brachyplatystoma rousseauxii*, a partir dos valores de Nm (número de migrante por geração baseado nos valores de F_{ST}), utilizando oito locos microssatélites..... 72

Tabela 18. Simulação realizada entre os indivíduos de *Brachyplatystoma rousseauxii*, amostrados em 12 localidades da Amazônia, para verificar se essa espécie possui comportamento filopátrico (*Homing*), utilizando oito locos microssatélites. Foram calculados o F_{IS}, R_{IS} (ambos coeficiente de endocruzamento) e $\Delta\mu$ (equivalente a variação de tamanho dos alelos) antes (inicial) e depois das 10000 re-amostragens (média, valores de corte a 95% e com correção de bonferroni-CB). 74

Tabela 19. Índices de variabilidade genética estimados para a dourada (*Brachyplatystoma rousseauxii*) em relação aos obtidos em espécies de peixes amazônicos, distribuídas em quatro Ordens de peixes, estimados com a região controle (DNAmt). 79

Tabela 20. Índices de variabilidade genética, obtidos com marcadores moleculares microssatélites, em algumas espécies de peixes distribuídas em três Ordens, e comparados aos obtidos para a dourada (*Brachyplatystoma rousseauxii*) no presente estudo. 83

Lista de Figuras

INTRODUÇÃO

Figura 1. Dados de captura de *Brachyplatystoma rousseauxii* entre 1984 a 2008 no Peru. **1a** - em Loreto e Iquitos (Garcia *et al.*, 2009); **1b** – em Loreto entre 2002 e 2008 (Tello e García, 2009). 4

Figura 2. Produção pesqueira de bagres do rio Madeira, (em valores absolutos e acumulados) no período de 1997 a 2002. Fonte: Marão-Siqueira (2003)..... 4

Figura 3. Indivíduo jovem de dourada – *Brachyplatystoma rousseauxii.* Escala = 20 cm. 5

Figura 4. Distribuição da Dourada – *Brachyplatystoma rousseauxii* na Amazônia. Fonte: (Goulding *et al.*, 2003). 6

Figura 5. Modelo de migração proposto para a dourada (*Brachyplatystoma rousseauxii*) na Amazônia. Cabeceiras (em azul) - área hipotética de desova; Estuário (em amarelo) - Área de criação e de alimentação dos pré-adultos; Amazônia central (em verde) - Área de alimentação dos pré-adultos e adultos. Fonte: Barthem e Goulding (2007). 7

Figura 6. Árvore de Consenso pela regra da maioria de 50% entre todas as árvores obtidas por máxima parcimônia, máxima verossimilhança e distância, com os indivíduos amostrados de *Brachyplatystoma rousseauxii*. Os valores acima dos braços foram obtidos pelo mesmo consenso. Os táxons em azul foram coletados em Belém, em verde em Manaus e em vermelho em Letícia/Tabatinga. Em preto, o táxon *Brachyplatystoma vaillantii* utilizado como grupo externo. Fonte: Batista e Alves-Gomes (2006)..... 9

Figura 7. Histograma representativo da variabilidade nucleotídica observada nas amostras de *Brachyplatystoma rousseauxii* provenientes de Belém (azul), Manaus (verde) e Letícia/Tabatinga (vermelho). *H*, número de haplótipos; *S*, número de sítios polimórficos; *ETA*, número total de mutações; *K*, média da variabilidade nucleotídica par a par. Fonte: Batista e Alves-Gomes (2006). 10

Figura 8. Visão da mudança e importância do uso de diferentes marcadores moleculares entre os anos de 1966 a 2003. Destaque à utilização dos marcadores de sequência de DNA (em verde) e os microssatélites (em azul) em expansão. Fonte: Schlotterer (2004). 13

Figura 9. Esquema gráfico do DNA mitocondrial de peixes com a localização da região controle (com preenchimento). Fonte: modificado de Meyer (1993)..... 14

Capitulo II

Figura 1. Localização dos pontos de coleta de amostras de tecido de indivíduos de *Brachyplatystoma rousseauxii.* Os mesmos números representam locais (Tabela 1), em que amostras foram coletadas e compiladas, representando uma determinada região/localidade. 38

Figura 2. Contribuição proporcional de cada uma das 12 localidades para o estuário e Santarém consideradas na análise de estoque relacionado (*Mixstock analyses*) como áreas de criação da dourada. Estimativas realizadas a partir da freqüência absoluta dos haplótipos obtidos com a região controle. Círculos sólidos em cada barra representam a média da porcentagem de contribuição. As barras representam 95% de limite de confiança. RB – rio Branco, IC – rio Içá, IQ – Iquitos, JA – rio Japurá, JU - rio Juruá, MD - rio Madeira, PM - Porto Maldonado, MA: Manaus, PC – Pucallpa, PU – rio Purus, TA – Tabatinga e TE – Tefé. 61

Figura 3. Padrão unimodal da distribuição da freqüência das diferenças genéticas par a par, observada e esperada, obtidas para a região controle (DNAmt) de *Brachyplatystoma rousseauxii* amostrada em 15 localidades da Amazônia brasileira e peruana..... 62

Figura 4. Correlação entre a heterozigosidade esperada e número de alelos, por loco e por localidade, obtidos para *Brachyplatystoma rousseauxii,* utilizando oito locos microssatélites. 67

Figura 5. Distribuição das freqüências de heterozigosidade observada em exemplares de *Brachyplatystoma rousseauxii* nas 13 localidades amostradas da Amazônia brasileira e peruana. ES - Estuário, SA - Santarém, MD - rio Madeira, PM - Porto Maldonado; MA: Manaus, PU – rio Purus, TE – Tefé, JA – rio Japurá, JU - rio Juruá, IC – rio Içá, TA – Tabatinga e IQ – Iquitos..... 68

Figura 6. Uma única população (K=1 *cluster*) estimada para *Brachyplatystoma rousseauxii*, amostrada em 13 localidades a partir de inferência Bayesiana implementado no programa STRUCTURE, para K variando entre 1 a 13. **6a** - Valores da probabilidade a posteriori na vertical e na horizontal os números de agrupamentos (K) possíveis. **6b** – Triângulo indicando que todos os indivíduos se encontram no centro. 71

Figura 7. Contribuição de cada uma das 12 localidades para o estuário e Santarém (áreas de criação), consideradas na análise de estoque relacionado (*Mixstock analyses*) para *Brachyplatystoma rousseauxii*, utilizando oito locos microssatélites. Círculos sólidos em cada barra representam a melhor proporção de contribuição. As barras indicam a variação da estimativa ao nível de 95% de confiança. IC – rio Içá, IQ – Iquitos, JÁ - rio Japurá, JU - rio Juruá, MD - rio Madeira, PM - Porto Maldonado; MA: Manaus, PC – Pucallpa, PU – rio Purus, TA – Tabatinga e TE – Tefé..... 75

1. INTRODUÇÃO

Com uma bacia de drenagem em torno de 7.000.000 km^2 de extensão geográfica e incluindo o rio Amazonas/Solimões como o maior rio de água doce do planeta (IBGE, 1992; Araujo-Lima e Ruffino, 2003), a Amazônia, congrega a mais rica ictiofauna do planeta. Estima-se que 2416 espécies (2072 endêmicas) de peixes estão descritas, sendo que as estimativas indicam que este número pode ultrapassar a 5000 espécies (Lévêque *et al.*, 2008). Em razão desta diversidade e a variedade de espécies apropriadas para o consumo humano, a pesca é uma das atividades economicamente mais importantes para a região, como fonte de renda e de proteína de fácil acesso para as populações locais. As espécies de peixes comercialmente explotadas na Amazônia, podem ser divididas em dois grandes grupos: peixes de escamas, os representantes dos Characiformes, Osteoglossiformes, Perciformes e Clupeiformes, e peixes lisos, os bagres da ordem Siluriformes (Barbosa, 1962; Roberts, 1972; Salati *et al.*, 1983; Barthem e Goulding, 1997; Lowe-Mcconnel, 1999). Diferenças culturais e regionais determinam maior ou menor valor destas espécies nos diferentes mercados locais, ao longo da Amazônia.

1.1. Os grandes bagres migradores (Siluriformes: Pimelodidae) da bacia Amazônica

Considerados como os mais abundantes entre os grandes predadores, presentes nos canais do rio Solimões/Amazonas e seus afluentes, os bagres em geral (Siluriformes), também conhecidos como peixes “lisos” ou de “couro” representam cerca de 55% da captura total de peixes na região. Dentro deste percentual, 95% da captura é feita em cima de cinco espécies da Família Pimelodidae, sendo que quase 80% deste total é obtido somente pela captura de *Brachyplatystoma rousseauxii* (dourada) *B. vaillantii* (piramutaba), *B. filamentosum* (Piraíba clara) e *B. capapretum* (piraíba escura ou filhote capapreta). Estima-se que a captura total dos grandes bagres migradores, compartilhada entre o Brasil, Colômbia, Peru e Bolívia, seja de 30.000 t/ano. No entanto, a estimativa mais próxima do real pode chegar a ser três vezes maior, visto que boa parte do que é capturado não consegue ser registrado pela sistemática de monitoramento pesqueiro atualmente disponível na região (FAO-COPESCAL, 2000).

Dada à distribuição geográfica, abrangendo o território político de mais de que cinco países amazônicos, estas quatro espécies de bagres ultrapassam essas barreiras e são capturadas, ao longo do sistema Estuário-Solimões-Amazonas (EAS), pela frota comercial e artesanal desde Belém, no estuário do rio Amazonas, até Pucallpa, no Peru, aproximadamente 4500 Km a Oeste, próximo aos Andes peruanos. Desta forma, estas espécies estão entre as mais importantes para a pesca comercial na Amazônia brasileira,

colombiana, peruana, boliviana e venezuelana com milhares de famílias na região dependendo direta e/ou indiretamente da atividade pesqueira sobre estes bagres (Bayley, 1981; Barthem e Goulding, 1997; Ruffino *et al.*, 2000; Barthem e Goulding, 2007).

Em todos os locais onde é pescada, e para onde existe estatística de desembarque, a dourada está entre as duas espécies mais capturadas pela pesca regional e para exportação. No entanto, pela combinação das informações disponíveis na literatura, entrevistas em desembarques pesqueiros e reconhecendo que diversos pontos de pescaria e comercialização não são amostrados, estima-se que cerca de 30.000 t de dourada são capturadas e comercializadas a cada ano na Amazônia (Barthem e Goulding, 1997; SANYO, 1998; IBAMA, 2008).

1.2. A pesca e a importância comercial da dourada na Amazônia

A atividade pesqueira movimenta anualmente cerca de US$ 100 bilhões em todo mundo, produzindo aproximadamente 85.000.000 t/ano. Destes 13.000.000 t/ano são provenientes da pesca em águas doces de todo o mundo (Bone *et al.*, 1995). A maior parte da pesca continental é realizada na Ásia, seguida pela África. Em terceiro lugar, encontra-se a América Latina, produzindo anualmente em torno de 800.000 t de pescado, sendo que cerca de 10% deste total é produzido em águas doces da Bacia Amazônica (Welcomme, 1992).

A dourada é a espécie mais pescada entre as 14 espécies de bagres migradores mais explotadas na Amazônia. Por ser um peixe de meia água (região intermediária entre a superfície e o fundo do rio), é menos vulnerável às redes de arrasto da pesca industrial. A maior parte da captura de dourada se dá por meio de espinhel ou redes de emalhar. Os barcos artesanais representam a principal frota que explora a dourada, capturando-a desde o estuário até o alto Solimões (Barthem e Goulding, 1997; Fabré *et al.*, 2000; FAO-COPESCAL, 2000).

Com uma importância destacada na atividade pesqueira na Amazônia, a dourada está entre as 10 espécies mais comercializadas na Amazônia Brasileira (IBAMA, 1999). sendo que o Estado do Pará está entre os locais onde é mais comercializada. Dados de estatística pesqueira referentes ao período entre os anos de 1993 e 1997 do Pará mostram que os bagres representaram quase a metade do desembarque total sendo a dourada a mais importante com 27,5% (9483,9 t) de captura (Barthem, 2004).

Em 1998, a dourada atingiu mais de que 5.000 t no Estado. Entre 1994 e 1996, a dourada estava listada como terceira colocada entre as 10 espécies mais exploradas pela pesca em Santarém-PA (Isaac *et al.*, 2000) e a segunda colocada, superada pelo mapará (*Hypophthalmus* spp.), a partir de dados de desembarque obtidos entre 1992 a 2003 na

região do baixo Amazonas (Barthem e Goulding, 2007). Em 1998, em Manaus, atingiu 1800 t (SUDEPE, 1986; Barthem, 1999). Ainda no estado do Amazonas, foi registrada uma produção pesqueira de 798, 929 e 1155 t em 1995, 1996 e 1997, respectivamente (Rezende, 1998). A Captura Por Unidade de Esforço (CPUE) da dourada varia entre 9 a 64 Kg/peixe/dia (dados não publicados no Projeto Iara/IBAMA). Em 2001, a dourada foi a 2ª. e 4ª. espécie mais capturada em Santarém e Óbidos respectivamente (IBAMA, 2002).

No médio Amazonas, em virtude da rejeição cultural pela carne de peixe liso, a dourada é principalmente aproveitada pela pesca de subsistência, principalmente nos períodos de entre-safra das espécies preferidas (Zuanon, 1990). Este tabu vem se perdendo ao longo dos anos recentes (Braga e Fabré, 2001).

Na Colômbia, a dourada é um dos bagres de maior comercialização nos mercados locais durante o ano todo, sendo capturadas as maiores classes de tamanho da espécie (Barthem e Goulding, 1997; Alonso, 1998; Barthem e Goulding, 2007). Na cidade de Tabatinga fronteira com Letícia, em 2001 a dourada foi a primeira entre as sete espécies de peixes mais pescadas com 412,45 t perfazendo 34,45 % da produção pesqueira (IBAMA, 2002).

Dados de desembarque da pesca comercial na região de Loreto e Iquitos no Peru indicam declínio significativo da captura da dourada (Figura 1a), ao lado do pirarucu (*Arapaima gigas*) e do tambaqui (*Colossoma macropomum*), entre 1984 e 2006. Essas três espécies eram responsáveis por mais de que 10% da captura total na década de 80 e representam 2% atualmente. O declínio da captura da dourada e da piraíba (*B. filamentosum*) favoreceu o aumento da captura de outras espécies de bagres tais como: *B. juruense* (flamengo) e *Hypophthalmus* spp. (maparás) (Garcia *et al.*, 2009). Entretanto, dados de desembarque obtidos entre 2002 e 2008 na região de Loreto indicam um aumento significativo da captura da dourada no ano de 2008 (Figura 1b) (Tello e García, 2009).

O rio Madeira, o maior tributário do rio Solimões/Amazonas (3352 Km), é um dos afluentes onde a dourada é mais capturada (Hijazi e Doria, 2005; Barthem e Goulding, 2007). Dados da produção pesqueira do período entre 1997 a 2002, fornecidos pela colônia de pescadores de Tenente Santana da cidade de Porto Velho – RO, refletem esse quadro (Figura 2). A partir desses dados, verifica-se que a dourada apresentou o maior índice de captura entre os anos analisados, sendo superada somente pelo surubim (*Pseudoplatystoma fasciatum*) no ano de 1999.

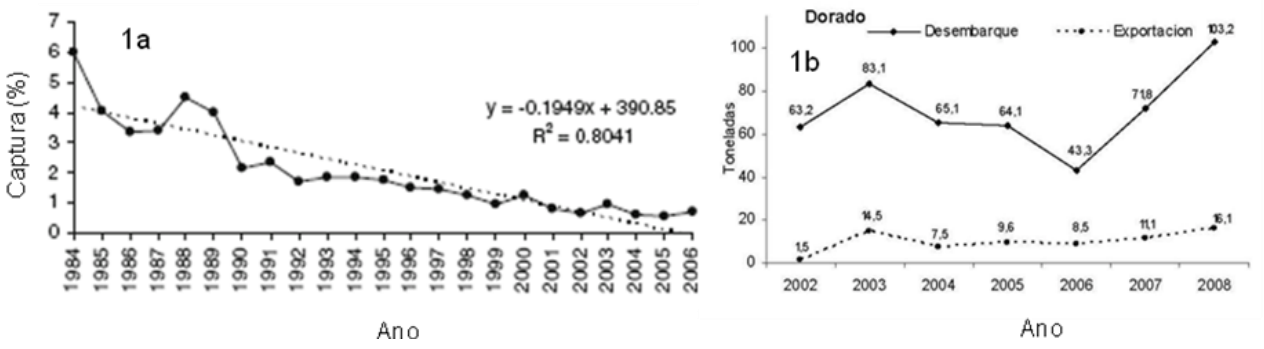

Figura 1. Dados de captura de *Brachyplatystoma rousseauxii* entre 1984 a 2008 no Peru. **1a** - em Loreto e Iquitos (Garcia *et al.*, 2009); **1b** – em Loreto entre 2002 e 2008 (Tello e García, 2009).

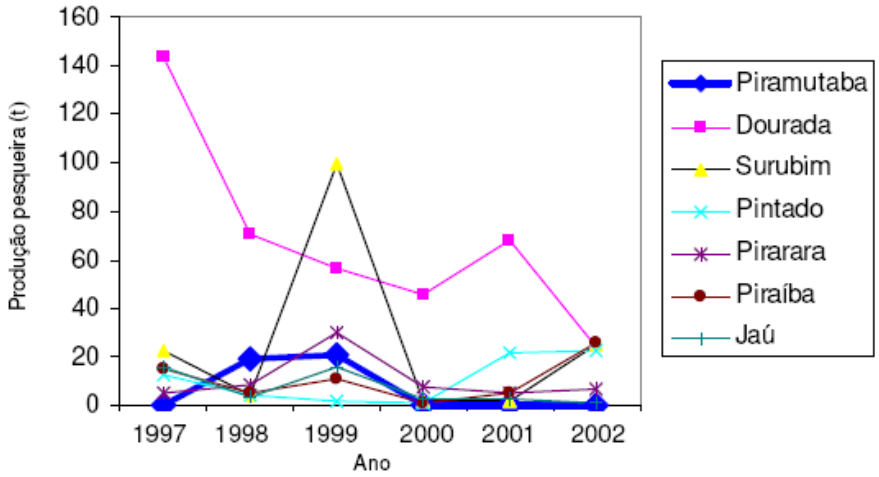

Figura 2. Produção pesqueira de bagres do rio Madeira, (em valores absolutos e acumulados) no período de 1997 a 2002. Fonte: Marão-Siqueira (2003).

Face ao histórico de explotação pesqueira da dourada na Amazônia, a dourada se encontra em sobrepesca de crescimento (Alonso, 2002). Esse tipo de sobrepesca é caracterizada pela diminuição contínua dos tamanhos dos peixes nas capturas (Barthem e Petrere Jr, 1995). A pesca comercial explora todas as classes de comprimento conhecidas para a espécie, com exceção dos indivíduos menores de que 20 cm (localizados no estuário amazônico, *a priori*). Dentro deste cenário, a pesca também explora o grupo de douradas com dois anos de idade, antes destas poderem fazer a primeira desova e inviabilizando a contribuição destes indivíduos (Alonso, 2002).

1.3. A biologia de *Brachyplatystoma rousseauxii*

B. rousseauxii (Figura 3) é conhecida como dourada no Brasil, zúngaro dourado no Peru e plateado ou dourado na Colômbia. Possui como características morfológicas principais: grande porte (maior tamanho conhecido: 192 cm) cabeça prateada e achatada, corpo dourado e presença de barbilhões maxilares curtos (Eigenmann e Eigenmann, 1890; Barthem e Goulding, 1997). É diferente das outras espécies do gênero *Brachyplatystoma* não só pela cor, mas também pelo tamanho dos barbilhões e pela maxila e mandíbula serem de iguais dimensões (Ferreira *et al.*, 1998).

Figura 3. Indivíduo jovem de dourada – *Brachyplatystoma rousseauxii.* Escala = 20 cm.

1.3.1. Classificação taxonômica da dourada

A dourada foi originalmente classificada em 1855 por Castelnau e taxonomicamente revisada por Lundberg e Littmann (2003) em função de dados morfológicos, quando seu nome específico foi modificado de *Brachyplatystoma flavicans* para *Brachyplatystoma rousseauxii.*

Após revisão de Lundberg e Akama (2005), a dourada tem a seguinte classificação taxonômica:

Ordem: Siluriformes

Família: Pimelodidae

Tribo: Brachyplatystomatini

Gênero: *Brachyplatystoma*

Sub-gênero: *Malacobagrus*

Espécie*: Brachyplatystoma rousseauxii*

1.3.2. Distribuição geográfica da dourada

Possuindo ampla distribuição na bacia Amazônica (Figura 4), a dourada é encontrada desde as águas de baixa salinidade na região estuarina até as cabeceiras dos tributários do Ucayali/ Amazonas/Solimões, especialmente os de águas brancas como os rios Madeira, Purus e Juruá ambos da margem direita e os rios Napo, Japurá/Caquetá, Iça/Putumayo e Branco da margem esquerda (Barthem e Goulding, 1997; Fabré *et al.*, 2000; Goulding *et al.*, 2003; Barthem e Goulding, 2007). É encontrada também em tributários do rio Negro, rio Tocantins e na Bacia do Orinoco (Leite, 1993; Garcia, 1995) e rios da Guiana Francesa. Sua distribuição envolve o território de pelo menos sete países amazônicos (Bolívia, Brasil, Colômbia, Equador, Guiana Francesa, Peru e Venezuela) (Reis *et al.*, 2003).

Figura 4. Distribuição da Dourada – *Brachyplatystoma rousseauxii* na Amazônia. Fonte: (Goulding *et al.*, 2003).

1.3.3. Ciclo de vida da dourada

Os movimentos migratórios de uma espécie justificam-se em função das áreas de reprodução e criação não se sobreporem (Fonteles Filho, 1989; King, 1995). Com dados biológicos e de pesca experimental Barthem e Goulding, (1997) sugerem que um único estoque de dourada realiza grandes migrações, com áreas geograficamente distintas de criação, alimentação e reprodução. Os adultos migram para as cabeceiras dos afluentes do rio Solimões/Amazonas para reproduzir. Após a desova, larvas e juvenis são carregados pela corrente, concentrando-se na região do estuário amazônico (área de criação). Após 2 a 4 anos neste ambiente, incluindo a Amazônia Central (área de alimentação dos adultos e pré-adultos), os indivíduos iniciam uma migração de mais de 4500 km para voltar às cabeceiras e desovar, completando o ciclo de vida. Durante esta migração, dá-se o pico da captura, desde Belém no Brasil, até Pucallpa no Peru, incluindo localidades na Colômbia, Bolívia e Guianas (Figura 5). Realizando uma das mais longas migrações conhecidas para peixes de água doce do mundo.

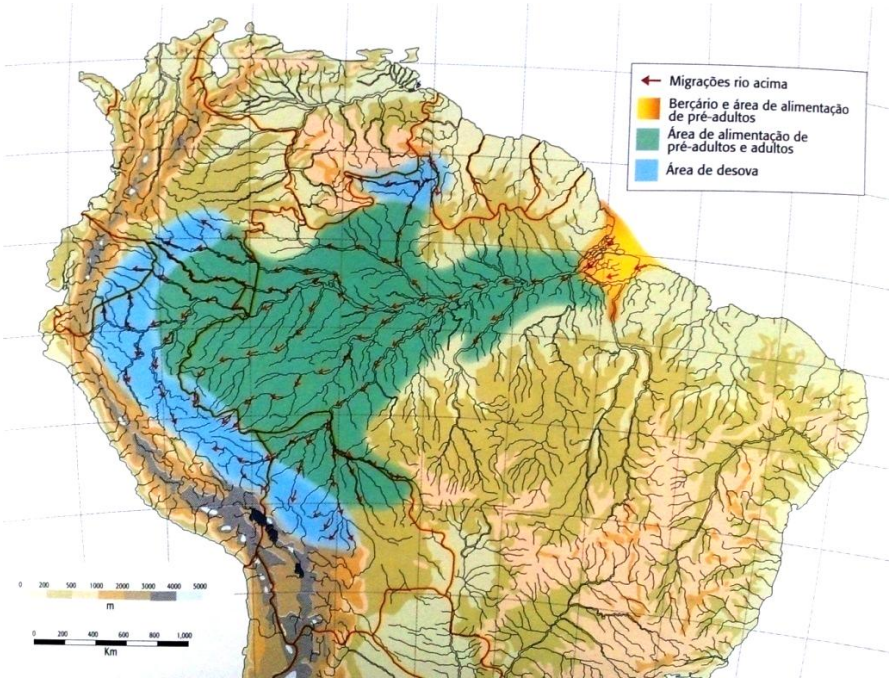

Figura 5. Modelo de migração proposto para a dourada (*Brachyplatystoma rousseauxii*) na Amazônia. Cabeceiras (em azul) - área hipotética de desova; Estuário (em amarelo) - Área de criação e de alimentação dos pré-adultos; Amazônia central (em verde) - Área de alimentação dos pré-adultos e adultos. Fonte: Barthem e Goulding (2007).

A referida hipótese de migração, foi pioneiramente abordada, sob o ponto de vista genético a partir de 911 pb (pares de bases) da região controle do DNA mitocondrial (DNAmt) de 45 indivíduos de dourada, coletados em três localidades no eixo EAS: Belém (referenciando a área de criação), Manaus (a área de alimentação) e Tabatinga, no alto Solimões (proximidades da área de reprodução). Dois resultados valem à pena serem mencionados: 1) Não foi encontrada segregação geográfica entre os haplótipos observados nos três locais (Figura 6). Este resultado corrobora, a princípio, a hipótese que postula um único estoque na Amazônia que migra desde o estuário amazônico até as cabeceiras para desovar (Barthem e Goulding, 1997); 2) Interessantemente, a variabilidade genética diminui no sentido Leste → Oeste (do estuário para as cabeceiras). Este cenário sugere que a menor variabilidade genética encontrada em Tabatinga/Letícia pode ser o resultado da migração seletiva de populações para afluentes específicos do rio Solimões (Figura 7). (Batista, 2001; Batista e Alves-Gomes, 2006).

Pela hipótese de Batista e Alves-Gomes (2006), os indivíduos de dourada adultos, na sua migração para reprodução, não escolheriam o afluente de forma aleatória, mas sim tenderiam a voltar aos afluentes onde nasceram. Com isso, na medida em que os cardumes de deslocam no sentido Oeste, parte da variabilidade genética vai sendo “capturada” pelos

afluentes e, desta forma, somente uma fração da variabilidade genética total da espécie chegaria até Tabatinga, Iquitos ou Pucallpa. Diante desta possibilidade levantada preliminarmente, é importante investigar se a dourada de fato apresenta filopatria (do tipo *homing*), ou seja, se os indivíduos sexualmente maduros retornam para os rios onde nasceram para reproduzir, a fim de completar seu ciclo de vida, como ocorre, por exemplo, com espécies da família Salmonidae, ou se os indivíduos escolhem os afluentes completamente ao acaso. Estratégias de conservação bastante divergentes deveriam ser adotas em cada um destes cenários e, por isso, a elucidação do ciclo de vida da dourada é de importância fundamental para a continuidade da explotação deste recurso pesqueiro.

Alguns estudos sobre a dourada, abordando aspectos biológicos e pesqueiros em alguns setores da Amazônia estão disponíveis (Ruffino e Isaac, 1995; Muñoz-Sosa, 1996; Barthem e Goulding, 1997; Rêgo *et al.*, 1998; Rezende, 1998; Alonso, 2002; Alonso e Pirker, 2005). Um dos trabalhos que envolveram dados morfométricos, merísticos e de pesca mais elucidativos sobre a dourada (Alonso, 2002), proveniente dos principais centros de desembarque localizados nas cidades de Belém, Santarém, Manaus e Tefé no Brasil, Letícia na Colômbia e Iquitos no Peru, corrobora a hipótese da existência de um único estoque de dourada que migra no Sistema EAS. Esta condição também é postulada por Barthem e Goulding (1997) e corroborada por evidências moleculares (Batista, 2001; Batista e Alves-Gomes, 2006). Alonso (2002) sugere ainda que a dourada, em sua dinâmica migratória, otimiza os recursos disponíveis ao longo da área de migração, sincronizando os movimentos com o regime hídrico de forma seqüencial, na qual peixes maiores se deslocam primeiro, e de forma cíclica, utilizando sazonalmente as áreas de crescimento, alimentação e reprodução. Entre os demais dados biológicos obtidos pelo autor, destacam-se: a idade estimada de 1,90 anos para a primeira maturação sexual, a de 1,51 para o recrutamento, de 1,97 anos a de primeira captura e a expectativa de vida, entre machos e fêmeas, estimada em 9,46 anos.

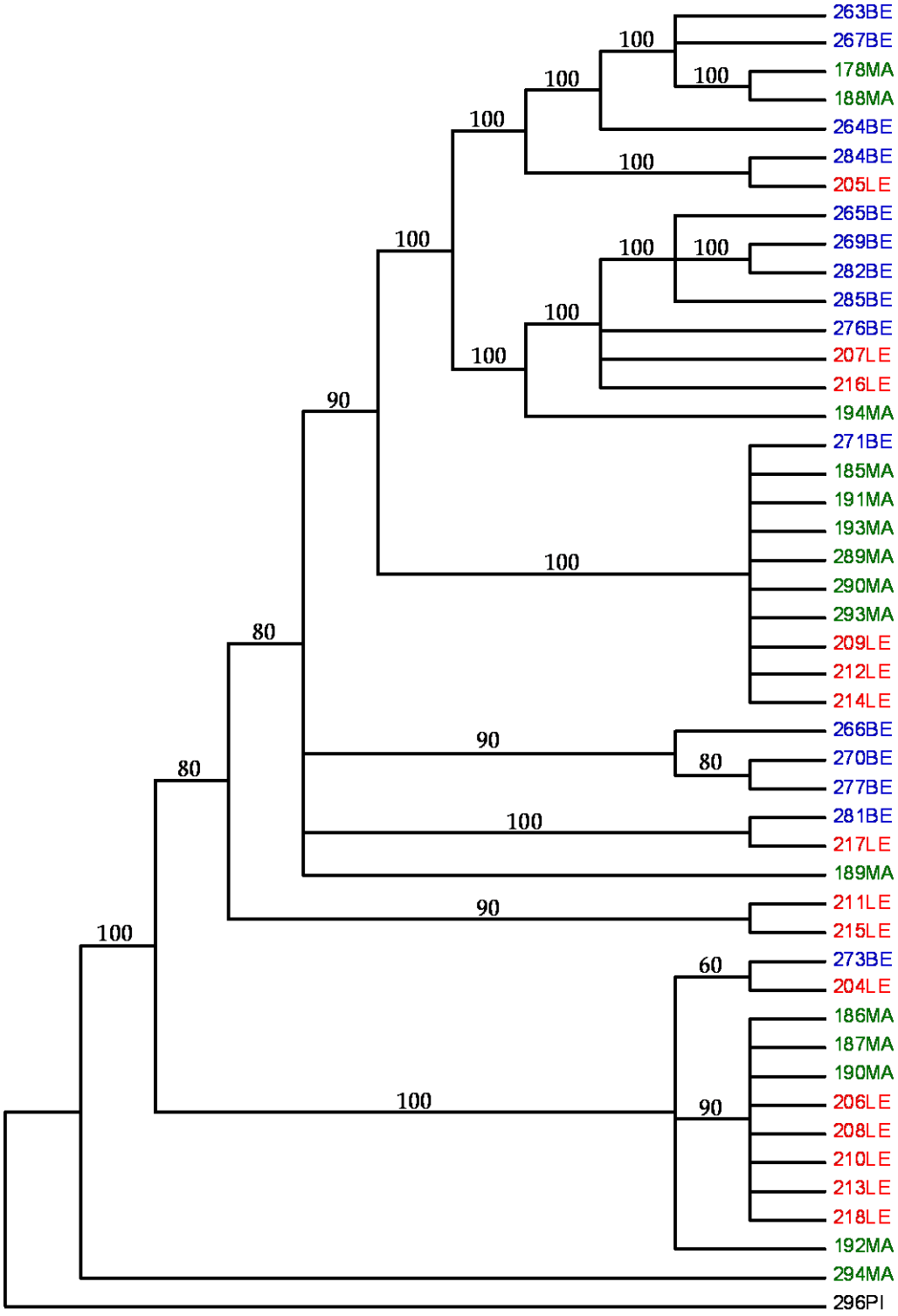

Figura 6. Árvore de Consenso pela regra da maioria de 50% entre todas as árvores obtidas por máxima parcimônia, máxima verossimilhança e distância, com os indivíduos amostrados de *Brachyplatystoma rousseauxii*. Os valores acima dos braços foram obtidos pelo mesmo consenso. Os táxons em azul foram coletados em Belém, em verde em Manaus e em vermelho em Letícia/Tabatinga. Em preto, o táxon *Brachyplatystoma vaillantii* utilizado como grupo externo. Fonte: Batista e Alves-Gomes (2006).

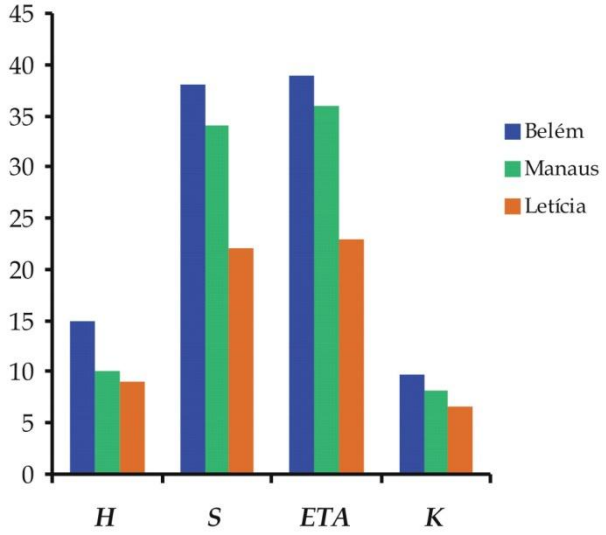

Figura 7. Histograma representativo da variabilidade nucleotídica observada nas amostras de *Brachyplatystoma rousseauxii* provenientes de Belém (azul), Manaus (verde) e Letícia/Tabatinga (vermelho). *H*, número de haplótipos; *S*, número de sítios polimórficos; *ETA*, número total de mutações; *K*, média da variabilidade nucleotídica par a par. Fonte: Batista e Alves-Gomes (2006).

1.4. A filopatria (*Homing*)

A filopatria ou *homing* é o retorno dos indivíduos de uma espécie ao rio onde nasceram para desovar. Esse comportamento ocorre em vários organismos e vem sendo o foco de muitas pesquisas (Stabell, 1984; Quinn *et al.*, 1991; Papi, 1992; Quinn, 1993; Dittman *et al.*, 1996b; Wehner *et al.*, 1996; Narum *et al.*, 2007; Lin *et al.*, 2008; Lohmann *et al.*, 2008; Munday *et al.*, 2009). Sua ocorrência depende da escala espacial e temporal considerada. O comportamento filopátrico, ainda que bem mais conhecido entre a maior parte dos peixes da família Salmonidae, necessita ainda de estudos para melhor elucidá-lo, especialmente nos salmões do oceano pacífico, pois o fenômeno é melhor conhecido nos salmões do atlântico. As informações hoje disponíveis sobre este comportamento, são em maior número nesse grupo de peixes devido a sua destacada importância comercial, recreativa e de pesca de subsistência, a diversidade de locais que ocupa e demais aspectos ecológicos (Council, 1996).

O reconhecimento do rio de nascimento tem sido atribuído, *a priori*, por meio de pesquisas com o sistema sensorial. Durante a fase embrionária até a de juvenil, os salmões “memorizam” o odor do ambiente em que nasceu e o “reconhece” ao escolher o rio para desovar sendo esta memorização e reconhecimento influenciado por fatores hormonais. Assim, o comportamento filopátrico está associado a adaptações intrínsecas ao ambiente aquático (Hasler e Scholz, 1983; Dittman *et al.*, 1996a). No entanto, o referido comportamento parece não ser total, ou seja, uma parcela da população pode não retornar

ao rio onde nasceu (*straying*). Estima-se que 90% ± 10% dos salmões são filopátricos e a proporção dos indivíduos que podem não ser, varia anualmente. A partir de um estudo utilizando marcação com etiquetas codificadas, foi verificado que a proporção do *homing* variou entre 72,5% (rio Cowlitz) a 90,1% (rio Lewis) em populações do Salmão *Oncorhynchus tshawytscha,* ao analisar cinco pontos de desova no baixo rio Columbia (Quinn, 1991). Em situações não filopátricas, o peixe tende a entrar em um rio com características físico-químicas (captadas sensorialmente) parecidas com as do rio onde nasceu (Pascual e Quinn, 1994), e possui a probabilidade de escolher o local de desova mais a montante do rio de origem (Quinn, 1991).

Fatores de desequilíbrio ou mudanças ambientais, ainda que em pequena escala, como alterações no fluxo da água, variações de temperatura e o tamanho da população, podem contribuir na variação temporal da não escolha do rio de origem para desovar. No último caso, a dinâmica de uma população menor pode ser diferente da dinâmica de uma maior (Quinn e Fresh, 1984). O comportamento filopátrico dos salmonídeos, bem como a escolha aleatória do rio para reproduzir, além de serem influenciados pela temperatura e fluxo da água, também os podem ser pela presença de outros salmões, qualidade do ambiente e outros fatores (Nicholas e Downey, 1983).

Utilizando marcadores isoenzimáticos, foi observado comportamento filopátrico em *Oncorhynchus nerka* (salmão *sockeye)* amostrado em 68 locais de desova, localizados em nove sistemas de lagos no Canadá, Rússia e Estados Unidos. Estrutura genética em subpopulações foi detectada dentro de cada sistema lacustre sugerindo que medidas de conservação sejam aplicadas aos locais de desova dessa espécie (Varnavskaya *et al.*, 1994). Utilizando 13 locos microssatélites, em exemplares do salmão *Chinook Oncorhynchus tshawytscha* provenientes de 25 localidades da bacia do rio Snake (tributário do rio Columbia), distribuídas em dois sistemas (o de rios e o oceânico), foi observado estrutura genética associada ao isolamento reprodutivo entre os dois sistemas. Estrutura genética foi detectada somente dentro do sistema de rios, sugerindo comportamento filopátrico dessa espécie nesse sistema (Narum *et al.*, 2007).

Diante do cenário exposto, é importante definir se a filopatria ocorre ou não em espécies de importância comercial, como a dourada, por exemplo, pela enorme necessidade que se tem em manejar este recurso pesqueiro de forma racional, uma vez que é fonte de renda e proteína para as populações humanas.

1.5. Variabilidade genética e a importância dos marcadores moleculares

Para a conservação de uma espécie é necessário entender sua biologia e ciclo de vida incluindo movimentos de dispersão, o comportamento reprodutivo, e os processos históricos aliados a fatores como barreiras ambientais. O conjunto desses fatores são os maiores responsáveis pela manutenção da variabilidade genética em populações (Frankham *et al.*, 2002). Sendo assim, é necessário estimar e conhecer a distribuição da variabilidade genética dentro e entre suas populações (Spruell *et al.*, 2003). Níveis altos de variabilidade genética geralmente são encontrados em populações naturais. Variações surgem em forma de mutações que são introduzidas na população por migração/fluxo gênico de indivíduos de outras populações e é perdida por endogamia, deriva genética e seleção natural (Nei, 1987). A variabilidade genética permite comparar indivíduos, populações e espécies diferentes (Ferguson *et al.*, 1995), permitindo a elaboração e execução mais adequada, e com alicerces do rigor cientifico, de programas de conservação e manejo. Esta variabilidade pode ser estimada por intermédio de diferentes índices de polimorfismo (Rosel e Reeves, 2000). Níveis altos de heterozigosidade em uma população permitem maior chance de sobrevivência, resistência a doenças, taxa de crescimento e sucesso reprodutivo aos indivíduos (Frankham *et al.*, 2002).

A partir da década de 80, o acesso mais preciso às estimativas da variabilidade genética foi proporcionado pelo uso de marcadores genéticos de DNA. Com eles foi possível conhecer melhor a história evolutiva de populações incluindo o grau de variação e a estrutura genética e vincular estas informações às respectivas distribuições geográficas.

Em menos de meio século, os marcadores moleculares permitiram um aprofundamento da visão dos geneticistas sobre a natureza. Todos os métodos moleculares desenvolvidos ao longo dos anos para acessar a variabilidade genética, baseiam-se em três diferentes classes de marcadores: os variantes de proteínas (alozimas), os de polimorfismo de sequências de DNA e os baseados em variação do DNA repetitivo. Entre os principais marcadores utilizados, destacam-se os marcadores de sequência de DNA e os microssatélites (Ferreira e Grattapaglia, 1998; Schlotterer, 2004). Esse destaque é refletido no número crescente de trabalhos publicados a partir da década de 80 abordando o uso desses marcadores (Figura 8).

A utilização de marcadores moleculares permite acessar desde o genoma em diferentes regiões, codificadoras ou repetitivas, conservadas ou altamente mutáveis, até estimar parâmetros genéticos úteis para um amplo espectro de estudos que incluem desde a identidade genética e construção de mapas genéticos até análises filogenéticas e evolutivas (Ferreira e Grattapaglia, 1998; Ferreira, 2001).

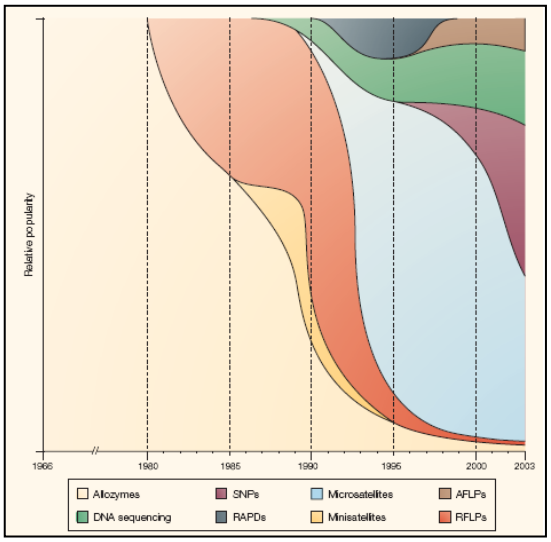

Figura 8. Visão da mudança e importância do uso de diferentes marcadores moleculares entre os anos de 1966 a 2003. Destaque à utilização dos marcadores de sequência de DNA (em verde) e os microssatélites (em azul) em expansão. Fonte: Schlotterer (2004).

O uso de marcadores moleculares em estudos ecológicos, filogenéticos, filogeográficos e de genética populacional podem gerar subsídios essenciais para conservação e manejo dos mais variados organismos. Atualmente uma série de diferentes marcadores moleculares está disponível. Para a escolha do melhor marcador, alguns fatores são considerados, tais como: o conteúdo informativo, acessibilidade, que inclui outros fatores como custo, o trabalho exigido, a rapidez dos ensaios e, sobretudo a questão biológica a ser respondida (Ferreira e Grattapaglia, 1998; Ferreira, 2001). Por contemplar em grande parte essas premissas, é que os fragmentos de DNA do genoma mitocondrial e os marcadores moleculares microssatélites têm sido utilizados como marcadores preferenciais (Goldstein e Schlotterer, 1999; Avise, 2004).

1.5.1. O DNA mitocondrial e a Região Controle na genética de peixes

Ainda que os marcadores de sequências de DNA inicialmente demandem maior custo monetário, avanços recentes na tecnologia de sequenciamento nucleotídico permitem a análise da sequência nucleotídica de vários fragmentos de DNA de vários indivíduos ao mesmo tempo (McVean *et al.*, 2002). Além disso, fornecem a informação completa sobre a região nucleotidica analisada e são amplamente utilizados para inferir padrões de seleção e de história demográfica em genética de populações. Razões como essas são também atribuídas para que os marcadores, baseados em sequências de DNA, sejam uma das escolhas preferenciais para a maioria das aplicações que visam acessar a variabilidade genética existente em populações naturais (Schlotterer, 2004). Desses, os fragmentos do DNA mitocondrial são os mais utilizados (Avise, 2004). Uma das razões em se usar o

DNAmt em estudos populacionais deve-se a sua alta taxa de mutação, estimada entre 5 a 10 vezes maior (5,7 X 10^{-8} substituição/sítio/ano) do que a de genes codificadores de proteínas do DNA nuclear (Brown *et al.*, 1982).

A organização do genoma mitocondrial (DNAmt) (Figura 9) inclui 13 genes codificadores de proteínas representando 90% do genoma, 22 RNA transferidor (tRNAs), 2 de RNAs ribossômicos (12S e 16S rRNA) e uma região não codificadora chamada de região controle (Avise, 1986; Meyer, 1993). Este genoma é geneticamente mais eficiente do que o DNA nuclear (Gray, 1989), por não conter sequências duplicadas e íntrons (Wolstenholme e Clary, 1985).

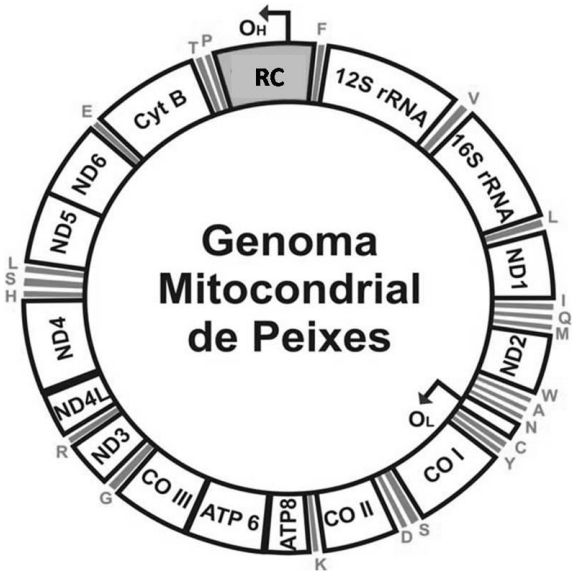

Figura 9. Esquema gráfico do DNA mitocondrial de peixes com a localização da região controle (com preenchimento). Fonte: modificado de Meyer (1993).

Um dos fragmentos de DNA mais utilizados desse genoma em estudos populacionais é a região controle (referenciado com uma seta na Figura 9). Este fragmento é a região não codificadora do genoma mitocondrial, possuindo em torno de 1100 pares de bases (pb) em peixes e localiza-se entre as regiões codificadoras de dois RNAs transportadores (RNAt), o RNAt da prolina e o RNAt da fenilalanina. Estima-se que a sua taxa de evolução está entre 2 a 5 vezes maior comparada aos demais genes mitocondriais codificadores de proteínas (Aquadro e Greenberg, 1983).

Além dos dados obtidos por Batista e Alves-Gomes (2006) sobre a dourada na Amazônia Brasileira a partir de sequências nucleotídicas da região controle do DNAmt, Coronel *et al* (2004) estudaram esta espécie, juntamente com o surubim – *Pseudoplatystoma fasciatum,* provenientes dos rios Ichilo e Beni (Bolívia), utilizando marcadores moleculares isoenzimáticos e de PCR-RFLP dos fragmentos mitocondriais

ND5/6, Citocromo B e região controle. Os autores encontraram uma maior variabilidade genética para a dourada em relação ao surubim, e sugerem que as duas espécies provavelmente já sofrerem redução em suas populações em escalas de tempo diferentes. Estudos sobre algumas espécies de bagres do gênero *Brachyplatystoma*, utilizando a região controle como marcador molecular, já foram realizados e os principais resultados são os seguintes: A dourada (*B. rousseauxii*) compreende uma única população geneticamente homogênea, em função de resultados oriundos de indivíduos coletados em três localidades da Amazônia Brasileira (estuário - próximo a Belém, Manaus e Tabatinga). Porém, um decréscimo significativo nos níveis de variabilidade genética foi verificado ao se comparar os indivíduos capturados no estremo Leste (estuário) com indivíduos coletado no Oeste (Tabatinga/Alto Solimões) da Amazônia. Sob este cenário, a hipótese proposta para o declínio da variabilidade genética no sentido Leste-Oeste foi a de um possível comportamento filopátrico (Batista e Alves-Gomes, 2006). A mesma espécie apresentou altos níveis de variabilidade genética na bacia do rio Branco na Amazônia, um tributário do rio Negro. A partir da amostragem em duas localidades ao longo do rio (Boa Vista e Caracaraí) a dourada compõe uma única população nessa bacia (Briglia-Ferreira, 2007).

A piramutaba (*B. vaillantii*) apresenta altos níveis de variabilidade genética e compõem uma única população no eixo estuário-Amazonas-Solimões, a partir de um estudo envolvendo espécimes amostrados em cinco localidades ao longo desse eixo (Belém, Santarém, Manaus, Tefé e Tabatinga). Diferentemente da dourada, não foi encontrada diferenças significativas na variabilidade genética no sentido Leste → Oeste (Formiga-Aquino, 2004). O mesmo cenário foi encontrado para a esta espécie no sentido Norte → Sul, quando se comparou quatro localidades da Amazônia brasileira, incluindo-se dois tributários de água branca, sendo um da margem esquerda (rio Japurá) e um da margem direita (rio Madeira), e em duas localidades do rio Solimões (Manaus e Tefé) (Rodrigues, 2009). Além de corroborar os dados obtidos por Formiga-Aquino (2004), sobre a presença de um único estoque panmítico, o mesmo estudo não obteve diferenças significativas na variabilidade genética da espécie no sentido Norte-Sul. Estes resultados foram obtidos utilizando-se tanto a região controle (DNAmt), como também marcadores microssatélites como marcadores moleculares, discutidos mais a diante.

A piraíba *(B. filamentosum)* aparenta apresentar três estoques pesqueiros (clados), sendo cada estoque relacionado a um tipo água (branca, preta e clara). Os clados relacionados às águas claras e escuras revelaram baixos valores de diversidade haplotípica (Huergo, 2009). Nesse mesmo estudo também foi estimada a variabilidade genética da piraíba negra (*B. capapretum*) amostradas em localidades da calha e de tributários do rio Solimões/Amazonas, sendo que esta espécie apresentou baixos níveis de variabilidade genética comparado aos de *B. filamentosum*.

Nessa perspectiva, a região controle vem sendo amplamente utilizada com o propósito de estimar a variabilidade e estrutura genética em populações naturais de diferentes espécies de peixes amazônicos. A maior parte desses estudos visa à caracterização genética da espécie alvo ao longo de um raio de distribuição geográfica e têm uma ampla abrangência taxonômica, incluindo o pacu - *Mylesinus paraschomburgkii* (Porto, 1999), as curimatãs - *Prochilodus lineatus* (Sivasundar et al., 2001) *e Prochilodus nigricans* (Machado, 2009), o tambaqui - *Colossoma macropomum* (Santos *et al.*, 2007)*, o* jaraqui-escama-grossa - *Semaprochilodus insignis* (Batalha, 2009*)*, o peixe lápis - *Nannostomus eques* (Terêncio, 2009), o acará disco - *Symphysodon* spp*.* (Farias e Hrbek, 2008)*,* a pescada – *Plagioscion squamosissimus* (Galetti, 2009), o sarapó - *Hypopygus lepturus* (Schmitt, 2005)*,* a piramutaba - *Brachyplatystoma vaillantii* (Formiga-Aquino, 2004; Rodrigues, 2009)*,* - as piraíbas - *Brachyplatystoma filamentosum* e piraíba negra - *B. capapretum* (Huergo, 2009), a dourada - *Brachyplatystoma rousseauxii* (Batista e Alves-Gomes, 2006) entre outros.

1.5.2. Marcadores Moleculares Microssatélites

Outra classe de marcador molecular intensamente utilizada atualmente em estudos populacionais são os marcadores microssatélites. Deste a década de 90 é o marcador molecular mais utilizado em estudos ecológicos e genéticos (Goldstein e Schlotterer, 1999; Schlotterer, 2004) (Figura 8).

Os microssatélites são sequências nucleotídicas de tamanho curto, contendo entre um a seis pares de bases (bp), repetidos *em tandem* (“em fila”). São encontrados em alta frequência no genoma nuclear da maioria dos organismos (Avise, 2004). São também conhecidos como *Short Tandem Repeats* (STR), *Variable Number of Tandem Repeats* (VNTR), *Sequence Tagged Microsatellites* (STMS), *Single Sequence Length Polymorphisms* (SSLP) e *Simple Sequence Repeats* (SSR), como será referenciado nesse estudo.

Os microssatélites são regiões do genoma que estão submetidas a taxas de mutação elevadas, variando entre 10^{-2} a 10^{-6} nucleotídeos/loco/por geração (Hoelzel, 1998; Schlötterer, 2000). Algumas hipóteses sobre os processos mutacionais foram sugeridas para explicar os mecanismos que levam a altas taxas de mutação: o *Crossing over* desigual que ocorre durante o pareamento meiótico devido à natureza repetida das sequências nucleotídicas (Jefreys *et al.*, 1994) e os escorregões ou deslizamento da DNA polimerase (*slippage*) durante o processo de replicação (Levinson e Gutman, 1987). Neste processo, surgem repetições de DNA através de mutações do tipo inserções e deleções (*indels*), que duplicam ou eliminam sequências adjacentes (Rose e Falush, 1998; Zhu *et al.*, 2000). Estudos indicam que o mecanismo de *slippage* seja o principal responsável pelas taxas

elevadas de mutação e pelo grande número de polimorfismos dos microssatélites (Schlotterer e Tautz, 1992; Eisen, 1999; Zhu *et al.*, 2000). Um terceiro mecanismo ainda não esclarecido,está associado aos retrotransposons, no qual os microssatélites ricos em adenina são gerados pela extensão terminal 3' dos retrotranscritos, semelhante ao mecanismo de poliadenilação dos RNAm (Arcot *et al.*, 1995).

De uma forma geral assume-se que os microssatélites são marcadores de seletividade neutra permitindo que alguns modelos de evolução sejam aplicáveis. Muito pouco se sabe sobre os mecanismos de evolução desses marcadores. Três modelos são discutidos: o modelo IAM (*Infinite Allele Model*) ou modelo do alelo infinito que considera que mutações nas sequências de microssatélites resulta em perda ou ganho de uma ou mais unidades de repetição de forma que cada mutação resulta em novo alelo de forma aleatória (Kimura e Crow, 1964); as estatísticas F (Wright, 1931) são baseadas nesse modelo; O modelo SMM (*Stepwise Mutation Model)* ou modelo de mutação gradual em passos, em que a mutação em um determinado alelo dar-se pelo ganho ou perda de uma unidade de repetição de cada vez. Os alelos de igual ou de tamanhos próximos são geneticamente mais próximos entre si. É o modelo mais aceito para os microssatélites. O índice de diferenciação genética R_{ST} (Slatkin, 1995) é baseado nesse modelo. Finalmente, o modelo TPM (*Two Phase Model*), ou modelo de duas fases, é baseado na teoria da coalescência e assume diferentes processos mutacionais e história demográfica na estimativa da variância no número de repetições de um microssatélite. Esse modelo é uma extensão do modelo SMM, porém assume não só que mutações de maiores magnitudes podem ocorrer como também podem ser originadas a partir de um ou de muitos passos mutacionais (Di Rienzo *et al.*, 1994).

O nível de polimorfismo em um loco microssatélite é resultante do número de repetições do motivo (unidade repetitiva) que o caracteriza que geralmente varia entre 5 a 40 repetições, ainda que seja possível encontrar sequências de tamanho maior (Li *et al.*, 2002). Podem ser classificados em relação ao motivo, como mono, di, tri, tetra, penta e hexanucleotídico ordenados em *tandem* (em fila) em um determinado loco de um cromossomo (Hamada *et al.*, 1984; Queller e Goodnight, 1989).

Quanto à natureza da repetição, os microssatélites podem ser classificados em: perfeitos, quando a sequência de DNA repetida não é interrompida por qualquer base nucleotídica que não pertença ao motivo de repetição (ex: TATATATATATATATA); imperfeitos, quando existe na sequência de DNA do microssatélite, nucleotídeo (s) que não corresponde (em) ao motivo de repetição (ex: TATATATATgcTATATAATA); compostos, quando a sequência nucleotídica do microssatélite é formado por dois ou mais motivos de repetição distintos e adjacentes (ex, TATATATATATATCTCTCTC) e interrompidos se ocorre uma inserção de um pequeno número de bases que não se encaixam na estrutura

repetitiva do microssatélite (ex: TATATATATgcagtcATATATAATA) (Weber, 1990; Goldstein e Schlotterer, 1999). Destes, os microssatélites do tipo dinucleotideo são os mais abundantes no genoma da maioria dos táxons (Li *et al.*, 2002).

Vários são os motivos e vantagens do uso e aplicação dos microssatélites como marcador molecular em estudos ecológicos e de genética populacional (Goldstein e Pollock, 1997): i) altos níveis de polimorfismo; ii) são co-dominantes, ou seja, ambos alelos de um indivíduo heterozigoto podem ser visualizados e detectados; iii) estão amplamente distribuídos no genoma dos eucariotos; iv) são multialélicos; v) são amplificados por PCR, o que facilita sua detecção ainda que se utilize poucas quantidades de DNA, vi) os locos, uma vez que os *primers* tenham sido validados, podem ser compartilhados entre laboratórios bem como também utilizados em estudos de outras espécies relacionadas (amplificação heteróloga), ainda que esses marcadores sejam de natureza espécie-específica e vii) permitem ser analisados em sistema *multiplex* (amplificação e/ou genotipagem de mais de um loco simutaneamente).

Ainda que os microssatélites tenham todas as vantagens mencionadas, há desvantagens: a demanda de tempo e a complexidade metodológica, necessário para o desenvolvimento prévio dos marcadores microssatélites, o alto custo para a síntese de *primers* específicos (principalmente marcados com fluorescência) para a amplificação dos locos por PCR, o modelo de evolução não é totalmente esclarecido, a possível presença de homoplasia (alelos idênticos por estado e não por descendência), artefatos de PCR podem causar erros de genotipagem, a possibilidade de ocorrência de alelos nulos, *sttuters* (bandas “fantasmas”) e *dropout* (quando a PCR favorece a amplificação do alelo maior em um heterozigoto, podendo ocorrer quando a diferença de tamanho (pb) entre os dois alelos é alta) (McCouch *et al.*, 1997; Ferreira e Grattapaglia, 1998; Selkoe e Toonen, 2006). Apesar dessas desvantagens, os resultados advindos com o uso dos microssatélites têm sido importantes no esclarecimento sobre a estrutura genética de populações e, consequentemente, usados frequentemente em questões relacionadas ao manejo e conservação de populações sob explotação econômica.

Locos microssatélites já foram isolados e caracterizados para várias espécies de peixes amazônicos de interesse econômico, a fim de serem utilizados em estudos de genética de populações direcionados à conservação tais como: o pirarucu (*Arapaima gigas*) (Farias *et al.*, 2003), o aruanã (*Osteoglossum bicirrhosum*) (Silva *et al.*, 2009), o cardinal (*Paracheirodon axelrodi) (Beheregaray et al., 2004)*, o peixe borboleta (*Carnegiella marthae*) (Beheregaray *et al*., 2006), o tambaqui (*Colossoma macropomum*) (Santos *et al.*, 2009), a pescada amarela (*Cynoscion acoupa)* (Farias *et al.*, 2006); o acará-disco (*Symphysodon discus*) (Amado *et al.*, 2008) e o acara-açu (*Astronotus crassipinis*) (Sousa *et al.*, 2009).

Marcadores microssatélites também já foram desenvolvidos para algumas espécies de peixes da Ordem Siluriformes. Entre as quais estão: o pintado (*Pseudoplatystoma corruscans* (Revaldaves *et al.,* 2005), *Pimelodella chagresi* (Moeser e Bermingham, 2005), o grande bagre do Mekong (*Pangasianodon gigas*) (Ngamsiri *et al.*, 2006), o Jau (*Zungaro jahu*) (Carrillo-Avila *et al.*, 2009) e a piramutaba (Rodrigues *et al.*, 2009).

A utilização conjunta de sequências de DNA e microssatélites em peixes trás a possibilidade de se comparar a eficiência relativa de cada marcador, bem como permite que hipóteses sejam testadas de forma complementar, reforçando aquelas que sejam validadas ou falsificadas pelos dois marcadores simultaneamente. Entre trabalhos que utilizaram estes dois marcadores em peixes, pode-se citar: o de Bentzen *et al.* (2001), que utilizaram marcadores microssatélites para inferir relações de parentesco em duas espécies de salmões do pacífico, *Oncorhynchus tshawytscha* e *O. mykiss*, provenientes de três populações de locais de desova distintos do Rio *Dungeness* no estado de Washington. Os autores detectaram fortes evidências de filopatria na primeira espécie mencionada. O estudo realizado por Hrbek *et al.* (2007) em populações de pirarucu (*Arapaima gigas*), a fim de delimitar áreas para a conservação da diversidade genética desta espécie de alto valor econômico na Amazônia.

Como justificativa teórica, o presente estudo visa reavaliar os resultados preliminares, provenientes da região controle do DNA mitocondrial (Batista e Alves-Gomes 2006), com uma base de dados inédita para um peixe migrador da Amazônia. Foram amostradas 33 locais na bacia Amazônica, envolvendo 15 regiões (chamadas de localidades nesse estudo) em dois países (Brasil e Peru) e amostras foram obtidas de 700 indivíduos. Neste sentido, busca-se não somente uma visão diagnóstica geral da variabilidade genética desta espécie envolvendo grande parte da Amazônia, mas também busca-se testar a possível filopatria da dourada, sugerida previamente por Batista e Alves-Gomes (2006). Este trabalho também desenvolve marcadores moleculares do tipo microsatélites para *B. rousseauxii*, que por ter natureza espécie-específica, foram desenvolvidos, em todos seus passos, especificamente para esta espécie.

Ainda que informações sobre o ciclo de vida da dourada na Amazônia tenham sido propostas até o momento (Barthem e Goulding, 1997; Alonso, 2002; Batista e Alves-Gomes, 2006; Barthem e Goulding, 2007) várias informações cruciais ainda precisam ser levantadas. Com esta abordagem complementar de uso de dois marcadores moleculares (Região controle do DNA mitocondrial e microssatélites), busca-se melhor caracterizar a dourada como “estoque pesqueiro” na sua área de ocorrência e contribuir para sua conservação e manejo, com subsídios científicos sólidos.

Diante deste cenário as hipóteses testadas no presente estudo são:

H_0= Não existe estrutura de população em *B. rousseauxii*, tanto no eixo Estuário/Amazonas/Solimões como em seus tributários, contribuindo para a ausência de comportamento filopátrico (*homing*) nessa espécie.

H_1= Os parâmetros genéticos mostram a existência de estrutura genética populacional em *B. rousseauxii*, seja no eixo Estuário/Amazonas/Solimões ou em seus tributários, e a distribuição da variabilidade genética em função da geografia pode ser caracterizada como um comportamento de filopatria (*homing*).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Caracterizar geneticamente a dourada (*B. rousseauxii*) na Amazônia, a fim de verificar, por intermédio de marcadores moleculares de sequências de DNA mitocondrial (região controle) e nucleares (microssatélites), se esta espécie constitui um único estoque, de larga distribuição e geneticamente homogêneo, ou se a pescaria é exercida sobre vários estoques, geneticamente diferenciáveis. Dentro desta segunda possibilidade, também vai-se testar a hipótese de *homing* na dourada.

2.2. Objetivos específicos

- Isolar e caracterizar marcadores microssatélites para *B. rousseauxii* e verificar o alcance da trans-especificidade em seis espécies do mesmo gênero (Capítulo I);

- Utilizar a região controle (DNAmt) e marcadores moleculares microssatélites para estimar e comparar a variabilidade genética da dourada na Amazônia, em amostras oriundas de 15 localidades da Amazônia distribuídas no Sistema Estuário-Amazonas-Solimões (SEAS), sendo sete no eixo principal do sistema, cinco em tributários da margem direita e três em tributários da margem esquerda do rio Solimões/Amazonas (Capítulo II);

- Verificar se existe alguma segregação na diversidade molecular que possa indicar a existência de estoques distintos relacionados à distribuição geográfica (Capítulo II);

- Verificar se *Brachyplatystoma rousseauxii* possui comportamento filopátrico (Capítulo II).

CAPÍTULO I : Marcadores de DNA microssatélites para a dourada (*Brachyplatystoma rousseauxii*, Siluriformes: Pimelodidae), o bagre de maior importância para a pesca na Amazônia: desenvolvimento, caracterização e amplificação interespecífica

A maioria dos resultados que constam no presente capítulo (obtidos com a segunda biblioteca genômica) foi publicado na revista *Conservation Genetics Resources* durante o desenvolvimento da presente Tese (**APÊNDICE A**).

Batista, J. S.; Farias, I. P.; Formiga-Aquino, K.; Sousa, A. C. B.; Alves-Gomes, J. A. 2009. DNA microsatellite markers for ‘‘dourada’’ (*Brachyplatystoma rousseauxii,* Siluriformes: Pimelodidae), a migratory catfish of utmost importance for fisheries in the Amazon: development, characterization and inter-specific amplification. *Conservation Genet Resour*. DOI 10.1007/s12686-009-9117-5.

O presente capítulo seguiu as regras de formatação e estilo da referida revista.

Resumo A dourada (*Brachyplatystoma rousseauxii)* está entre as duas espécies de bagre de maior importância comercial na região Amazônica. Dados recentes apontam que esta espécie encontra-se em sobrepesca de crescimento. Trinta e seis marcadores microssatélites foram isolados e caracterizados em 35 indivíduos da espécie, com os quais foram obtidos um total de 349 alelos. O número de alelos por loco variou entre 2 a 22, com uma média de 9,70. A heterozigosidade observada (H_o) e esperada (H_e) variou entre 0,143 a 0,914 (média de 0.614) e 0,215 a 0,929 (média de 0,712), respectivamente. Nove locos não se mostraram em equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) e desequilíbrio de ligação foi detectado entre os locos BR2/BR38, BR2/BR61, BR3/BR68, BR68/BR44, BR68/BR48 e BR68/BR61. A amplificação heteróloga resultou entre 15 a 27 locos polimórficos entre as seis espécies do gênero *Brachyplatystoma.* Os marcadores microssatélites obtidos poderão ser utilizados em estudos genéticos que poderão não só subsidiar políticas de conservação e manejo para a dourada, mas também para as demais espécies comerciais do gênero *Brachyplatystoma.*

Palavras chaves: *Brachyplatystoma rousseauxii,* bagre migrador, marcadores microssatélites, Amazônia, dourada, Siluriformes.

De acordo com levantamentos socioeconômicos e estatísticos, *B. rousseauxii* (Siluriformes: Pimelodidae), popularmente conhecida como dourada em português e dorado em espanhol, é provavelmente a espécie do gênero *Brachyplatystoma* mais importante para a pesca na Amazônia (Petrere *et al.*, 2004; Barthem e Goulding, 2007; IBAMA, 2008). Essa espécie vem sendo capturada há décadas ao longo da bacia Amazônica, desde pequenos vilarejos, em regiões próximas ao sopé dos Andes no Peru, Colômbia, Bolívia, Equador e Venezuela, passando por centros urbanos maiores ao longo do Sistema Amazonas-Solimões (SAS), até o estuário amazônico, onde o esse Sistema se encontra com o Oceano

Atlântico, no nordeste do Brasil (Barthem e Goulding, 1997; 2007). Estudos recentes apontam que essa espécie se encontra em sobrepesca de crescimento (Alonso, 2002).

B. *rousseauxii* possui um ciclo de vida complexo e pouco compreendido que inclui a maior migração reprodutiva conhecida para peixes de água doce. Este ciclo compreende áreas de criação, alimentação e reprodução geograficamente diferenciadas, distantes cerca de 4500 km (Barthem e Goulding, 1997; Batista e Alves-Gomes, 2006; Barthem e Goulding, 2007). Os adultos desovam preferencialmente nas cabeceiras dos tributários de água branca do EAS. Após a desova, as larvas e juvenis são carreados com auxilio da correnteza, até o canal principal do rio Solimões/Amazonas, e daí até a região do estuário do rio Amazonas, onde eles se alimentam e crescem até atingirem entre 2 e 5 anos de idade, quando a jornada migratória recomeçaria em direção às regiões da Amazônia ocidental para desovar.

Essa espécie compreende uma única população geneticamente homogênea que habita o canal principal do EAS de acordo com dados genéticos, obtidos a partir de indivíduos oriundos de três localidades da Amazônia brasileira (estuário, Manaus e Tabatinga). Todavia, um decréscimo significativo nos níveis de variabilidade genética foi verificado ao comparar os indivíduos capturados do Leste (Belém/estuário) aos do Oeste (Tabatinga/Alto Solimões) da Amazônia. Este cenário sugere que esta espécie possua um comportamento filopátrico em que há uma escolha não aleatória do tributário, ou seja, uma porção considerável da população de *B. rousseauxii* está retornando para o tributário que nasceu, para desovar (Batista e Alves-Gomes, 2006). De acordo com essa hipótese, cada tributário de água branca do EAS recebe uma parcela da diversidade genética dessa espécie. No intuito de não só melhor compreender esse cenário, mas também de gerar informações para subsidiar planos de conservação e manejo pesqueiro, foram isolados e caracterizados 36 marcadores moleculares microssatélites para *B. rousseauxii*.

Foram construídas duas bibliotecas genômicas enriquecidas em regiões microssatélites. A biblioteca 01, seguindo a metodologia descrita por Tenzer et al. (1999) com modificações de Farias et al. (2003), e a biblioteca 02 segundo descrito por Billotte et

al. (1999). O DNA genômico foi extraído, utilizando o método fenol-clorofórmio (Sambrook et al., 1989) a partir do tecido muscular de um *pool* de sete indivíduos amostrados em março/1999 na cidade de Belém-PA, Brasil (Biblioteca 01) e 10 indivíduos amostrados no município de Iranduba-AM, Brasil em outubro/1999 (Biblioteca 02). O DNA extraído (5 µg) foi digerido com a enzima *SAU3AI* (Biblioteca 01) e *RSAI* (Biblioteca 02). Fragmentos de DNA contendo microssatélites foram selecionados por hibridização com sondas CT_{13} (Biblioteca 01) e $(CT)_8$ e $(GT)_8$ (Biblioteca 02) biotiniladas e recuperadas por esferas magnéticas contendo estreptavidina (Streptavidin MagneSphere® Paramagnetic Particles, Promega). Os fragmentos selecionados foram ligados aos vetores de clonagem pCR II-TOPO (Biblioteca 01) e pGEM-T *easy vector* (Promega), e transformados em células competentes da linhagem TOPO TA (Biblioteca 01) e XL1-*blue* de *Escherichia coli* (Biblioteca 02). Posteriormente foram inoculados em placas contendo X-Gal/IPTG e meio sólido Luria–Bertani (LB) com ampicilina (100 mg/mL) e incubados entre 18 a 22 horas a 37 ºC. Colônias brancas individuais foram transferidas e incubadas a 37 ºC em placas (96 poços) contendo meio de cultura líquido *circle grow* (Bio101,INC) (Biblioteca 01) e 2YT-HMFM (Biblioteca 02) com ampicilina (100 µg/mL).

Trezentos e quarenta e seis clones recombinantes oriundos da biblioteca 01 foram amplificados por PCR diretamente da colônia de bactérias, utilizando os *primers* T7 e M13R, e purificados com o kit GFX (GE Healthcare) seguindo as recomendações do fabricante. Posteriormente foram seqüenciados com os referidos *primers* utilizando-se o kit *DYEnamic ET dye terminator* (GE Healthcare) e eletroinjetados em MegaBACE 1000 (GE Healthcare). O DNA plasmidial dos 133 clones recombinantes da biblioteca 02 foi extraído por lise alcalina (Sambrook e Russell, 2001) e posteriormente seqüenciado utilizando-se os *primers* T7 e SP6, juntamente com o kit *Big Dye terminator* v3.1, e eletroinjetado no ABI PRISM® 3130 automated *Genetic Analyzer* (Perkin Elmer, Applied Biosystems).

Cento e sessenta clones com microssatélites (46,24%) foram identificados na biblioteca 01 e destes, noventa e oito clones (61,25%) não redundantes foram selecionados, editados e caracterizados utilizando o programa BIOEDIT 7.0.9.0 (Hall, 1999) e CHROMAS

2.33 (Technelysium Pty Ltd). Foram desenhados 36 pares de *primers* (IDT) com o auxílio do programa PRIMER 3 (Rozen e Skaletsky, 2000).

Sequências nucleotídicas de 120 clones (85%) da biblioteca 02 foram editadas e compiladas com o auxílio do programa STADEN *package* (Staden, 1996). O programa WEBSAT (Martins *et al.*, 2009) foi utilizado na identificação de 140 regiões com microssatélites, presentes em 83 clones (contigs) (81,37%) não redundantes. A partir destes, foram selecionados 51 contigs (61,45%) que com o referido programa, juntamente com o programa PRIMER 3 (Rozen e Skaletsky, 2000) implementado em sua plataforma, foi desenhado 40 pares de *primers* (IDT).

Nas duas bibliotecas genômicas foram considerados microssatélites do tipo dinucleotídeo aqueles com mais de seis repetições do motivo, trinucleotídeo que tivessem um mínimo de cinco repetições e pentanucleotídeo com três ou mais repetições do motivo. A maioria dos motivos de repetição encontrados nas duas bibliotecas foi classificada como dinucleotídeos (89,29%), seguidos de 4,29% de trinucleotídeos e tetranucleotídeos cada, 1,43% de pentanucleotídeos e 0,71% de hexanocleotídeos.

Foi adicionada uma cauda M13 na extremidade 5´ de cada *primer forward* dos 76 pares de *primers* (36 pares da biblioteca 01 e 40 da biblioteca 02) desenhados no intuito de permitir a marcação por fluorescência de acordo com o protocolo econômico descrito por Schuelke (2000).

Os fragmentos contendo microssatélites foram amplificados em um volume final de 10 µL contendo: 10-50 ng de DNA genômico, 0,4 µM de cada *primer forward* e do *primer* M13 marcado (com a fluorescência FAM ou HEX), 0,8 µM do *primer* reverso, 200 µM de cada dNTP (GE *Healthcare*), 1,5 $MgCl_2$, 1X de tampão (10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, pH 8,4) e 0,5 U de *goTaq* DNA polimerase (*Promega*). O PCR foi conduzido utilizando dois programas: o primeiro consiste na desnaturação (68 °C, 1 min; 94 °C, 30 s) seguida de 30 ciclos de 30 s a 92 ºC, 35 s na temperatura de anelamento específica de cada par de *primer* (Tabela 1 e 2), 40 s a 68 ºC; o segundo programa consiste em 15 ciclos com as seguintes condições de temperatura e tempo: 25 s a 92 °C, 35 s a 53 °C, 30 s a 72 °C e uma extensão

final a 68 °C for 15 min e a 72 °C 15 min. Cada produto de PCR foi verificado em eletroforese em gel de agarose 2% corado com brometo de etídeo (0.1 mg/mL) e fotodocumentado em sistema de fotodocumentação *Eagle Eye* II (*Stratagene*). Posteriormente os produtos de PCR foram eletroinjetados no analisador de DNA MegaBACE 1000 (GE *Healthcare*) e o tamanho dos alelos foi estimado com o programa FRAGMENT PROFILER v1.2 (GE *Healthcare*) usando o padrão de genotipagem ET-400 ROX (GE *Healthcare*).

Foram obtidos 36 locos microssatélites polimórficos. Sendo seis locos na biblioteca 01 (BR1 ao BR24) (Tabela 1) e 30 locos na biblioteca 02 (BR37 ao BR76) (Tabela 2). Estes foram utilizados em 33-35 indivíduos de *B. rousseauxii* amostrados em 10 cidades do Estado do Pará, Brasil (Belém N=4; Almerim N=16; Soure N=6; Gurupá N=4; Breves N=1; Guajará N=2; Paracauary N=2). A estatística descritiva, o teste de Equilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE) e de Desequilíbrio de Ligação (LD) foram inferidos com o auxílio do programa ARLEQUIN v3.11 (Excoffier *et al.*, 2005).

O número de alelos por loco variou entre 2 (BR55) a 22 (BR57), com uma média de 9,70. A heterozigosidade observada (H_o) variou entre 0,143 a 0,914 (BR74-BR38, respectivamente) com uma média de 0,614, enquanto que a heterozigosidade esperada (H_e) variou entre 0,215 a 0,929 (BR64 e BR50, respectivamente) com uma média de 0,712. Nove locos (BR1, BR3, BR5, BR24, BR52, BR61, BR63, BR67 e BR74) não apresentaram equilíbrio de Hardy-Weinberg após correção de Bonferroni (Rice, 1989). Desequilíbrio de ligação foi verificado entre os locos BR2/BR38, BR2/BR61, BR3/BR68, BR68/BR44, BR68/BR48 e BR68/BR61. A presença de alelo nulo foi testada usando o programa MICRO-CHECKER v2.2.3 (Van Oosterhout *et al.*, 2004) e detectada nos locos BR1, BR3, BR5, BR24, BR52, BR55, BR61, BR67 e BR74.

O conteúdo de polimorfismo informativo (PIC) (Botstein et al., 1980) variou entre 0,207 (BR64) a 0,910 (BR50) com uma média de 0,669. O poder discriminante (Jones, 1972) foi estimado para cada loco variando entre 0,403 (BR64) a 0,995 (BR38), apresentando média de 0,847.

Todos os 36 locos polimórficos foram testados na amplificação trans-específica em seis espécies do gênero *Brachyplatystoma* (Tabela 3). Trinta e cinco locos amplificaram em pelo menos uma espécie e 17 locos amplificaram em todas as seis espécies. O número de locos amplificados variou entre 22 em *B. tigrinum* e 35 em *B. capapretum,* o número de locos polimórficos variou entre 15 em *B. tigrinum* a 27 em *B. filamentosum e* o número de alelos variou entre um a sete alelos por loco.

Em função destes resultados os locos microssatélites polimórficos desenvolvidos podem ser usados como marcadores moleculares não só para acessar a estrutura e a diversidade genética de *B. rousseauxii*, mas também das demais seis espécies do gênero *Brachyplatystoma*. Considerando que esse gênero engloba as espécies de bagre comercialmente mais importantes na Amazônia, o isolamento, caracterização e aplicação desses marcadores podem contribuir significativamente no subsídio de políticas de conservação e manejo dessas espécies na região Amazônica.

Tabela 1. Caracterização de seis locos microssatélites polimórficos, desenvolvidos a partir da biblioteca genômica 01, em 35 indivíduos de *Brachyplatystoma rousseauxii* amostrados em 10 cidades do Estado do Pará, Brasil.

Locos SSR	Nº de acesso Genbank	Motivo de repetição	Sequência do *primer* (5' - 3')	Ta (ºC)	N	*A*	Tamanho (pb)	PIC	D	*HO*	*HE*	*P*-HWE
BR1	GU945277	$(GT)_{16}$	F:[FAM]CAGCCATGAAAAGATACTGAAAG R:TACAAGTCCGAGTCCCAGTG	60	35	16[a]	254-292	0,900	0,988	0,743	0,921	0,000*
BR2	GU945274	$(GA)_{20}$	F:[HEX]GAGAAAGAGTGAGTGAGTGAGTGA R:AAATACCCTACCCAGACCCAC	63	35	8	148-163	0,675	0,894	0,714	0,728	0,616
BR3	GU945278	$(GA)_{10}$ CA $(GA)_5$	F:[FAM]CGCTGTCAGTCAGCAAGCTA R:CTTATCTGCGAGGGCAGCTT	62	35	4[a]	232-240	0,530	0,703	0,143	0,605	0,000*
BR5	GU945275	$(CT)_{17}$ TTCTCC ...$(CT)_{13}$ TT.... $(CT)_9$ ... $(CA)_{11}$	F:[HEX]GACGAGCTACCCAAAAACCA R:AGGAGCTGAAAGCACAGAGC	65	35	14[a]	323-349	0,907	0,987	0,543	0,927	0,000*
BR7	GU945279	$(TCCA)_5$ TCTA $(TCCA)_3$	F:[FAM]GCTCAGCGCTCACCAATTTA R:TGGATTGTTTGATTGCTTGA	60	35	4	106-126	0,366	0,640	0,423	0,405	0,796
BR24	GU945276	$(GT)_{15}$	F:[HEX]CAGCCCTTCTCTACACCGTTA R:GGCCGGAGTCTTACAGACAG	64	35	7[a]	262-276	0,674	0,861	0,371	0,729	0,000*

Ta= Temperatura de anelamento; N= número de indivíduos analisados; *A*= número de alelos; a= presença de alelo nulo; pb = pares de bases; PIC=Conteúdo de Polimorfismo Informativo; D= Poder descriminante; H_o= Heterosigozidade observada; H_e=Heterosigozidade esperada, *P*-HWE*= locos que não se mostraram em equilíbrio Hardy-Weinberg após correção de Bonferroni.

Tabela 2. Caracterização de 30 locos microssatélites polimórficos, desenvolvidos a partir da biblioteca genômica 02, em 33-35 indivíduos de *Brachyplatystoma rousseauxii* amostrados em 10 cidades do Estado do Pará, Brasil.

(continua)

Locos SSR	Nº de acesso Genbank	Motivo de repetição	Sequência do *primer* (5' - 3')	Ta (ºC)	N	*A*	Tamanho (pb)	PIC	D	H_O	H_E	*P*-HWE
BR37	GQ903732	$(TG)_{15}$	F: FAMCTGTGGCTGTGCGTAATGTT R:GCTGACAAACCATCAGGTGTAG	60	35	8	305-333	0,664	0,871	0,657	0,711	0,077
BR38	GQ903737	$(TC)_{33}$	F: FAMAGTTCCTTCTCGTTCCCCTTC R:ATCTCCCACTCTCTCTGGCTC	62	35	16	214-248	0,903	0,995	0,914	0,923	0,928
BR40	GQ903733	$(AC)_{13}$	F: FAMACTCAGGGGCACTAACATGG R:CTTTTGCTTTGACAGGCG	58	35	11	146-170	0,817	0,958	0,686	0,848	0,020
BR41	GQ903734	$(TG)_{12}$	F: FAMCCTCAAGAACAACTGAAGAAC R:GTGTGCTGAAAACCCTCA	58	35	5	216-224	0,293	0,524	0,286	0,353	0,052
BR43	GQ903735	$(AC)_{25}$	F: HEXCCCAGAAAAGAATCCAGCAG R:CGCCAAATGAACAACACC	62	35	8	164-180	0,742	0,933	0,686	0,788	0,206
BR44	GQ903736	$(AC)_{13}$	F: FAMGTTGTGGGGTAGAAAGAAGGC R:AGACGGGATCAGAGAGAGGAC	62	34	8	185-201	0,766	0,948	0,765	0,805	0,519
BR45	GQ903760	$(CT)_{15}$	F: FAMTCTGTGGAGATTGAAGCCTG R:GGTGCTGAAGATGGAGTGAAC	62	35	9	203-223	0,789	0,950	0,829	0,822	0,583
BR46	GQ903738	$(GT)_{11}$	F: HEXCCAAGAGCAAAGGCACTGA R:CGGCTGTCTGAGGGTATCAA	60	35	3	127-129	0,476	0,834	0,543	0,568	0,257
BR47	GQ903739	$(TG)_{11}$	F: HEXTCAGTGTGTGTGTGACTGTTG R:GCTCCTCTTGTTTCACTTTC	59	35	5	102-116	0,374	0,644	0,371	0,423	0,204
BR48	GQ903740	$(GACA)_4$	F: FAMTGCACACACACAGAGGCTAA R:CTTCACTTGTTGTCTCCTCGG	60	35	4	326-342	0,405	0,672	0,371	0,504	0,504
BR49	GQ903741	$(TC)_{17}$	F: HEXGAGTGGTTTGACTCTCCAGCA R:GGACTGCATAGGGTTGTTGTC	60	35	9	296-312	0,750	0,919	0,800	0,788	0,053
BR50	GQ903742	$(AC)_{21}$	F: HEXCACAAGAGCTGAAACCTGCC R:TATGCGCTAACCCAACCTGT	60	35	16	218-250	0,910	0,992	0,857	0,929	0,225
BR51	GQ903743	$(AC)_{18}$	F: HEXGTTACACATGGTCGCTGGTG R:GTTCATTCTCTTCGGCTTCG	60	34	8	263-285	0,627	0,854	0,618	0,651	0,485
BR52	GQ903744	$(GT)_{17}$	F: FAMTGCATAGGCTTGTGTGAACC R:GCACTGAGGAATCTGACCTTG	64	34	17[a]	310-354	0,899	0,985	0,735	0,919	0,001*
BR53	GQ903746	$(AC)_{15}$	F: FAMTTTATGAGTGTGTTATCCGGCA R:TGAGAGTGCTGTTCACTTCCA	60	34	8	160-162	0,766	0,931	0,853	0,806	0,321

Tabela 2. Caracterização de 30 locos microssatélites polimórficos, desenvolvidos a partir da biblioteca genômica 02, em 33-35 indivíduos de *Brachyplatystoma rousseauxii* amostrados em 10 cidades do Estado do Pará, Brasil.

Locos SSR	Nº de acesso Genbank	Motivo de repetição	Sequência do *primer* (5' - 3')	Ta (ºC)	N	*A*	Tamanho (pb)	PIC	D	*Ho*	*He*	*P*-HWE
BR54	GQ903731	$(CA)_{25}$	F:[HEX]AAACCAACCAACACACCCTC R:GTCTGGATGCCAAGTCGTTT	60	34	19	223-269	0,880	0,985	0,794	0,902	0,067
BR55	GQ903745	$(GT)_8$	F:[FAM]TGGGCAAGTATGTTCACTTCAC R:TCACATTCATTAGCTTTAGCCG	60	35	2[a]	185-189	0,373	0,679	0,286	0,504	0,016
BR56	GQ903747	$(CA)_{12}TA(CA)_4TA$ $(CA)_3C(CA)_5$	F:[HEX]GGCCTACCTCCATCGCAC R:AGGACACACACTGGGAGAGAA	60	35	5	140-150	0,227	0,479	0,229	0,239	0,261
BR57	GQ903748	$(GT)_{26}$	F:[HEX]CTAGAGCATCTGCGGGTAGTG R:GCTGTCTCATTTACATTC	58	34	22	217-261	0,899	0,988	0,882	0,918	0,162
BR61	GQ903749	$(TG)_{23}$	F:[FAM]CTGTCGAAAACATGAGGCAG R:GACATCAGAGCGAAGCACAC	65	35	13[a]	246-286	0,786	0,928	0,543	0,812	0,000*
BR63	GQ903750	$(AG)_{22}$	F:[FAM]CATTCAAGTCTGCTCACCCAC R:TGGAGTGCATAGGAAGAGAGG	65	35	11	219-249	0,844	0,946	0,743	0,871	0,000*
BR64	GQ903751	$(AC)_{11}$	F:[HEX]CAGGTGACAGGAAGCTACAGG R:GCATCAGCCGAGATCAGAAT	60	35	6	153-171	0,207	0,403	0,229	0,215	1,000
BR67	GQ903752	$(GT)_{18}$	F:[HEX]AAATGCTCTTAGTGATCCGAGG R:ATCAGACTCAAAGGTTTATGGG	60	34	13[a]	224-252	0,828	0,943	0,618	0,855	0,000*
BR68	GQ903753	$(GA)_5TTTA(GT)_{12}$	F:[HEX]GCCACAGAGAATGTCAGGC R:GGTGGAGATGATAAGGGGAGA	65	35	7	234-246	0,669	0,877	0,829	0,727	0,830
BR70	GQ903754	$(GA)_8 A(AG)_8$	F:[HEX]ACTGGGTCCGGTGTCATAAA R:AACGTGCAGTCATGGTGTAGC	60	35	8	191-209	0,647	0,884	0,743	0,697	0,938
BR72	GQ903755	$(AC)_8$	F:[HEX]AGTCCAGTCCTTTCAGCCAG R:GCACTGAGCATATCGTGGTT	64	33	8	240-256	0,684	0,896	0,697	0,733	0,159
BR73	GQ903756	$(CA)_{15}$	F:[FAM]GAGGGGAAATATGAACTGCG R:CAAGCGTATAGGTGGGGTTTG	60	35	11	103-125	0,868	0,973	0,857	0,892	0,173
BR74	GQ903757	$(AC)_6$	F:[FAM]GGACCCTCACATCCAGAC R:CAGTAAGGTGCAGTTATGCC	60	35	4[a]	126-140	0,390	0,529	0,143	0,364	0,000*
BR75	GQ903758	$(GT)_{18}$	F:[FAM]GACAGTGAGTTGGAGTCGATGA R:CAGGACTTTGGTGAAGGGAA	64	35	14	226-260	0,878	0,980	0,800	0,900	0,043
BR76	GQ903759	$(GT)_4AT(GT)_7$	F:[HEX]GGGAATGACAAAACCTCAAACT R:CCACTCTATCAGGCTATCAGTATTT	64	33	18	102-182	0,679	0,928	0,727	0,698	0,626

(conclusão)

Ta= Temperatura de anelamento; N= número de indivíduos analisados; *A*= número de alelos; a= presença de alelo nulo; pb = pares de bases; PIC=Conteúdo de Polimorfismo Informativo; D= Poder descriminante; H_o= Heterosigozidade observada; H_e=Heterosigozidade esperada, *P*-HWE*= locos que não se mostraram em equilíbrio Hardy-Weinberg após correção de Bonferroni.

Tabela 3. Amplificação interespecífica de 36 locos microssatélites desenvolvidos para a *Brachyplatystoma rousseauxii*.

Locos SSR	***B. tigrinum****		***B. juruense****		***B. vaillantii****		***B. platynemum****		***B. filamentosum****		***B. capapretum****	
	Tamanho (pb)	*A*	Tamanho (pb)	*A*	Tamanho (pb)	*A*	Tamanho (pb)	*A*	Tamanho (pb)	*A*	Tamanho (pb)	*A*
BR1	266-270	2	266-320	3	320	1	276-284	4	268-276	3	268	1
BR2	x	x	x		176-180	2	126-134	2	160-178	3	156-168	2
BR3	246-254	2	252-258	4	252-256	3	252-254	2	246-252	3	246	1
BR5	x		286	1	287	1	301	1	281-303	7	315-317	2
BR7	120-144	3	132	1	128-144	4	136-144	3	136-148	3	136-144	2
BR24	x		x		279	1	x		271-283	4	303	1
BR37	315-325	2	311-321	3	325	1	307-339	4	317-319	2	311-313	2
BR38	238-240	2	234-240	3	242-250	6	226-238	5	234-248	2	218-224	3
BR40	152-158	4	152-240	2	140-152	2	152-160	3	156-166	2	138-140	2
BR41	x		x		204-220	2	208-220	2	x		216	1
BR43	167-183	6	143	1	201-205	3	143	1	151-153	2	151-153	2
BR44	168	1	x		172-186	5	x		188-192	3	192-194	2
BR45	188-206	4	184-200	6	214-230	3	218-234	6	188	1	186	1
BR46	125	1	127-129	2	x		127-129	2	129	1	125	1
BR47	127-129	2	105-107	2	137-151	4	105-109	2	129-151	6	111-113	2
BR48	326	1	338	1	x		x		338	1	330	1
BR49	x		x		293-297	2	289-291	2	295-301	4	287	1
BR50	222-224	2	x		x		x		206-212	4	212-214	2
BR51	285-295	2	275-277	2	267-269	2	269-285	2	287-289	2	287-289	2
BR52	x		x		317-329	2	309-349	2	x		317	1
BR53	x		171-179	2	159-167	3	159-169	4	157-193	4	165-181	4
BR54	196	2	260	1	x		192-202	3	192-200	2	210-228	3
BR55	x		172-174	2	196-200	3	176-186	2	188	1	186-188	2
BR56	136	1	148-150	2	124-126	2	114-140	3	120-130	2	142-144	2
BR57	x		x		x		235	1	241-245	3	245	1
BR61	259-261	2	247-269	6	239-279	3	235-251	3	239-241	2	235-251	2
BR63	x		190	1	x		190	1	228-236	3	224	1
BR64	160	1	204-206	2	160-172	3	172-174	2	172-184	5	192-196	2
BR67	x		x		x		x		x		x	x
BR68	234-240	3	240-242	2	236-238	3	254-264	2	240-252	4	226-238	2
BR70	223	1	209	1	221	1	159-209	4	146	1	173	1
BR72	249	1	x		x		x		261-267	2	257-259	2
BR73	106-114	5	104-128	6	104-116	5	112-122	4	108-112	4	112-116	2
BR74	118	1	118-146	2	178	1	134-146	3	140-142	2	142	1
BR75	x		x		239-255	3	237	1	231	1	233-237	3
BR76	x		89-121	3	91	1	77-121	4	99-113	2	75-93	2

*= Temperatura de anelamento usada na PCR conforme descrito na Tabela 1 e 2; N=4 para todas as espécies; *A*= Número de alelos; x=não amplificou.

CAPÍTULO II : Estimativa da variabilidade genética populacional da dourada – *Brachyplatystoma rousseauxii* (Siluriformes: Pimelodidae) na Amazônia utilizando marcadores mitocondriais e microssatélites

1. INTRODUÇÃO

A dourada (*Brachyplatystoma rousseauxii*) (Siluriformes: Pimelodidae), também conhecida como dourado ou dourada (Brasil), dorado (Peru e Colômbia), zúngaro-dorado (Peru) e plateado (Colômbia), é um bagre (ou peixe) migrador de longa distância que possui como características morfológicas principais: grande porte (maior tamanho conhecido: 192 cm) cabeça prateada e achatada, corpo dourado e presença de barbilhões maxilares curtos (Eigenmann e Eigenmann, 1890; Barthem e Goulding, 1997; Barthem e Goulding, 2007). É diferente das outras espécies do gênero *Brachyplatystoma* não só pela cor, mas também por apresentar a maxila e mandíbula de iguais dimensões (Ferreira *et al.*, 1998; Ferreira e Grattapaglia, 1998).

De acordo com levantamentos socioeconômicos e estatísticos disponíveis, a dourada está sempre entre as espécies de peixe liso mais importante para a pesca comercial nos países onde ela ocorre, com milhares de famílias na região dependendo direta e/ou indiretamente da atividade pesqueira sobre estes bagres (Ruffino *et al.*, 2000; Petrere *et al.*, 2004; Barthem e Goulding, 2007; IBAMA, 2008). Estima-se que, pelo menos, cerca de 30.000 t de dourada é capturada e comercializada a cada ano na Amazônia (SANYO, 1998; Barthem e Goulding, 2007).

B. rousseauxii realiza grandes migrações a fim de completar o seu ciclo de vida. Essa migração é conhecida como a maior para peixes de água doce (Barthem e Goulding, 1997; SANYO, 1998; Barthem e Goulding, 2007). Os autores sugerem que essa espécie compõe um único estoque pesqueiro com áreas distintas de criação, alimentação e reprodução.

Dados genéticos obtidos para a dourada em três pontos da Amazônia (Belém/Estuário, Manaus e Tabatinga) corroboram partes desse modelo e apresentam novas informações que demonstram um ciclo de vida mais complexo do que o inicialmente proposto. A diminuição significativa da variabilidade genética entre Belém e Tabatinga é passível de ser explicada pela escolha não aleatória dos indivíduos de dourada pelo tributário onde a desova irá ocorrer. Em outras palavras, os cardumes de dourada na Amazônia, a exemplo do salmão na América do Norte, estariam, preferencialmente, voltando para desovar nos mesmos afluentes onde teriam nascido (*homing* ou filopatria) (Batista e Alves-Gomes, 2006).

Dada a distribuição geográfica, que abrange o território de mais de cinco países amazônicos, e a importância comercial, esta espécie é alvo da pesca e é capturada há décadas ao longo do sistema Estuário- Amazonas-Solimões (EAS), pela frota comercial e artesanal desde Belém, no estuário do rio Amazonas, até Pucallpa, no Peru, a aproximadamente 4500 km a Oeste, próximo ao sopé dos Andes peruanos. Estudos

recentes apontam que essa espécie se encontra em sobrepesca de crescimento (Alonso, 2002).

Diante deste cenário, torna-se necessário obter informações concretas a fim de balizar políticas de manejo que assegurem a sustentabilidade da atividade econômica e a conservação deste recurso. Embora seja destacada a grande importância de *B. rousseauxii* para a economia local como fonte direta de renda e de proteína, inclusive para as populações humanas mais carentes, e dos indícios de sobrepesca, não existem dados suficientes que nos permitam determinar o status dos estoques na região, incluindo os tributários do Amazonas/Solimões, ou ao menos se a pescaria, desde Belém até Pucallpa e afluentes, está sendo realizada sobre um ou vários estoques pesqueiros.

Entre as várias definições disponíveis referentes ao termo estoque, a definição desse termo a ser considerada no presente estudo é resultante de uma compilação de algumas definições disponíveis (Larkin, 1972; Jamielson, 1974; Shaklee e Salini, 1985; Sparre e Venema, 1995). Assim, estoque é "uma população intercruzante, geneticamente homogênea (*pool* de genes comum) cujos indivíduos possuem os mesmos parâmetros de crescimento e mortalidade, habitam uma área geográfica particular, é geneticamente distinguível de outros estoques contemporâneos e passível de ser manejado".

Dada à complexidade do ciclo de vida desse recurso pesqueiro, heterogeneidade geomorfológica e tamanho da área geográfica envolvida, métodos tradicionais de biologia pesqueira (morfológicos e merísticos) para identificação de estoques precisam ser complementados com outros métodos alternativos que perpassam a genética populacional desse recurso, considerando indivíduos amostrados tanto na calha como nos tributários onde eles ocorrem.

Embora o cenário geral proposto por Barthem e Goulding (1997), e posteriormente corroborado por Alonso (2002) e Batista e Alves-Gomes (2006), represente um avanço importantíssimo para o conhecimento da história natural da dourada, várias informações cruciais para o seu manejo e conservação ainda precisam ser levantadas ou melhor esclarecidas. Ainda é necessário saber se a espécie é realmente composta por um único estoque, largamente distribuído e geneticamente homogêneo, ou se existe algum tipo de segregação genética e/ou espacial (entre os tributários) e/ou temporal (entre coortes). Qual a importância relativa de cada tributário para a migração da dourada? Cada tributário contém populações monofiléticas, ou a escolha do tributário para a desova é feita ao acaso? Existem populações residentes na calha do Solimões-Amazonas? Quantas vezes cada indivíduo se reproduz durante a vida? Dependendo da resposta, unidades de conservação distintas podem ser definidas e políticas diferentes adotadas. Quanto a questões mais práticas, pode-se indagar: Quais as medidas cabíveis e necessárias para manter a

sustentabilidade da atividade econômica se somente um estoque existir? E quais as mais recomendadas se vários estoques estiverem sendo explotados?

Com a estimativa da variabilidade genética da dourada pela utilização de dois tipos de marcadores moleculares, a região controle (DNAmt) e microssatélites (DNA nuclear), este trabalho visa abordar algumas destas questões relacionadas ao ciclo de vida dessa espécie, a fim de gerar subsídios essenciais para conservação e manejo da dourada na Amazônia. Os marcadores utilizados têm sido extensamente utilizados como marcadores preferenciais em estudos ecológicos, filogenéticos, filogeográficos e de genética populacional de peixes (Goldstein e Schlotterer, 1999; Avise, 2004; Schlotterer, 2004) e este trabalho se fundamenta na maior base de dados montada até o momento para um peixe amazônico. Amostras de tecidos de dourada foram obtidas em quinze localidades na Amazônia, abrangendo uma grande parte da sua área geográfica, e de onde cerca de 700 indivíduos foram amostrados.

Neste contexto, o presente estudo tem dois objetivos principais: 1) estimar a variabilidade genética da dourada (*B. rousseauxii*) na Amazônia, e verificar se esta espécie constitui um único estoque, de larga distribuição e geneticamente homogêneo, ou se a pescaria é exercida sobre vários estoques, geneticamente diferenciáveis; e 2) testar a hipótese de filopatria (*homing*) para a dourada, inicialmente sugerida por Batista e Alves-Gomes (2006).

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Locais de coleta, obtenção e preservação do material biológico

Amostras de tecido muscular ou de nadadeira peitoral de 700 indivíduos de dourada (*B. rousseauxii*) foram coletadas entre 1999 e 2008 (excetuando os anos de 2001 e 2006) e preservadas em álcool etílico 98%, mediante licença de coleta e transporte de material biológico Nºs. 017, 130 e 14278-1 expedidas pelo IBAMA. Entre 40 a 54 indivíduos foram amostrados em 15 localidades da Amazônia brasileira e peruana (com exceção do rio Tapajós, N=5), junto à frota artesanal e desembarque pesqueiro em cidades situadas ao longo do eixo Estuário-Amazonas-Solimões (sete principais centros de pesca), e em oito localidades distribuídas em sete tributários, sendo quatro da margem direita e dois da margem esquerda do rio Solimões/Amazonas e um da margem esquerda do rio Negro (Figura 1 e Tabela 1). O cuidado na coleta das amostras dos tecidos junto à frota artesanal é importante porque estes barcos pequenos não têm muita autonomia e sempre pescam próximo (<70 km) aos locais de desembarque, garantindo que as amostras obtidas foram de indivíduos capturados nas proximidades dos respectivos locais de desembarque. A medida de comprimento furcal foi medida, sempre que possível, dos indivíduos amostrados e se encontram entre 24 a 180 cm. Registros fotográficos foram feitos para alguns indivíduos e armazenados como registros individuais.

A calha principal considerada nesse estudo reúne as localidades do Estuário (1), Santarém (2), Manaus (6), Tefé (9), Tabatinga (13), Iquitos (14) e Pucallpa (15).

O rio Tapajós e o rio Branco não tinham sido inclusos entre as localidades no plano inicial desse trabalho. Todavia, foram adicionadas as sequências de DNA de *B. rousseauxii* obtidas do rio Branco por Briglia-Ferreira (2007). Mesmo com a amostragem reduzida (N=5), o rio Tapajós foi incluso durante o desenvolvimento desse trabalho por razões que inclui o tipo da água e por conter uma ictiofauna peculiar. As duas localidades foram consideradas nas análises envolvendo a região controle (DNAmt).

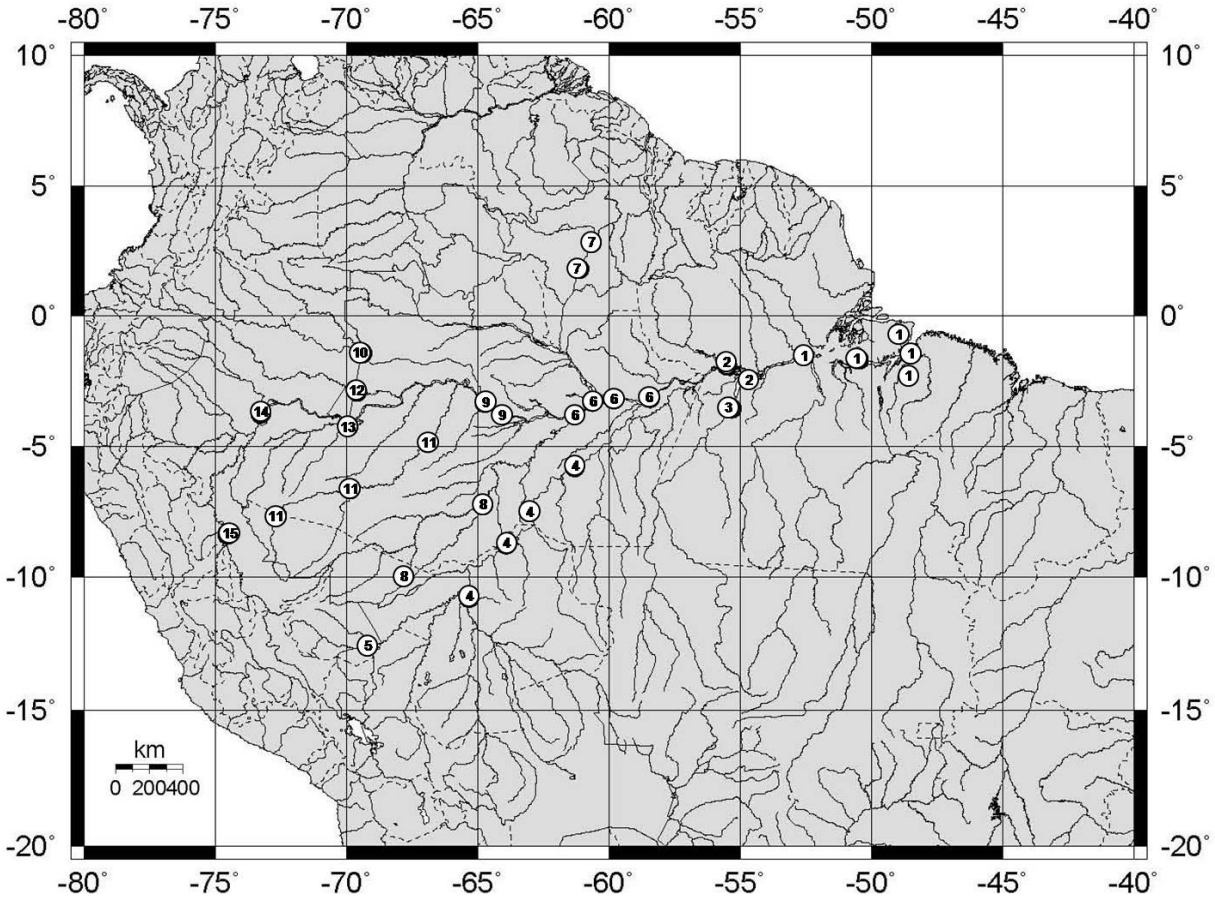

Figura 1. Localização dos pontos de coleta de amostras de tecido de indivíduos de *Brachyplatystoma rousseauxii.* Os mesmos números representam locais (Tabela 1), em que amostras foram coletadas e compiladas, representando uma determinada região/localidade.

Tabela 1. Regiões/localidades, rios, locais de coleta e número de indivíduos coletados de *Brachyplatystoma rousseauxii* na Amazônia brasileira e peruana.

Nº	Sigla	Região/ Localidade	Rio	Local de Pesca	NC	N RC	N SSR
1	ES	Estuário*	Amazonas	Belém (PA, Brasil)	14	14	10
				Almeirim (PA, Brasil)	25	24	20
				Soure (PA, Brasil)	17	16	16
				Gurupá (PA, Brasil)	4	4	4
				Breves (PA, Brasil)	2	2	2
				Total	**56**	**54**	**47**
2	SA	Santarém	Amazonas	Santarém (PA, Brasil)	39	38	31
				Óbidos (PA, Brasil)	2	2	1
				Total	**41**	**40**	**32**
3	TP	rio Tapajós	Tapajós	baixo rio Tapajós	**5**	**5**	**0**
4	MD	rio Madeira	Mamoré	Guajará Mirim (RO, Brasil)	5	5	0
			Madeira	Humaitá (AM, Brasil)	3	3	3
				Manicoré (AM, Brasil)	6	5	5
				Porto Velho (RO, Brasil)	46	41	32
				Total	**60**	**54**	**40**
5	PM	Porto Maldonado	Madre de Dios	Puerto Maldonado, Peru	**43**	**43**	**22**
6	MA	Manaus*	Solimões	Careiro da Várzea (AM, Brasil)	9	7	8
				Iranduba (AM, Brasil)	18	18	17
				Manacapuru (AM, Brasil)	9	8	7
				Itacoatiara (AM, Brasil)	11	10	6
				Total	**47**	**43**	**38**
7	RB	rio Branco**	Anauá	Caracaraí (RR, Brasil)	16	16	0
			Branco	Boa Vista (RR, Brasil)	38	38	0
				Total	**54**	**54**	**0**
8	PU	rio Purus	Purus	Lábrea (AM, Brasil)	41	41	35
			São Francisco	Rio Branco (AC, Brasil)	1	1	0
				Total	**42**	**42**	**35**
9	TE	Tefé	rio Japurá (baixo)	Alvarães (AM, Brasil)	2	1	1
			Solimões	Tefé (AM, Brasil)	50	44	41
				Total	**52**	**45**	**42**
10	JA	rio Japurá	Japurá	Japurá (AM, Brasil)	30	24	26
				Vila Bitencourt (AM)	17	17	17
				Total	**47**	**41**	**43**
11	JU	rio Juruá	Juruá	Carauari (AM, Brasil)	5	3	4
				Eirunepé (AM, Brasil)	27	27	8
				Cruzeiro do Sul (AC, Brasil)	12	10	06
				Total	**44**	**40**	**18**
12	IC	rio Içá	Içá	Ipiranga (AM, Brasil)	**48**	**43**	**36**
13	TA	Tabatinga*	Solimões	Tabatinga (AM, Brasil)	**60**	**54**	**45**
14	IQ	Iquitos	Amazonas	Iquitos (Peru)	44	43	35
				Nauta (Peru)	11	11	11
				Total	**55**	**54**	**46**
15	PC	Pucallpa	Ucayali	Pucallpa (Peru)	**46**	**40**	**39**
Total					**700**	**652**	**483**

Nº- número da localidade referenciado na Figura 1; NC – número total de indivíduos coletados; N RC – Número de indivíduos com a região controle (DNAmt) sequenciada; N SSR - Número de indivíduos genotipados para os marcadores microssatélites; * Amostras (N=15) geradas por Batista e Alves-Gomes (2006); ** Amostras (N=54) geradas por Briglia-Ferreira (2007).

2.2. Extração de DNA dos exemplares de *Brachyplatystoma rousseauxii*

O DNA total (nuclear + mitocondrial), utilizado para amplificar a região controle (DNAmt) e os locos microssatélites, foi extraído de cada amostra de nadadeira ou tecido muscular seguindo-se o protocolo básico de SDS - fenol/clorofórmio/álcool isoamílico, conforme descrito em (Sambrook *et al.*, 1989) e com as modificações implementadas por (Alves-Gomes, 1998). Análise quali-quantitativa do DNA extraído foi realizada por comparação com o DNA do fago lambda, ambos visualizados em gel de agarose a 1,0 % com brometo de etídio (0,1 mg/mL) e fotodocumentado em sistema de fotodocumentação *Eagle Eye* II (*Stratagene*).

2.3. Região Controle (DNAmt)

2.3.1. Amplificação e sequenciamento da Região controle (DNAmt) de *Brachyplatystoma rousseauxii*

A reação de amplificação (Mullis e Faloona, 1987) dos fragmentos de DNA mitocondrial foi realizado conforme descrito em Batista e Alves-Gomes (2006) com modificações. Nessa fase foram utilizados o primer *forward* CytbP-L (5´ CAC CTG AAT CGG AGG CAT GCC CGT 3´) e o *primer* reverso DLR1 (5` - GGA TAC TTG CAT GTA TAA ATT GG -3´) (dados não publicados) para obter um fragmento em torno de 1200 pb, contendo toda a região controle. A amplificação do fragmento foi realizada em 25 uL de volume final, com os seguintes reagentes e respectivas concentrações finais: Tampão 1X, 0,2 mM de DNTp (*GE healthcare*), 0,2 µM de cada *primer (IDT)*, 0,04 U/µL da enzima *Taq* DNA polimerase (*Biotools*) e de 0,4 a 4,0 ng/uL do DNA genômico. A reação foi realizada em termociclador (*Mastercycle thermocycler Eppendorf*), programado para realizar 30 ciclos. Foi utilizado o seguinte perfil de temperatura : um ciclo de desnaturação do DNA a 94 ºC por 2 min seguidos de 30 ciclos constituídos de um minuto a 94 ºC para desnaturação, um min a 57 ºC para anelamento e um min e meio a 72 ºC para extensão, e um ciclo com extensão final por 5 min a 72 ºC. O tamanho e a qualidade dos produtos amplificados foram verificados em géis de agarose a 1 % e com marcador molecular de tamanho (em pb) conhecido. O produto de PCR foi purificado com o kit comercial *GFX* (*GE Healthcare*) de acordo com protocolo estabelecido pelo fabricante e usados como substrato para o sequenciamento de DNA.

O sequenciamento nucleotídico (Sanger *et al.*, 1977) seguiu o protocolo acompanhante do kit de sequenciamento *DYEnamic ET dye terminator* para MEGABACE

1000 (*GE HealthCare*). Duas reações de sequenciamento foram realizadas com o produto de PCR purificado de cada indivíduo de *B. rousseauxii*, sendo cada uma no sentido 5'- 3' das fitas L e H. Uma utilizando o *primer foward* interno FTTP – L (5´ - CCA AGC GCC GGT CTT GTA A - 3´) (desenhados durante o presente estudo, dados não publicados) e a outra reação com o *primer* reverso F12-R (5'-GTC AGG ACC ATG CCT TTG TG -3'), (Sivasundar *et al.*, 2001). A reação foi realizada em um volume final de 10 uL, utilizando entre 100 a 150 ng do produto de PCR purificado, o pre-mix do kit de sequenciamento (4 uL) e um dos *primers* (F ou R). Após a reação em termociclador (em 30 ciclos, sendo cada um 95 ºC, por 15 s, 50 ºC por 30 s e 60 ºC por 1 min e 20 s) o produto da reação foi submetido a uma precipitação com acetato de amônio 7,5 M e Isopropanol para a eliminação dos *primers*, dNTPs e ddNTPs não incorporados durante a reação de sequenciamento. A eletroinjeção e leitura dos fragmentos foram realizadas em analisador automático de DNA MEGABACE 1000 (*GE – HealthCare*) nas condições de injeção e corrida recomendadas pelo fabricante. A sequência de DNA final foi obtida pela compilação das duas sequências obtidas com as fitas L e H.

2.3.2. Análise da diversidade molecular das sequências nucleotídicas da Região Controle do DNA mitocondrial *de Brachyplatystoma rousseauxii*

As sequências nucleotídicas foram conferidas, editadas e compiladas com auxílio dos programas CHROMAS 2.13 (Technelysium Pty Ltd) e BIOEDIT 7.0.5 (Hall, 1999) e alinhadas com o programa CLUSTAL W 1.4 (Thompson *et al.*, 1994) implementado no programa BIOEDIT 7.0.5 (Hall, 1999). A matriz final, com 911 pb (pares de bases) para cada um dos 652 indivíduos de *B. rousseauxii* (Tabela 1), foi construída e convertida para diferentes tipos de arquivos de entrada, para uso posterior em diferentes programas computacionais, com o auxílio do programa PGDSPIDER 1.0.1.5 (Anônimos, 2009). Foram computados os seguintes índices de diversidade molecular: número de haplótipos (H), número de haplótipos únicos (Hu, haplótipo que ocorre somente em um indivíduo), número total de mutações [(ETA, equação 10.3 – Nei (1987)], número de sítios polimórficos (S), diversidade haplotípica [(HD, probabilidade de cada duas sequências serem diferentes em uma população (equação 8.4 Nei,1987)], média das diferenças nucleotídicas par a par (K) e diversidade nucleotídica [(Pi, indica o número médio de diferenças nucleotídicas por sítio entre duas sequências de DNA (Li e Graur, 1991)]. Foi estimada a razão entre o número de haplótipos e o tamanho amostral (H/N) e o percentual dos haplótipos únicos para cada localidade [(Hu/H)*100]. Essas duas estimativas foram realizadas para melhor analisar a distribuição dos haplótipos em função do tamanho amostral e o percentual de haplótipos

únicos obtidos a partir do número de haplótipos encontrados para cada uma das 15 localidades amostradas, respectivamente.

Estimativas de expansão demográfica, como a representação gráfica da distribuição da freqüência das diferenças genéticas par a par *(mismatch distribution)* e o índice de *Raggedness* (Hri) (Slatkin e Hudson, 1991; Roger e Harpending, 1992), foram estimados com o auxílio dos programas ARLEQUIN 3.11 (Excoffier *et al.*, 2005) e DNASP 5.10 (Librado e Rozas, 2009). Diferentes tipos de história demográfica podem ser revelados a partir de diferentes padrões gráficos da distribuição *Mismatch.* Um padrão multimodal é característico de populações em equilíbrio demográfico longo e estável, enquanto que populações que experimentaram uma expansão populacional recente geralmente apresentam uma distribuição unimodal (Slatkin e Hudson, 1991; Roger e Harpending, 1992). Gargalos populacionais são representados por distribuições próximas a zero ou bimodais (dependendo se o gargalo apenas reduziu ou se removeu completamente a diversidade genética) (Frankham *et al.*, 2002). Enquanto que a distribuição *mismatch* descreve as diferenças par a par (em formas de curvas) entre os haplótipos os índices de *Raggedness* (Hri e r) estimam a variância da curva dessa distribuição (Harpending, 1994).

Os testes de neutralidade seletiva *D* de Tajima (Tajima, 1989) e *Fs* de Fu (Fu, 1997) foram realizados com o auxílio do programa ARLEQUIN 3.11 (Excoffier *et al.*, 2005). Com esses testes é possível averiguar se a amostragem total e de cada localidade estão em equilíbrio genético com relação ao DNA mitocondrial. Valores significativos para estes testes podem ser explicados se as sequências nucleotídicas da região controle do DNAmt não estiverem evoluindo de acordo com a hipótese de neutralidade seletiva ou se as populações foram anteriormente subdivididas e/ou experimentaram flutuações em seu tamanho populacional no passado (Hartl e Clark, 1997).

2.3.3. Estrutura populacional, correlação entre distância geográfica, fluxo gênico e distância genética

Para verificar a partição da variação molecular entre os grupos naturais de populações, a existência de populações geneticamente diferenciadas de *B. rousseauxii* entre os tributários e locais da calha amostrados, e avaliar o grau de significância da variabilidade genética entre e dentro das localidades, foi utilizada a análise de variância molecular (AMOVA) (Excoffier *et al.*, 1992), implementada no programa ARLEQUIN 3.11 (Excoffier *et al.*, 2005). Este modelo estatístico (AMOVA) baseia-se nas análises de diferentes níveis hierárquicos, onde a diversidade genética (Vt) é dividida em componentes variantes dentro das populações (Va) e entre as populações (Vb). A estimativa do índice de fixação Φ_{ST}, análogo ao F_{ST} (Weir e Cockerham, 1984) foi obtida pela razão entre os

componentes variantes. Como uma forma de verificar se as diferentes localidades estavam contribuindo de forma diferenciada para a variabilidade total observada, fez-se um exercício de se agrupar os locais de coleta de diferentes formas, testando-se a significância dos resultados sob cada combinação. Neste processo, 1) inicialmente as 15 localidades foram agrupadas e analisadas em um único nível hierárquico; 2) retirou-se os tributários e analizou-se um único grupo formado pelos sete locais da calha principal [Estuário (ES), Santarém (SA), Manaus (MA), Tefé (TE), Tabatinga (TA), Iquitos (IQ) e Pucallpa (PC)]. Nessa análise, buscou-se verificar a existência de alguma diferenciação entre essas localidades que pudessem explicar uma possível parcela da variabilidade genética, situada em alguns dos tributários localizados entre esses pontos; 3) Retirou-se da matriz de dados os indivíduos dos locais que apresentaram valores de probabilidade de F_{ST} entre 0,005 a 0,017 e que estivessem contribuindo para a diferenciação significativa encontrada na análise 1. A análise foi feita com amostras de 11 localidades: Estuário (ES), Santarém (AS), Manaus (MA), Tefé (TE), Tabatinga (TA), Iquitos (IQ), rio Içá (IÇ), rio Branco (RB), rio Purus (PU), rio Juruá (JU) e Pucallpa (PC); 4) Retirou-se as amostras da calha e de quatro tributários e as análises foram feitas em um grupo de localidades associadas a três tributários, sendo três na margem direita [rio Tapajós (TP), rio Madeira (MD) e Porto Maldonado (PM) e uma na margem esquerda (rio Japurá (JP)]; 5) Análise feita nos grupos 3 e 4 acima, conjuntamente, sendo o primeiro grupo formado por 11 localidades: [Estuário (ES), Santarém (AS), Manaus (MA), Tefé (TE), Tabatinga (TA), Iquitos (IQ), rio Içá (IÇ), rio Branco (RB), rio Purus (PU), rio Juruá (JU) e Pucallpa (PC)], e o segundo grupo formado por quatro localidades [rio Tapajós (TP), rio Madeira (MD), Porto Maldonado (PM) e rio Japurá (JA)]; e 6) Um grupo formado por três localidades da calha principal: Estuário (ES), Manaus (MA) e tabatinga (TA). Esta última análise especificamente buscou verificar se o nível de diferenciação genética entre o Estuário, Manaus e Tabatinga, encontrado por Batista (2001) e Batista e Alves-Gomes (2006), se mantém com um maior número de amostras.

As análises desses vários agrupamentos foram realizadas a fim de verificar se há algum nível de diferenciação genética significativa, e a quais locais essa diferenciação está associada, em uma escala geral da AMOVA global.

Uma matriz de distância genética, baseada nos valores de comparação par-a-par de F_{ST} (Wright, 1969) foi construída entre as 15 localidades amostradas. O nível de significância da associação entre essa distância genética e a distância geográfica foi estimado com o teste de Mantel (Mantel, 1967) implementado no programa ARLEQUIN 3.11 (Excoffier *et al.*, 2005). A matriz de distância geográfica entre os pontos de coleta foi estimada seguindo o curso do rio com o auxílio do programa *GOOGLE EARTH* 4.3.7.3 beta 2008 (*Google*). A AMOVA e o teste de Mantel foram simulados com 10.000 permutações. A correção de Bonferroni (Rice, 1989) foi aplicada para a correção do valor da probabilidade (P*)* nos testes

de comparação múltipla, a fim de evitar o erro do tipo I (de rejeitar a hipótese nula, sendo verdadeira). O valor de P, com a referida correção, foi estimado a partir da razão entre o valor de P=0,05 e o número de combinações.

Estimativas de fluxo gênico (taxas de migração), no que se refere ao número de migrantes por geração (*Nm*), foi estimada entre as localidades de forma linear, a partir dos valores de F_{ST}, com o auxílio do programa ARLEQUIN 3.11 (Excoffier *et al.*, 2005), onde onde *Nm*= $Y=(1- F_{ST})/(2 F_{ST})$.

O modelo de evolução molecular Hasegawa-Kishino-Yano (HKY 85) (Hasegawa *et al.*, 1985) foi obtido com o auxílio do programa MODELTEST 3.7 (Posada e Crandall, 1998) como o melhor modelo para o banco de dados de sequência nucleotidica da região controle (DNAmt) obtida para os 652 indivíduos de dourada. Os parâmetros definidos a partir da matriz de dados para este modelo foram: proporção de sítios invariáveis (I= 0,7905), freqüência empírica das bases nucleotídicas, razão transição/transversão e parâmetro *gamma* (G=0,7463). A distância genética de *B. rousseauxii,* entre e dentro das localidades, foi estimada e corrigida para substituições múltiplas com o referido modelo de evolução molecular, com o auxílio do programa PAUP 4.0 para Macintosh (Swofford, 2003).

2.3.4. Análise de simulação do comportamento filopátrico (*homing*)

O comportamento filopátrico foi testado a partir de uma análise de simulação considerando como premissa que, caso haja filopatria, indivíduos de dourada de uma determinada área de reprodução (tributários) sejam geneticamente mais relacionados entre si de que com indivíduos de outra área reprodutiva. Assim sendo, a divergência genética deve ser menor do que a esperada por mero acaso, se os indivíduos estiverem aleatoriamente adentrando aos diferentes tributários.

A partir da distância genética, corrigida com o modelo HKY 85 (Hasegawa *et al.*, 1985), foram estimadas as distâncias média e máxima iniciais entre os indivíduos dentro de cada localidade. A distância média foi estimada para verificar se esse comportamento é recente (ainda que fraco e quando os rios não são monofiléticos) e é a distância máxima para verificar se o *homing* é existente a longo prazo (sendo forte, quando os rios já são monofiléticos). Após serem realizadas 1000 re-amostragens (simulações) com o auxílio do programa R 2.9.0 (http://www.r-project.org/), foram novamente estimadas as duas distâncias (média e máxima) considerando também esses valores ao nível de 95% e com correção de Bonferroni. Se o comportamento filopátrico existe, espera-se de um modo geral, que as localidades (especialmente os tributários) não tenham uma amostragem aleatória e que os valores das distâncias genéticas de cada localidade sejam menores do que o calculado

após a simulação. Tendência ao comportamento filopátrico foi testada a partir do teste-t pareado no mesmo programa computacional (P<0,05).

2.3.5. Análise de estoque relacionado (*Mixstock analyses*)

A análise de estoque relacionado (*Mixstock analyses*) foi realizada para estimar se as localidades, e quais delas, estão contribuindo para a área de criação, bem como a relativa contribuição proporcional de cada localidade. Estuário e Santarém foram consideradas na análise como área de criação. Santarém foi incluída ao considerar que os indivíduos presentes nessa região ainda não ingressaram em áreas reprodutivas (tributários). A análise foi realizada com o auxílio do programa MIXSTOCK PACKAGE do pacote computacional R (Bolker, 2009), utilizando a matriz de distribuição dos 301 haplótipos de *B. rousseauxii* encontrados em 14 localidades. A localidade do rio Tapajós não foi incluída em razão do baixo número de indivíduos. A análise utiliza o algoritmo da cadeia de Markov Monte Carlo (MCMC), juntamente com uma abordagem hierárquica bayesiana (do tipo *many to many*) (Bolker *et al.*, 2007).

2.4. Marcadores Moleculares Microssatélites

2.4.1. Amplificação e genotipagem das amostras de DNA de *Brachyplatystoma rousseauxii*

Foram incialmente selecionados 14 locos microssatélites entre os 36 locos isolados e caracterizados para *B. rousseauxii* [Capítulo I Tabela 1 e 2; (Batista *et al.*, 2009)]. O padrão eletroforético dos alelos, a sugestão de ocorrência de alelos nulos nos indivíduos da população na qual foram caracterizados (Belém/estuário) e o tempo disponível para a conclusão do presente estudo incluíram os critérios de seleção para o número de locos utilizados nas análises de genética populacional. Desta forma, foram utilizados oito locos microssatélites no estudo de *B. rousseauxii* amostrada em 13 localidades. A Tabela 2 sumariza as principais características desses locos.

Foi adicionada uma cauda M13 na extremidade 5´ de cada *primer forward* dos oito locos microssatélites (Tabela 2) no intuito de permitir a marcação por fluorescência de acordo com o protocolo econômico descrito por Schuelke (2000).

Tabela 2. Locos microssatélites utilizados nas analises populacionais de *Brachyplatystoma rousseauxii* amostrada em 13 localidades da Amazônia brasileira e peruana.

Locos SSR	Motivo de repetição	Sequência do *primer* (5' - 3')	Ta (ºC)	Tamanho (pb)	Referência
BR7	$(TCCA)_5$ TCTA $(TCCA)_3$	F:^{FAM}GCTCAGCGCTCACCAATTTA R:TGGATTGTTTGATTGCTTGA	60	106-126	Capitulo I, Tabela 1
BR37	$(TG)_{15}$	F: ^{FAM}CTGTGGCTGTGCGTAATGTT R:GCTGACAAACCATCAGGTGTAG	60	305-333	Capitulo I, Tabela 2 Batista *et al.*, 2009
BR41	$(TG)_{12}$	F: ^{FAM}CCTCAAGAACAACTGAAGAAC R:GTGTGCTGAAAACCCTCA	58	216-224	
BR45	$(CT)_{15}$	F: ^{FAM}TCTGTGGAGATTGAAGCCTG R:GGTGCTGAAGATGGAGTGAAC	62	203-223	
BR46	$(GT)_{11}$	F: ^{HEX}CCAAGAGCAAAGGCACTGA R:CGGCTGTCTGAGGGTATCAA	60	127-129	
BR47	$(TG)_{11}$	F: ^{HEX}TCAGTGTGTGTGTGACTGTTG R:GCTCCTCTTGTTTCACTTTC	59	102-116	
BR49	$(TC)_{17}$	F: ^{HEX}GAGTGGTTTGACTCTCCAGCA R:GGACTGCATAGGGTTGTTGTC	60	296-312	
BR51	$(AC)_{18}$	F: ^{HEX}GTTACACATGGTCGCTGGTG R:GTTCATTCTCTTCGGCTTCG	60	263-285	

Ta - Temperatura de anelamento; pb – estimativa da variação do tamanho dos alelos; FAM e HEX – fluorescência utilizada em cada loco microssatélite.

Os fragmentos contendo microssatélites foram amplificados conforme descrito em (Batista *et al.*, 2009). Cada reação foi feita em um volume final de 10 µL contendo: 10-50 ng de DNA genômico, 0,4 µM de cada *primer forward* e do *primer* M13 marcado (com a fluorescência FAM ou HEX, dependendo do loco), 0,8 µM do *primer* reverso, 200 µM de cada dNTP (GE *Healthcare*), 1,5 $MgCl_2$, 1X de tampão (10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, pH 8.4) e 0,5 U de *goTaq* DNA polimerase (*Promega*). O PCR foi conduzido utilizando dois programas: o primeiro consistindo na desnaturação do DNA (68 °C, 1 min; 94 °C, 30 s) seguida de 30 ciclos de 30 s a 92 ºC, 35 s na temperatura de anelamento específica de cada par de *primer* (Tabela 2), e 40 s a 68 ºC; o segundo programa consistiu em 15 ciclos com as seguintes condições de temperatura e tempo: 25 s a 92 °C, 35 s a 53 °C, 30 s a 72 °C e uma extensão final a 68 °C for 15 min e a 72 °C 15 min. O produto de PCR foi verificado em eletroforese em gel de agarose 2%, corado com brometo de etídio (0,1 mg/mL) e fotodocumentado em sistema *Eagle Eye* II (*Stratagene*). Os produtos de PCR foram diluídos (1:3) e 1 uL dessa diluição, juntamente com 9,0 uL da solução contendo *Tween* 20 0,1% e 0,25 uL do padrão de tamanho de alelos (ET Rox 400 ou ET 500R), foi eletroinjetado em MegaBACE1000 (GE *Healthcare*).

Dois sistemas multiplex (1 e 2, Tabela 3) foram desenvolvidos para a genotipagem das amostras de DNA a partir da combinação de duas fluorescências (FAM ou HEX) e do tamanho dos alelos de cada loco. Esses sistemas permitiram que em cada poço (de uma

placa com 96 amostras de DNA) fossem genotipados e analisados, simultaneamente, quatro locos, em cada sistema, para a mesma amostra de DNA.

Tabela 3. Sistemas Multiplex utilizado para a genotipagem dos indivíduos de *Brachyplatystoma rousseauxii* amostrados nas 13 localidades da Amazônia, desenvolvidos a partir da combinação do tamanho dos alelos (pb) e das fluorescências FAM e HEX.

Multiplex	**Locos**	**Tamanho (pb)**	**Fluorêscencia**
1	BR45	222 - 242	FAM
	BR37	323 - 353	FAM
	BR47	129 - 135	HEX
	BR51	287- 303	HEX
2	BR7	106 -126	FAM
	BR41	237- 243	FAM
	BR46	145 - 149	HEX
	BR49	311- 329	HEX

pb = variação do tamanho dos alelos em pares de bases.

2.4.2. Estimativa do tamanho dos alelos, tratamento e montagem do banco de dados de genotipagem

O tamanho dos alelos (em pb) foi estimado e editado com o auxílio do programa FRAGMENT PROFILER 1.2 (GE *Healthcare*) usando o padrão de genotipagem ET-400 ROX (GE *Healthcare*). A partir da matriz de dados final, contendo o genótipo de todos os indivíduos amostrados nas 13 localidades, Indivíduos idênticos e diferenças de tamanhos entre os alelos em cada genótipo foram checados com o auxilio do programa MSTOOLS (Park, 2001). Foram excluídos 18 pb do tamanho de cada alelo (correspondente ao tamanho do *primer*/cauda de M13 fluorescente usado na PCR) conforme sugerido por Schuelke (2000). A ocorrência de artefatos técnicos como alelos nulos, *stutters* ("picos/bandas de gaguejos") e *large dropout* nos alelos foram checados com o auxílio do programa MICRO-CHECKER 2.2.3 (Van Oosterhout *et al.*, 2004) em cada população e em cada loco. Os programas COVERT 1.31 (Glaubitz, 2004), FORMATOMATIC 0.8.1 (Manoukis, 2007) e PGDSPIDER 1.0.1.5 (Anônimos, 2009) foram utilizados na geração e conversão dos diferentes arquivos de entrada, utilizados nos diferentes programas e análises descritas a seguir.

2.4.3. Análises estatísticas de genética intrapopulacional

Foram calculados o número de alelos (*A*), a heterozigosidade observada (H_o) e esperada (H_e), o coeficiente de endogamia (F_{IS}) (probabilidade de dois alelos serem diferentes por descendência em um indivíduo) para cada loco em cada localidade, com o programa ARLEQUIN 3.11 (Excoffier *et al.*, 2005). O número de alelos exclusivos (presente em apenas um local) em cada localidade e o Conteúdo de Polimorfismo Informativo (PIC) (Botstein *et al.*, 1980) para cada loco foi estimado com o programa GENALEX 6.2 (Peakall e Smouse, 2006). A riqueza alélica (A_R), o número total de alelos (A_T), a média da diversidade gênica e das diferenças par a par e o teste de desvio do Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) (100000 interações) foram calculados entre os indivíduos de *B. rousseauxii* de cada localidade, com o programa ARLEQUIN 3.11 (Excoffier *et al.*, 2005). O desequilíbrio de ligação (DL) foi calculado com o auxílio do programa FSTAT 2.9.3.2 (Goudet, 2001). Os níveis de significância estatísticos foram ajustados através da correção seqüencial de Bonferroni para os testes de EHW e DL (Rice, 1989).

A homogeneidade nos valores de heterozigosidade observada (H_O) estimada, para as 13 localidades com os oito locos, foi verificada por intermédio de uma Análise de Variância (ANOVA) realizada com o auxílio do programa PAST 1.82b (Hammer *et al.*, 2001).

2.4.4. Estrutura populacional, correlação entre distância geográfica, fluxo gênico e distância genética

A fim de verificar a existência de estrutura genética entre as localidades amostradas foi obtida uma matriz com os valores de F_{ST} (Wright, 1951) par a par (entre cada duas localidades) com o auxílio do programa GENEPOP 4.0 (Raymond e Rousset, 1995).

A análise de variância molecular (AMOVA) (Michalakis e Excoffier, 1996) foi realizada para verificar o grau de diferenciação genética entre as localidades amostradas a partir de distância genética euclideana estimada a partir dos valores de $F_{ST.}$ que assume o modelo de alelos infinitos (IAM). Esse modelo, ao invés do modelo de mutação gradual em passos (*Stepwise Mutation Model*, SMM) R_{ST}, (Slatkin, 1995), é preferencialmente utilizado na AMOVA quando menos de que 20 locos são analisados (Gaggiotti *et al.*, 1999). A significância estatística das análises foi testada, utilizando intervalos de confiança de 95% e 10000 replicações, e os valores de probabilidade, estimados entre cada duas localidades, ajustados com a correção de Bonferroni (P = 0,05/número de combinações) (Rice, 1989).

A correlação entre a distância genética, inferida a partir da distancia euclidiana (baseada nos valores de F_{ST}) e a distância geográfica foi verificada a partir do teste de

Mantel (Mantel, 1967) com 10000 permutações. A AMOVA e o teste de Mantel foram realizados com o auxílio do programa ARLEQUIN 3.11 (Excoffier *et al.*, 2005).

O número de possíveis populações (K) geneticamente homogêneas (estoques genéticos diferentes) foi estimado a partir de uma análise bayesiana implementada no programa STRUCTURE 2.3.1 (Pritchard *et al.*, 2000). Esse programa atribui indivíduos a um número K de populações assumindo equilíbrio de Hardy Weinberg e ausência de desequilíbrio de Ligação entre os locos analisados dentro de cada população. Foi usado o modelo de mistura (*admixture model*), que assume que cada indivíduo pode ter ancestrais oriundos de mais de uma população, e freqüência alélicas correlacionadas, favorecendo a melhor identificação de populações sub-estruturadas (Falush *et al.*, 2003). Foram realizadas 10 corridas (réplicas) independentes para cada valor de K variando entre um a 13 com valores de corte (*burnin*) de 100.000 permutações e 1.000.000 simulações em cadeias de Monte Carlo (MCMC). O número de populações esperado é o valor de K máximo estimado pelo modelo *log-likelihood* (log (P(X/K)) (Falush *et al.*, 2003) e pelo método proposto por Evanno *et al.* (2005) realizado com com o auxílio da programa STRUCTURE HARVESTER 0.56.3 (Earl, 2009) disponível no sítio http://taylor0.biology.ucla.edu/struct_harvest/. Foi analisada também a proporção média de atribuição (Q) das localidades dentro de cada *cluster* (K) inferido pelo programa. A análise envolvendo o programa STRUCTURE foi realizada utilizando os recursos do sítio BioHPC na internet da unidade de serviço de biologia computacional da Universidade de Cornell (http://cbsuapps.tc.cornell.edu/index.aspx).

As taxas de migração (fluxo gênico) foram estimadas de forma linear a partir dos valores de F_{ST}, em número de migrantes por geração (*Nm*) onde *Nm*= $Y=(1- F_{ST})/(2F_{ST})$, com o auxílio do programa ARLEQUIN 3.11 (Excoffier *et al.*, 2005).

2.4.5. Análise de simulação do comportamento filopátrico (*homing*)

O comportamento filopátrico (*homing*) foi testado utilizando os oito locos microssatélites considerando a mesma premissa descrita para o marcador de sequência nucleotídica (região controle). Sendo assim, o *homing* existe se indivíduos de dourada de uma determinada área de reprodução (tributários) forem geneticamente mais relacionados entre si de que com indivíduos de outra área (s) reprodutiva (s). Nesse caso a divergência genética deve ser menor do que a esperada por mero acaso, se os indivíduos estiverem aleatoriamente adentrando aos diferentes tributários do Solimões/Amazonas.

Foi calculado F_{IS}, R_{IS} e Δ_{μ} (equivalente a variação de tamanho dos alelos em pb) para cada uma das 13 localidades e realizada 10000 re-amostragens sem substituição, no intuito de gerar 13 novas populações com o mesmo tamanho da população original, para as quais

foram novamente calculados os mesmos parâmetros inicias (F_{IS}, R_{IS} e Δ_{μ}). Valores médios desses parâmetros foram calculados e sua significância corrigida por Bonferroni (Rice, 1989). A tendência desses valores serem menor foi testada com o teste t pareado ($P<0,05$). Em filopatria, espera-se de um modo geral, que as localidades (especialmente dos tributários) não tenham uma amostragem aleatória e que os valores de F_{IS}, R_{IS} e Δ_{μ} dessas localidades sejam menores, após a simulação das 1000 re-amostragens, comparado com o calculado inicialmente. Por estarem localizadas no mesmo tributário, as localidades do rio Madeira e Porto Maldonado foram consideradas como um único local. Essa análise foi realizada com o auxílio do programa R 2.9.0 (http://www.r-project.org/).

2.4.6. Análise de estoque relacionado (*Mixstock analyses*)

A análise de estoque relacionado (*Mixstock analyses*) também foi realizada com os dados de microssatélites, envolvendo os genótipos encontrados entre os 483 indivíduos, com os mesmos propósitos descritos na mesma análise utilizando a região controle no item 2.3.4. Na análise, foi utilizado o algoritmo da cadeia de Markov Monte Carlo (MCMC), juntamente com uma abordagem hierárquica bayesiana (do tipo *many to many*) (Bolker *et al.*, 2007) e realizada com o auxílio do programa MIXSTOCK PACKAGE do programa R (Bolker, 2009).

3. RESULTADOS

3.1. Região controle do DNA mitocondrial

3.1.1. Análise geral da diversidade molecular em *Brachyplatystoma rousseauxii*

A região controle dos 652 indivíduos de *B. rousseauxii* totalizou 911 bp, sendo que não foi necessário introduzir nenhum evento de inserção ou deleção (*indels*) na matriz de dados para o alinhamento das sequências de DNA. Foram observados 301 haplótipos (H) (2,17 indivíduos/H) (alinhamento no APÊNDICE B) e 240 haplótipos únicos (Hu) entre os 652 indivíduos de dourada amostrados. Foram obtidos 777 sítios constantes, 134 sítios polimórficos (S), 96 sítios informativos e um número total de 150 mutações (ETA) (1,12 mutação/sítio polimórfico) sendo 127 transições e 23 transversões.

A diversidade haplotípica (HD) média foi igual a 0,979 ± 0,002, diversidade nucleotídica (Pi) de 0,0089 ± 0,005 e a distância média nucleotídica par a par (K) igual a 8,079 ± 3,760. A média da composição de bases nucleotídicas foi calculada e corrigida com o modelo de evolução HKY+I+G (Hasegawa *et al.*, 1985), indicado pelo programa MODELTEST 3.7 (Posada e Crandall, 1998). Foi estimada a proporção de 31,53% para Adenina, 20,33% para Citosina, 15,29% para Guanina e 32,84% para Timina e a taxa de transição/transversão (ts/tv) foi de 11,93.

Considerando-se o pequeno tamanho amostral do rio Tapajós (n=5), a menos que seja explicitamente indicado, esta localidade foi excluída da maioria dos relatos dos resultados a seguir.

3.1.2. Análise e distribuição de haplótipos de *Brachyplatystoma rousseauxii*

Foram encontrados 301 haplótipos entre os 652 indivíduos analisados. Dentre estes, foram observados 240 haplótipos únicos e 53 haplótipos (entre os 61 com freqüência igual ou maior de que 2) compartilhados em mais de que duas localidades. A freqüência absoluta dos 301 haplótipos variou entre um (nos 240 haplótipos únicos) a 60 (H24). O haplótipo mais freqüente (H24) foi compartilhado entre a maioria das localidades, exceto rio Tapajós e Porto Maldonado. Em Manaus e Pucallpa esse haplótipo ocorreu em maior freqüência (N=8 nas duas localidades) e em menor freqüência em Santarém e no rio Içá (N=1). O segundo haplótipo mais freqüente (H27, N= 41) foi encontrado em 11 das 15 localidades amostradas, não sendo encontrado em Pucallpa e nos rios Tapajós, Juruá e Japurá. A maior freqüência desse haplótipo ocorreu em Tabatinga (N=9) e a menor em Porto Maldonado (N=1). O estuário é a localidade que congrega o maior número de haplótipos compartilhados (20 dos 53 haplótipos) em relação às demais localidades (APÊNDICE C).

O percentual dos haplótipos compartilhados de *B. rousseauxii* entre as 15 localidades variou entre 4,11% (entre os rios Japurá e Juruá) a 15,79% (Entre o Manaus e Pucallpa) (Tabela 4). Os tributários da margem direita (rios Branco, Içá e Japurá) apresentaram os menores valores percentuais de compartilhamento. De uma forma geral, essa distribuição é relativamente homogênea na bacia Amazônica.

Haplótipos únicos (Hu) foram encontrados em 14 das 15 localidades amostradas. O rio Juruá e Porto Maldonado apresentaram os menores valores (Hu=11) e o rio Branco os maiores (Hu=27). Não foi encontrado nenhum haplótipo único no rio Tapajós, provavelmente em função do tamanho amostral reduzido (N=5) (Tabela 5). O maior percentual de haplótipos únicos (55,83%) foi observado nos tributários (N = 322) enquanto as localidades situadas na calha (eixo EAS) reuniram 44,17% (N=330). O percentual dos haplótipos únicos encontrados em cada local da calha variou entre 8,33% no estuário e 5% em Pucallpa. Entre os tributários, os da margem esquerda (rios Branco, Japurá e Içá) reuniram o maior percentual (31,25%), encontrados em 138 indivíduos, enquanto que os tributários da margem direita (Porto Maldonado com rio Madeira e rios Purus e Juruá) os menores 24,58% em 184 exemplares amostrados (Tabela 5 e APENDICE C).

Tabela 4. Percentual (%) de haplótipos da região controle (DNAmt) de *Brachyplatystoma rousseauxii* compartilhados entre as 15 localidades amostradas e distribuídas na Amazônia brasileira e peruana. Em destaque, os menores e maiores valores de compartilhamento encontrados.

	Localidades													
	ES	**SA**	**TP**	**MD**	**PM**	**MA**	**RB**	**PU**	**TE**	**JA**	**JU**	**IC**	**TA**	**IQ**
AS	12,86													
TP	2,22	3,03												
MD	12,35	10,14	2,27											
PM	7,69	11,32	0,00	10,94										
MA	12,86	12,07	0,00	11,59	9,43									
RB	8,54	11,43	4,44	6,17	7,69	10,00								
PU	14,08	13,56	2,94	10,00	9,26	13,56	11,27							
TE	12,16	12,90	2,70	8,22	8,77	11,29	10,81	11,11						
JA	7,79	9,23	2,50	5,26	6,67	6,15	7,79	10,61	10,14					
JU	11,11	11,67	2,86	8,45	5,45	8,33	8,33	9,84	9,38	4,48				
IÇ	10,26	10,61	4,88	6,49	4,92	9,09	6,41	7,46	11,43	**4,11**	7,35			
TA	13,33	14,29	2,63	9,46	12,07	12,70	9,33	12,50	8,96	7,14	10,77	9,86		
IQ	14,29	13,85	2,50	11,84	8,33	13,85	9,09	12,12	10,14	5,56	11,94	10,96	14,29	
PC	14,49	12,28	0,00	5,88	7,69	**15,79**	8,70	8,62	8,20	6,25	8,47	6,15	8,06	7,81

ES - Estuário, SA - Santarém, TP - rio Tapajós, MD - rio Madeira, PM - Porto Maldonado; MA: Manaus, RB – rio Branco, PU – rio Purus, TE – Tefé, JÁ – rio Japurá, JU - rio Juruá, IC – rio Içá, TA – Tabatinga e IQ – Iquitos.

3.1.3. Análise da diversidade genética de *Brachyplatystoma rousseauxii*

Entre as localidades da calha principal, a dourada amostrada no estuário apresentou as maiores estimativas para todos os índices de diversidade molecular, com exceção do percentual de haplótipos únicos compartilhados, enquanto a de Iquitos apresentou as menores estimativas de K (7,272 ± 3,459) e Pi (0,0080 ± 0,004). Entre as 15 localidades, foi observado no estuário o maior número de sítios polimórficos (S=59), número total de mutações (ETA=61) e número de mutações restritas (M_R=9). A maior razão entre o número de haplótipos e o tamanho amostral foi observado nos rios Japurá e Içá (H/N=0,9) e a menor em Porto Maldonado e Tabatinga (H/N=0,6). No rio Japurá também foi observado o maior percentual de haplótipos únicos em relação ao número de haplótipos (%Hu=69,4) e no rio Juruá o menor (%Hu=35,5) (Tabela 5).

B. rousseauxii do rio Purus e de Porto Maldonado, apresentaram o menor número total de mutações (ETA=43). Níveis altos e relativamente homogêneos de diversidade haplotípica (HD), (acima de 0,945) foram obtidos para a dourada nas diferentes localidades amostradas, sendo que a maior diversidade haplotípica (HD=0,990 ± 0,009) foi obtida no rio Içá (margem esquerda), onde também foram encontrados os maiores níveis da média das diferenças par a par (K= 9,210 ± 4,318) e de diversidade nucleotídica (Pi=0,0101 ± 0,005).

A menor diversidade haplotípica foi observada em Manaus (HD=0,945 ± 0,024) e o rio Branco (também margem esquerda) apresentou a menor média das diferenças par a par (K= 7,176 ± 3,417) e os menores níveis de diversidade nucleotídica (Pi = 0,0079 ± 0,004) (Tabela 5).

3.1.1. Análise da distribuição da diversidade genética *(*AMOVA) em *Brachyplatystoma rousseauxii*

A análise de variância molecular (AMOVA) foi realizada para verificar como a diversidade genética está distribuída a partir da estimativa da variação genética dentro e entre as localidades. Em um primeiro momento (análise 1, Tabela 6) foi realizada a análise entre as 15 localidades, em um único grupo hierárquico, no intuito de verificar os níveis de diferenciação genética entre todos os locais amostrados. Considerando-se que valores de F_{ST} (análogo ao ϕ_{ST}) para diferenciação genética entre as populações (chamadas de localidades nesse estudo) entre 0,00 e 0,05 indicam baixa diferenciação genética, valores entre 0,05 e 0,15 indicam diferenciação intermediária, valores entre 0,15 a 0,20 indicam alta diferenciação genética e valores acima de 0,25 indicam forte diferenciação (Wright, 1978), foi observada uma baixa diferenciação genética (ϕ_{ST} = 0,011; P=0,001) nesse nível hierárquico, sendo que 1,06% da variabilidade genética foi encontrada entre as localidades.

Tabela 5. Parâmetros de diversidade genética da *Brachyplatystoma rousseauxii*, amostrada em 15 localidades da Amazônia, a partir da análise da região controle (DNAmt). N: número de indivíduos seqüenciados; H: número de haplótipos; Hu: número de haplótipos únicos; H/N: razão entre o número de haplótipos e o número de indivíduos; %Hu: percentual do número de haplótipos únicos em relação ao número de haplótipos; S: número de sítios polimórficos; ETA: número total de mutações; MR: mutações restritas; HD: diversidade haplotípica K: média das diferenças nucleotídicas par a par; Pi: diversidade nucleotídica; D: teste de neutralidade de Tajma (D); Fs: testes de Fu (Fs) e Hri: índice de Raggedness (estimativa de expansão demográfica e distribuição mismatch). Em destaque, os menores e maiores valores obtidos, excetuando os obtidos para o rio Tapajós.

Localidade	N	H	H/N	Hu	%Hu	S	ETA	M_R	HD	K	Pi	*D* (Tajima)	*Fs* (Fu)	Hri (*P*)
Estuário	54	**41**	0,8	20	48,8	**59**	**61**	**9**	0,987 ± 0,007	8,773 ± 4,111	0,0096 ± 0,005	-1,112	-24,65*	0,004 (0,950)**
Santarém	40	29	0,7	14	48,3	**41**	44	1	0,967 ± 0,019	8,160 ± 3,867	0,0089 ± 0,005	-0,54	-13,82*	0,006 (0,936)
Rio Tapajós	5	4	0,8	0	0	16	16	0	0,900 ± 0,161	7,400 ± 4,171	0,0081 ± 0,005	-0,267	1,12	1,070 (0,113)
Rio Madeira	54	40	0,7	23	57,5	52	54	4	0,980 ± 0,009	8,404 ± 3,951	0,0092 ± 0,005	-0,902	-24,48*	0,006 (0,738)
Porto Maldonado	43	**24**	**0,6**	**11**	45,8	42	**43**	4	0,952 ± 0,016	7,847 ± 3,724	0,0086 ± 0,005	-0,668	-6,25*	0,015 (0,203)
Manaus	43	29	0,7	13	44,8	54	57	2	**0,945 ± 0,024**	7,694 ± 3,657	0,0085 ± 0,005	-1,357	-13,12*	0,014 (0,432)
Rio Branco	54	**41**	0,8	**27**	65,9	47	50	2	0,979 ± 0,010	**7,176 ± 3,417**	**0,0079 ± 0,004**	-1,036	-25,02*	0,005 (0,960)**
Rio Purus	42	30	0,7	14	46,7	42	**43**	3	0,969 ± 0,017	7,715 ± 3,668	0,0085 ± 0,005	-0,734	-15,28*	0,014 (0,315)
Tefé	45	33	0,7	15	45,5	44	47	2	0,983 ± 0,009	8,167 ± 3,860	0,0090 ± 0,005	-0,655	-18,10*	0,008 (0,723)
Rio Japurá	41	36	**0,9**	25	**69,4**	43	45	5	**0,993 ± 0,008**	8,670 ± 4,087	0,0095 ± 0,005	-0,483	-24,72*	0,008 (0,629)
Rio Juruá	40	31	0,8	**11**	**35,5**	43	45	2	0,986 ± 0,009	8,182 ± 3,876	0,0090 ± 0,005	-0,673	-17,50*	0,016 (0,251)
Rio Içá	43	37	**0,9**	23	62,2	54	56	3	0,990 ± 0,009	**9,210 ± 4,318**	**0,0101 ± 0,005**	-0,927	-24,53*	0,010 (0,313)
Tabatinga	54	34	**0,6**	18	52,9	46	48	2	0,955 ± 0,017	7,560 ± 3,583	0,0083 ± 0,004	-0,854	-16,77*	0,009 (0,724)
Iquitos	54	36	0,7	14	38,9	45	46	0	0,977 ± 0,010	7,272 ± 3,459	0,0080 ± 0,004	-0,895	-20,98*	0,011 (0,501)
Pucallpa	40	28	0,7	12	42,9	43	45	2	0,954 ± 0,023	7,377 ± 3,523	0,0081 ± 0,004	-0,955	-13,53*	0,007 (0,890)

* Valores significativos (P<0,05); * * Valores significativos (P>0,95)

Na segunda análise (Análise 2, Tabela 6), retirou-se as localidades dos tributários para se verificar os valores da AMOVA associados somente à calha do sistema EAS (Estuário, Santarém, Manaus, Tefé, Tabatinga, Iquitos e Pucallpa) e foi observada diferenciação genética significativa, ainda que baixa, (ϕ_{ST} = 0,008; P=0,046).

Face a esses resultados, foram retiradas da análise as localidades com indícios de diferenciação genética, a fim de verificar quais delas estavam resultando na estruturação detectada na AMOVA global da análise 1 (Tabela 6). Considerando que nenhum valor de ϕ_{ST} par a par (dados não mostrados) foi significativo nessa análise após a correção de Bonferroni (Rice, 1989), o critério foi retirar as localidades que apresentaram valores de probabilidade entre 0,005 a 0,017, após ranqueados. Ou seja, a ausência de estrutura genética (ϕ_{ST}=0,005; P=0,069) encontrada na análise 3 demonstra que a estrutura encontrada na AMOVA global da análise 1 estava associada justamente aos quatro locais da análise 4. Ainda que em níveis baixos, estrutura genética significativa foi encontrada entre essas quatro localidades (rio Tapajós, rio Madeira, Porto Maldonado e rio Japurá) (ϕ_{ST}= 0,028; P=0,005; Análise 4, Tabela 6). Foi observado também que 2,81% da diversidade genética encontra-se entre as localidades. A partir das comparações par a par (dados não mostrados) dessa análise, estrutura significativa foi encontrada entre os rios Madeira e Japurá (ϕ_{ST} =0.035; P=0,0077), após correção de bonferroni (P< 0,008).

Por outro lado, a AMOVA global não revelou diferenciação genética significativa entre os grupos usados nas análises 3 e 4, quando comparados entre si, na análise 5 (ϕ_{ST}= 0,004; P=0,098) (Tabela 6). Foi observada uma baixa diferenciação significativa entre as localidades dentro dos grupos (ϕ_{SC}=0,009; P=0,003), encontrada na análise 4.

Diferenciação genética significativa também foi observada entre o estuário, Manaus e Tabatinga, a partir de um tamanho amostral maior (ES=54, MA=43 e TA=54) (análise 6, Tabela 6), corroborando os resultados obtidos por Batista (2001) e Batista e Alves-Gomes (2006) a partir de um tamanho amostral menor (15 indivíduos de cada uma das três localidades).

De uma forma geral, foi observado que 98,9% da variabilidade genética da dourada está distribuída dentro das localidades amostradas.

3.1.4. Análise de correlação entre a distância genética e distância geográfica (teste de Mantel) em *Brachyplatystoma rousseauxii*

Não houve correlação genética significativa entre a distância genética (baseada nos valores de F_{ST}) estimada para a dourada e a distância geográfica entre as localidades amostradas, revelada pelo teste de Mantel [coeficiente de correlação (r)= -0,095267, P= 0,0701)].

3.1.5. Distância genética e fluxo gênico em *Brachyplatystoma rousseauxii*

Valores relativamente homogêneos da média da distância genética (corrigida com o modelo HKY+I+G) foram obtidos entre os exemplares de dourada dentro e entre as localidades amostradas (Tabela 7). A média da distância genética, estimada dentro das localidades, variou entre 0,89% (±0,43), entre os indivíduos coletados em rio Branco, a 1,17% (±0,49), observada entre os indivíduos do rio Içá, enquanto que a estimada entre as localidades variou entre 0,90% (±0,47), entre Iquitos e Pucallpa, a 1,15% (±0,49), entre rio Içá e rio Japurá.

As taxas de fluxo gênico (taxas de migração), em valores de *Nm* (onde *N* é o tamanho efetivo da população de fêmeas e *m* é a taxa de mutação/sítio por geração) estimada a partir dos valores de F_{ST} par-a-par com o auxílio do programa ARLEQUIN 3.11 (Excoffier *et al.*, 2005), variou de 11,34, entre os exemplares de dourada coletadas em Manaus e no rio Japurá, a 8441,38 entre as amostradas no Estuário e rio Branco. A referência “inf” entre várias estimativas par-a-par, refletem as altas taxas de fluxo gênico que tendem ao infinito. Dessa forma, taxas relativamente altas de fluxo gênico foram obtidas para a dourada ente as 15 localidades amostradas (Tabela 8).

3.1.1. Análise de simulação do comportamento filopátrico

Não foram observados valores significativamente menores de distância média e máxima iniciais, comparados com os valores médios, os obtidos com 95% de corte e com a correção de bonferroni (Tabela 9). Portanto, com os dados obtidos (região controle) e com a amostragem analisada, não é possível rejeitar a hipótese da “escolha aleatória” do rio para se reproduzir feita por indivíduos de dourada em sua migração reprodutiva. Tendências significativas ao comportamento filopátrico não foram observadas tanto com a distância média quanto para as distâncias média (teste-t, P= 0,372) e máxima (teste-t, P=0,407).

Tabela 6. Partição da variabilidade genética de *Brachyplatystoma rousseauxii,* estimada a partir da frequência e distribuição dos 301 haplótipos (região controle do DNAmt), distribuida em 15 localidades da Amazônia brasileira e peruana. Porcentagem da variância molecular (%) e estimativa da probabilidade estatística (P) para sete grupos alternativos em seis níveis hierárquicos (análises) a partir da análise da AMOVA.

Análise	Partição dos grupos		Entre os grupos			Entre as localidades dentro dos grupos			Dentro das localidades		
	Grupo 1	Grupo 2	%	P	ϕ_{CT}	%	P	(ϕ_{ST}/ϕ_{SC})	%	P	ϕ_{ST}
1	Todas as localidades	-	-	-	-	1,06	**0,001***	0,011	98,94	-	-
2	ES+SA+MA +TE+TA+IQ+PC	-	-	-	-	0,80	**0,046***	0,008	99,20	-	-
3	ES+SA+MA+RB+TE+PU + JU+IÇ+TA+ IQ+PC	-	-	-	-	0,51	0,069	0,005	99,49	-	-
4	TP+MD+ PM+JA	-	-	-	-	2,81	**0,005***	0,028	97,19	-	-
5	ES+SA+MA+RB+TE+ PU+JU+IÇ+TA+ IQ+PC	TP+MD+ PM+JA	0,35	0,098	0,004	0,93	**0,003***	ϕ_{SC}= 0,009	98,72	**0,002***	0,013
6	ES+MA+TA	-				1,45	**0,041***	0,015	98,55		

ES - Estuário, SA - Santarém, TP - rio Tapajós, MD - rio Madeira, PM - Porto Maldonado; MA: Manaus, RB – rio Branco, PU – rio Purus, TE – Tefé, JA – rio Japurá, JU - rio Juruá, IC – rio Içá, TA – Tabatinga, IQ – Iquitos e PC - Pucallpa. *Valores significativos (P<0,05); ϕ_{CT}; ϕ_{ST}; ϕ_{SC} = índices de fixação (Weir e Cockerham, 1984) análogos às estatísticas F de Wright.

Tabela 7. Média da distância genética (%) para a par (corrigida com o modelo HKY+I+G) de *Brachyplatystoma rousseauxii* estimada entre e dentro das 15 localidades amostradas, distribuídas na Amazônia brasileira e peruana, utilizando a região controle (DNAmt).

	Localidades														
	ES	**SA**	**TP**	**MD**	**PM**	**MA**	**RB**	**PU**	**TE**	**JA**	**JU**	**IÇ**	**TA**	**IQ**	**PC**
ES	1,11±0,54														
SA	1,08±0,52	1,05±0,51													
TP	1,04±0,48	1,09±0,45	0,93±0,54												
MD	1,12±0,52	1,04±0,52	1,13±0,45	1,06±0,51											
PM	1,05±0,50	1,03±0,47	0,99±0,43	1,04±0,47	0,98±0,45										
MA	1,07±0,55	1,00±0,53	1,07±0,48	1,02±0,53	1,01±0,50	0,92±0,57									
RB	1,00±0,49	0,97±0,47	0,96±0,42	0,99±0,46	0,94±0,43	0,94±0,52	**0,89±0,43**								
PU	1,04±0,50	0,99±0,48	1,03±0,41	1,02±0,48	0,97±0,44	0,97±0,52	0,92±0,45	0,96±0,45							
TE	1,06±0,53	1,02±0,49	1,03±0,49	1,06±0,47	1,01±0,46	0,99±0,52	0,95±0,46	0,99±0,47	1,00±0,50						
JÁ	1,10±0,52	1,07±0,49	1,06±0,47	1,12±0,48	1,05±0,46	1,07±0,52	1,00±0,46	1,04±0,46	1,06±0,49	1,09±0,47					
JU	1,06±0,53	1,07±0,48	0,98±0,46	1,09±0,47	1,00±0,47	1,04±0,51	0,95±0,45	1,01±0,46	1,02±0,49	1,07±0,49	0,99±0,46				
IÇ	1,14±0,53	1,10±0,50	1,10±0,50	1,12±0,48	1,09±0,46	1,07±0,52	1,02±0,46	1,07±0,47	1,08±0,49	**1,15±0,49**	1,09±0,49	**1,17±0,49**			
TA	1,05±0,54	0,98±0,52	1,03±0,49	1,01±0,52	0,99±0,49	0,94±0,56	0,93±0,49	0,95±0,50	0,98±0,51	1,06±0,51	1,02±0,51	1,05±0,51	0,94±0,53		
IQ	1,02±0,49	0,98±0,48	1,04±0,37	0,99±0,45	0,96±0,42	0,93±0,51	**0,90±0,43**	0,94±0,45	0,96±0,45	1,03±0,46	0,99±0,43	1,04±0,45	0,94±0,49	0,90±0,43	
PC	1,02±0,53	0,99±0,51	0,98±0,46	1,01±0,49	0,96±0,46	0,94±0,54	0,90±0,48	0,94±0,49	0,96±0,50	1,03±0,50	0,97±0,49	1,04±0,49	0,94±0,52	0,90±0,47	0,93±0,50

ES - Estuário, SA - Santarém, TP - rio Tapajós, MD - rio Madeira, PM - Porto Maldonado; MA: Manaus, RB – rio Branco, PU – rio Purus, TE – Tefé, JA – rio Japurá, JU - rio Juruá, IC – rio Içá, TA – Tabatinga e IQ – Iquitos. Valores em (%).

Tabela 8. Fluxo gênico (par a par) estimado entre as 15 localidades amostradas para *Brachyplatystoma rousseauxii,* a partir dos valores de *Nm* (número de migrantes por geração baseado nos valores de F_{ST}), utilizando a região controle (DNAmt) como marcador molecular.

	Localidades													
	Estuário	**Santarém**	**Rio Tapajós**	**Rio Madeira**	**Porto Maldonado**	**Manaus**	**Rio Branco**	**Rio Purus**	**Tefé**	**Rio Japurá**	**Rio Juruá**	**Rio Içá**	**Tabatinga**	**Iquitos**
Santarém	29,86													
Rio Tapajós	81,15	4,95												
Rio Madeira	18,92	1293,11	4,62											
Porto Maldonado	96,18	17,28	13,93	25,85										
Manaus	17,92	105,18	4,01	67,29	11,90									
Rio Branco	**8441,38**	34,94	8,04	24,26	60,37	41,08								
Rio Purus	73,74	inf	5,81	100,75	89,08	99,45	inf							
Tefé	inf	194,61	12,30	37,34	43,23	170,68	inf	inf						
Rio Japurá	469,37	32,51	15,80	13,83	27,09	**11,34**	34,94	54,63	83,70					
Rio Juruá	inf	32,18	10,42	40,61	inf	21,92	inf	115,89	inf	35,36				
Rio Içá	inf	137,03	20,60	73,76	39,18	98,23	inf	262,04	inf	38,23	inf			
Tabatinga	22,13	inf	5,21	57,75	14,68	inf	39,91	138,02	144,19	12,35	24,63	235,67		
Iquitos	33,63	28,72	3,62	32,75	20,32	114,54	64,65	57,55	132,72	15,15	57,34	42,15	23,47	
Pucallpa	165,68	22,26	7,87	22,28	42,68	195,23	inf	124,20	inf	24,83	419,93	374,77	37,09	inf

Inf: refere-se a taxas de fluxo gênico que tendem ao infinito.

Tabela 9. Valores de distância genética média e Maxima obtida para *Brachyplatystoma rousseauxii*, amostrada em 14 localidades distribuídas na Amazônia brasileira e peruana, antes (inicial) e depois da análise de simulação (média, com 95% de corte e com correção de Bonferroni) realizada para verificar a existência de comportamento filopatrico.

Localidades	Distância média				Distância máxima			
	Inicial	média	95%	CB	Inicial	média	95%	CB
Estuário	0,010	0,009	0,008	0,008	0,025	0,021	0,018	0,008
Santarém	0,009	0,009	0,008	0,007	0,020	0,020	0,017	0,007
rio Madeira	0,009	0,009	0,008	0,008	0,020	0,021	0,018	0,008
Porto Maldonado	0,009	0,009	0,008	0,007	0,019	0,020	0,017	0,007
Manaus	0,009	0,009	0,008	0,007	0,026	0,020	0,017	0,007
rio Branco	0,008	0,009	0,008	0,008	0,018	0,021	0,018	0,008
rio Purus	0,009	0,009	0,008	0,007	0,020	0,020	0,017	0,007
Tefé	0,009	0,009	0,008	0,007	0,019	0,020	0,017	0,007
rio Japurá	0,010	0,009	0,008	0,007	0,021	0,020	0,017	0,007
rio Juruá	0,009	0,009	0,008	0,007	0,019	0,020	0,017	0,007
rio Içá	0,010	0,009	0,008	0,007	0,020	0,020	0,017	0,007
Tabatinga	0,008	0,009	0,008	0,008	0,024	0,021	0,018	0,008
Iquitos	0,008	0,009	0,008	0,008	0,017	0,021	0,018	0,008
Pucallpa	0,008	0,009	0,008	0,007	0,021	0,020	0,017	0,007

3.1.2. Análise de estoque relacionado (*Mixstock analyses*)

A análise de estoques relacionados mostrou que todos os tributários e demais locais da calha contribuem aproximadamente de forma similar para o estuário e Santarém, as duas áreas potenciais de criação consideradas na análise (Figura 2).

Todavia, aproximadamente 1/3 de todos os haplótipos observados (dados não mostrados) nas áreas de reprodução da dourada (tributários) não foram atribuídos às duas potenciais áreas de criação (estuário e Santarém).

3.1.3. Análise de expansão demográfica em *Brachyplatystoma rousseauxii*

O Teste de neutralidade seletiva *D* de Tajima (Tajima, 1989) não foi significativo em nenhuma das 15 localidades amostradas, indicando equilíbrio genético com relação aos haplótipos da região controle do DNAmt.

Os valores de *Fs* negativos e significativos (P< 0,05; *Tabela 5) do teste de Fu (Fu, 1997) indicam que a dourada, em todas as localidades amostradas, se encontra em expansão populacional.

Os valores baixos obtidos para o índice de *Raggedness* (Hri) obtidos para a maioria das localidades amostradas, corroboram os valores de *Fs* do teste de Fu, de que a dourada tenha passado por uma expansão populacional recente. Além do padrão gráfico unimodal da distribuição *mismatch* (Figura 3), considerando conjuntamente as 15 localidades amostradas, também indicar esse cenário, a população pode ter passado por uma expansão oscilante com altos níveis de migração.

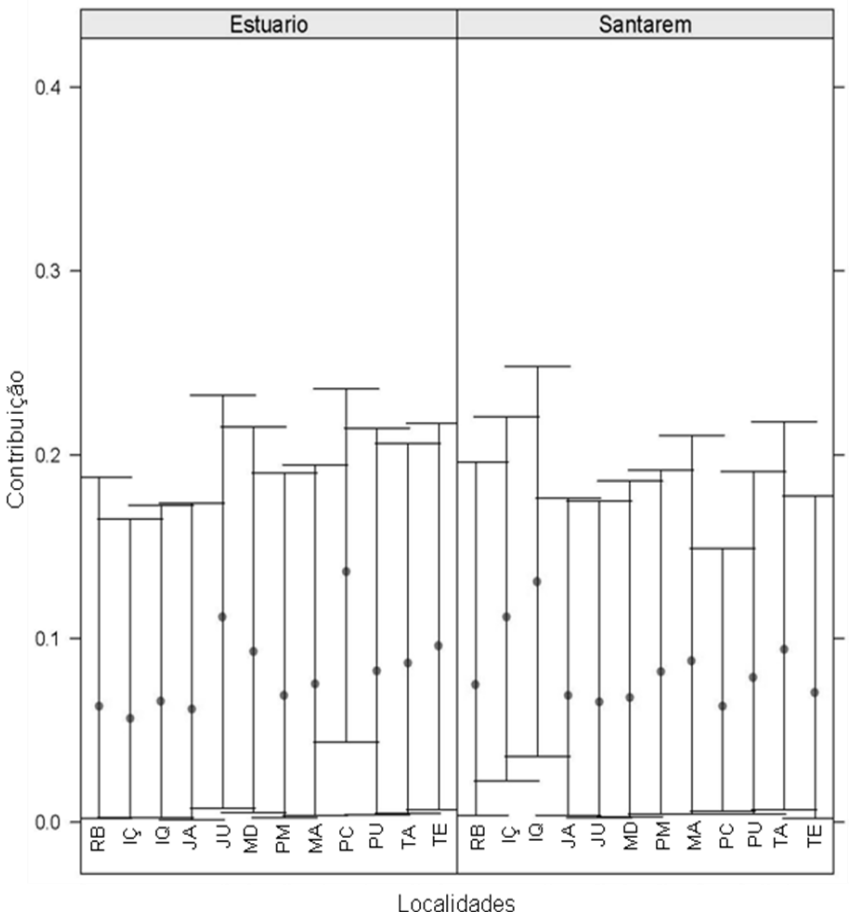

Figura 2. Contribuição proporcional de cada uma das 12 localidades para o estuário e Santarém consideradas na análise de estoque relacionado (*Mixstock analyses*) como áreas de criação da dourada. Estimativas realizadas a partir da freqüência absoluta dos haplótipos obtidos com a região controle. Círculos sólidos em cada barra representam a média da porcentagem de contribuição. As barras representam 95% de limite de confiança. RB – rio Branco, IC – rio Içá, IQ – Iquitos, JA – rio Japurá, JU - rio Juruá, MD - rio Madeira, PM - Porto Maldonado, MA: Manaus, PC – Pucallpa, PU – rio Purus, TA – Tabatinga e TE – Tefé.

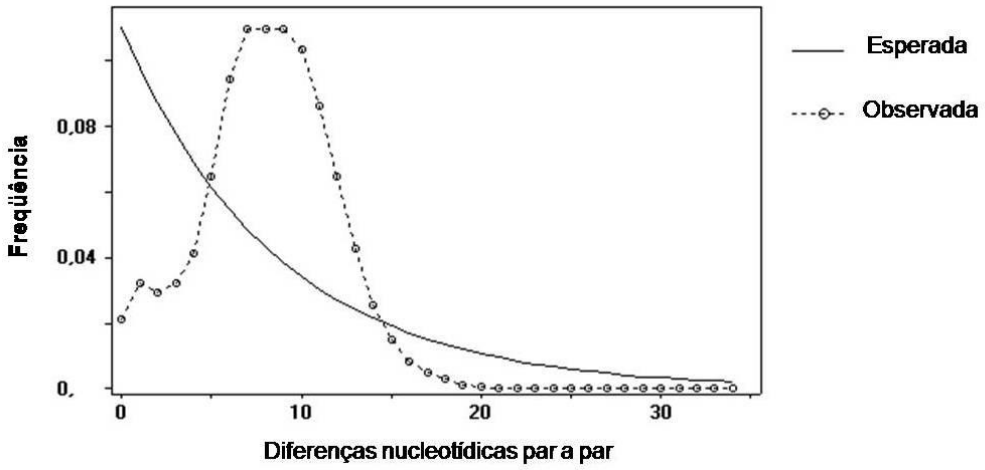

Figura 3. Padrão unimodal da distribuição da freqüência das diferenças genéticas par a par, observada e esperada, obtidas para a região controle (DNAmt) de *Brachyplatystoma rousseauxii* amostrada em 15 localidades da Amazônia brasileira e peruana.

3.2. Microssatélites

Foi gerada uma matriz de dados, contendo o genótipo de 483 indivíduos de *B. rousseauxii*, amostrados em 13 localidades (Tabela 1) para oito locos microssatélites, a fim de realizar as análises populacionais. A análise realizada no programa MICRO-CHECKER 2.2.3 (Van Oosterhout *et al.*, 2004), não indicou a ocorrência de alelos nulos, *stutters* e *dropout* de alelos em nenhum dos oito locos.

3.2.1. Diversidade genética em *Brachyplatystoma rousseauxii*

Foram observados 98 alelos (A), entre os 483 indivíduos de *B. rousseauxii* distribuídos nos oito locos microssatélites, com uma média de 12,3 alelos por loco. O número de alelos variou entre sete (BR7) a 17 (BR37) por loco e o tamanho entre 101 a 341 pb. A heterozigosidade esperada (H_e) variou entre 0,354 (BR41) e 0,827 (BR45), com uma média de 0,607 por loco, enquanto que a heterozigosidade observada (H_o) variou entre 0,346 (BR7) e 0,809 (BR45), apresentando uma média de 0,588 por loco. A média do Conteúdo de Polimorfismo Informativo (PIC) foi de 0,577, sendo que o loco BR45 apresentou o maior índice (0,804) e o BR7 o menor (0,340). Esse loco também apresentou o maior valor para o coeficiente de endogamia F_{IS} (0,057) (Tabela 10).

Tabela 10. Polimorfismo Informativo (PIC) e o índice de Endogamia (F_{IS}) obtidos para cada um dos oito locos microssatélites em 483 indivíduos de *Brachyplatystoma rousseauxii*, amostrados em 13 localidades. Os valores médios para cada um desses índices também são apresentados.

Loco	A	Tamanho (pb)	H_e	H_o	PIC	F_{IS}
BR7	**7**	**101**-125	0,366	**0,346**	**0,340**	**0,057**
BR37	**17**	303-**341**	0,730	0,719	0,694	0,018
BR41	10	210-228	**0,354**	0,363	0,344	**-0,015**
BR45	14	186-224	**0,827**	**0,809**	**0,804**	0,017
BR46	13	103-123	0,633	0,596	0,587	0,048
BR47	10	103-121	0,515	0,479	0,466	0,048
BR49	14	290-318	0,782	0,779	0,757	0,002
BR51	13	263-293	0,648	0,613	0,623	0,053
Total	98	101-341	0,607 ±0, 0,178	0,588 ± 0,008	0,577 ± 0,167	0,028 ± 0,027

Entre os 98 alelos foram observados 19 alelos exclusivos (observado em uma única localidade) distribuídos em sete das 13 localidades amostradas, entre os 483 indivíduos de *B. rousseauxii*. O alelo 127 (BR7), presente no rio Içá, mostrou a maior freqüência (0,045). O

Rio Madeira apresentou o maior número de alelos exclusivos (6) e Tefé, Porto Maldonado e rio Içá o menor número (1) (Tabela 11).

Tabela 11. Alelos exclusivos (em pb) e suas freqüências (valores entre parênteses) observados em oito locos microssatélites de *Brachyplatystoma rousseauxii* em sete das 13 localidades amostradas.

Locos	Localidades							Total
	Estuário	Manaus	Tefé	Rio Madeira	Porto Maldonado	Rio Japurá	Rio Içá	
BR7							109 (0,045)	**1**
BR37		335 (0,013)	323 (0,015)			303 (0,012)		**3**
BR41		210 (0,013)				212 (0,012)		**3**
		214 (0,013)						
BR45	204 (0,011)			186 (0,030)				**2**
BR46						117 (0,013)		**1**
BR47		105 (0,015)			119 (0,023)	121 (0,012)		**3**
BR49				290 (0,013)				**3**
				316 (0,013)				
				291 (0,013)				
BR51	263 (0,011)			291 (0,013)				**3**
				293 (0,013)				
Total	**2**	**4**	**1**	**6**	**1**	**5**	**1**	**19**

Foi estimado o número de alelos, as heterozigosidade observada (H_o) e esperada (H_e), a probabilidade (P) para o teste de equilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE) e o coeficiente de endogamia (F_{IS}) por loco em cada uma das 13 localidades estudadas (Tabela 12). A heterozigosidade observada (H_o) e esperada variaram entre 0,133 (BR7, nos espécimes oriundos do rio Juruá) a 0,909 (BR45, na localidade do rio Madeira) e 0,191 a 0,843 nos mesmos locos e localidades, respectivamente. Os valores de F_{IS} (variaram entre -0,296 (BR46), observado entre os indivíduos coletados em Porto Maldonado, e 0,410 (BR7) entre os exemplares do rio Içá.

Desvio de equilíbrio de Hardy-Weinberg foi observado em duas (Manaus, rio Japurá) das 13 localidades amostradas, em um loco em cada local (Tabela 12), após a correção de Bonferroni (P=0,00625) (Rice, 1989). Excesso de heterozigotos no rio Japurá e de homozigotos em Manaus podem justificar esse resultado.

Tabela 12. Índices de diversidade genética obtidos em oito locos microssatélites de *Brachyplatystoma rousseauxii* amostrada em 13 localidades. N – Número de indivíduos analisados em cada localidade; *A* – Número de alelos; H_o - Heterozigosidade observada; H_e - Heterozigosidade esperada; F_{IS} – Coeficiente de endogamia; HWE – Probabilidade do teste de Equilíbrio de Hardy Weinberg.

(continua)

Locos		Localidades												
		Estuário	**Santarém**	**Rio Madeira**	**Porto Maldonado**	**Manaus**	**Rio Purus**	**Tefé**	**Rio Japurá**	**Rio Juruá**	**Rio Içá**	**Tabatinga**	**Iquitos**	**Pucallpa**
BR7	N	44	30	40	17	34	33	40	42	15	22	41	41	38
	A	4	3	6	3	4	4	3	3	3	6	3	5	4
	H_o	0,409	0,467	0,425	0,471	0,265	0,485	0,275	0,262	**0,133**	0,273	0,244	0,390	0,342
	H_e	0,394	0,418	0,446	0,557	0,350	0,417	0,261	0,236	**0,191**	0,447	0,301	0,349	0,411
	*F*is	-0,027	-0,100	0,059	0,161	0,258	-0,147	-0,040	-0,097	0,331	**0,410**	0,193	-0,107	0,180
	HWE	0,931	0,809	0,850	0,217	0,093	1,000	0,332	1,000	0,111	0,020	0,041	0,377	0,255
BR37	N	47	32	34	16	38	32	30	43	17	29	45	45	33
	A	8	10	5	5	9	7	8	12	6	7	12	10	11
	H_o	0,681	0,813	0,735	0,875	0,684	0,719	0,700	0,651	0,765	0,655	0,733	0,733	0,727
	H_e	0,714	0,712	0,707	0,718	0,744	0,731	0,702	0,711	0,758	0,734	0,761	0,734	0,700
	*F*is	0,048	-0,126	-0,025	-0,228	0,094	0,033	0,020	0,095	-0,010	0,124	0,037	0,001	-0,024
	HWE	0,060	0,328	0,144	0,147	0,072	0,089	0,394	0,072	0,914	0,395	0,061	0,574	0,778
BR41	N	46	32	39	21	38	35	42	43	18	36	45	46	39
	A	6	5	5	5	8	6	7	5	5	6	5	5	5
	H_o	0,326	0,375	0,538	0,238	0,368	0,371	0,405	0,349	0,227	0,444	0,222	0,326	0,410
	H_e	0,362	0,374	0,477	0,298	0,368	0,393	0,371	0,306	0,260	0,424	0,224	0,340	0,354
	*F*is	0,101	0,012	-0,116	0,225	0,013	0,070	-0,078	-0,130	-0,069	-0,033	0,018	0,052	-0,145
	HWE	0,145	0,076	1,000	0,098	0,277	0,318	0,807	1,000	1,000	0,583	0,082	0,214	1,000
BR45	N	47	30	33	19	38	34	42	37	16	35	45	45	35
	A	10	9	11	7	9	9	10	8	7	9	10	11	9
	H_o	0,809	0,800	**0,909**	0,737	0,868	0,765	0,786	0,703	0,750	0,800	0,867	0,778	0,886
	H_e	0,801	0,802	**0,843**	0,821	0,830	0,793	0,828	0,791	0,712	0,840	0,827	0,828	0,804
	*F*is	0,001	0,019	-0,063	0,105	-0,033	0,051	0,063	0,125	-0,055	0,062	-0,037	0,061	-0,087
	HWE	0,911	0,691	0,021	0,062	0,214	0,883	0,323	**0,004***	0,203	0,203	0,971	0,356	0,638

* $p < 0,006$, após correção de Bonferroni.

Tabela 12. Índices de diversidade genética obtidos em oito locos microssatélites de *Brachyplatystoma rousseauxii* amostrada em 13 localidades. N – Número de indivíduos analisados em cada localidade; *A* – Número de alelos; H_o - Heterozigosidade observada; H_e - Heterozigosidade esperada; F_{IS} – Coeficiente de endogamia; HWE – Probabilidade do teste de Equilíbrio de Hardy Weinberg.

(conclusão)

Locos		**Localidades**												
		Estuário	**Santarém**	**Rio Madeira**	**Porto Maldonado**	**Manaus**	**Rio Purus**	**Tefé**	**Rio Japurá**	**Rio Juruá**	**Rio Içá**	**Tabatinga**	**Iquitos**	**Pucallpa**
BR46	N	47	30	37	18	34	35	41	40	14	36	45	38	36
	A	4	6	8	6	5	6	4	9	7	7	6	7	7
	H_o	0,553	0,567	0,649	0,722	0,441	0,457	0,537	0,575	0,857	0,667	0,511	0,684	0,778
	H_e	0,558	0,640	0,650	0,546	0,621	0,476	0,578	0,708	0,691	0,663	0,609	0,725	0,604
	*F*is	0,019	0,131	0,015	**-0,296**	0,303	0,054	0,084	0,190	-0,253	0,009	0,172	0,056	-0,274
	HWE	0,265	0,052	0,574	0,062	**0,002***	0,136	0,467	0,023	0,987	0,351	0,023	0,056	0,382
BR47	N	47	25	38	22	34	34	42	42	17	36	45	46	38
	A	6	5	5	6	6	4	5	6	3	4	5	5	4
	H_o	0,383	0,560	0,737	0,364	0,353	0,471	0,429	0,571	0,353	0,361	0,467	0,565	0,500
	H_e	0,410	0,622	0,523	0,604	0,509	0,485	0,595	0,535	0,308	0,354	0,459	0,560	0,468
	*F*is	0,076	0,119	-0,398	0,403	0,320	0,044	0,291	-0,055	-0,149	-0,007	-0,007	0,001	-0,054
	HWE	0,414	0,111	0,043	0,017	0,009	0,200	0,016	0,965	1,000	0,659	0,725	0,775	1,000
BR49	N	44	30	40	21	34	34	39	43	18	36	38	45	35
	A	10	9	12	9	9	10	8	9	9	9	9	9	10
	H_o	0,818	0,667	0,725	0,905	0,794	0,824	0,692	0,791	0,778	0,750	0,737	0,822	0,829
	H_e	0,781	0,723	0,836	0,838	0,790	0,791	0,771	0,791	0,765	0,684	0,771	0,771	0,721
	*F*is	-0,036	0,095	0,145	-0,056	-0,006	-0,026	0,115	0,001	-0,017	-0,082	0,058	-0,055	-0,135
	HWE	0,065	0,191	0,056	0,119	0,696	0,761	0,433	0,021	0,531	0,995	0,446	0,647	0,702
BR51	N	44	32	40	22	38	28	34	43	12	36	31	46	36
	A	9	7	10	6	9	6	10	7	6	8	8	7	6
	H_o	0,659	0,594	0,575	0,500	0,658	0,536	0,765	0,628	0,583	0,500	0,613	0,630	0,639
	H_e	0,673	0,574	0,610	0,563	0,700	0,513	0,732	0,626	0,649	0,532	0,661	0,707	0,689
	*F*is	0,032	-0,018	0,070	0,135	0,074	-0,027	-0,030	0,009	0,105	0,075	0,089	0,109	0,087
	HWE	0,438	0,131	0,091	0,144	0,073	0,717	0,778	0,292	0,591	0,319	0,618	0,032	0,140

* $p < 0,006$, após correção de Bonferroni.

Não foi observado desequilíbrio de ligação significativo entre nenhuma combinação par a par de locos em nenhuma das 13 localidades amostradas.

Não foi observada saturação no número de alelos (Figura 4) e correlação foi significativamente positiva entre a heterozigosidade esperada e número de alelos por (R^2=0,600, P<0,05).

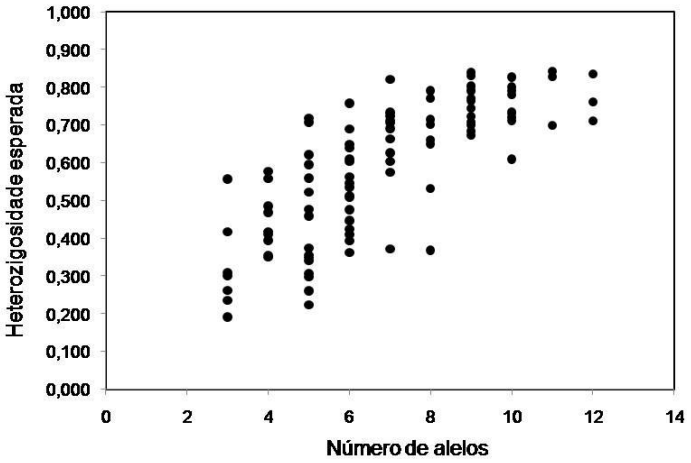

Figura 4. Correlação entre a heterozigosidade esperada e número de alelos, por loco e por localidade, obtidos para *Brachyplatystoma rousseauxii,* utilizando oito locos microssatélites.

Em uma análise geral, envolvendo os oito locos para cada uma das 13 localidades (Tabela 13), o rio Madeira apresentou o maior número de alelos totais (A_T=62) e, por conseguinte a maior riqueza alélica (A_R=7,75), enquanto que o rio Juruá os menores valores para esses índices (A_T =46 e A_R=5,75). Esse tributário também apresentou as menores estimativas da diversidade genética média (0,440 ± 0,260), média das diferenças par a par (3,365 ± 1,770) e Iquitos as maiores estimativas (0,579±0,317 e 4,630±2,292, respectivamente). Em tabatinga foi observada a menor heterozigosidade média observada (0,549) e em Pucallpa a maior média (0,638), enquanto que a média da heterozigosidade esperada variou entre 0,541 (rio Juruá) e 0,645 (rio Madeira). Os menores valores estimados para alguns índices no rio Juruá pode ser em função de seu menor tamanho amostral em relação às demais localidades.

Homogeneidade foi verificada nos valores da média da heterozigosidade observada entre as 13 localidades (Figura 4) de acordo com os resultados da ANOVA (F= 0,2426; P=0,9954). A dourada apresentou uma média de diversidade genética de 0,537±0,300 e baixo coeficiente de endocruzamento (F_{IS}), variando entre -0,178 (no rio Juruá) a 0,056 (em Manaus), ao analisar os 483 espécimes conjuntamente.

Tabela 13. Índices genéticos obtidos a partir de oito locos microssatélites em *Brachyplatystoma rousseauxii* amostrada em 13 localidades distribuídas na Amazônia brasileira e peruana: média do número de alelos por loco ou riqueza alélica (A_R), diversidade genética média, número total de alelos (A_T), média da heterosigozidade total observada (H_o) e esperada (H_e) e o coeficiente de endogamia (F_{IS}).

Localidades	N	A_T	A_R	Média da Diversidade Gênica	Média das diferenças par a par	Média $H_o - H_e$	F_{IS}
Estuário	47	57	7,13	0,570 ± 0,313	4,559 ± 2,261	0,580 - 0,592	0,019
Santarem	32	54	6,75	0,541 ± 0,301	4,334 ± 2,545	0,605 -0,619	0,022
Rio Madeira	40	**62**	**7,75**	0,563 ± 0,311	4,503 ± 2,240	**0,662 - 0,645**	-0,026
Porto Maldonado	22	47	5,88	0,491 ± 0,279	3,930 ± 1,841	0,602 - 0,625	0,039
Manaus	38	59	7,38	0,564 ± 0,311	4,511 ± 2,245	0,558 - 0,622	**0,104**
Rio Purus	35	52	6,50	0,537 ± 0,298	4,301 ± 2,155	0,578 - 0,583	0,009
Tefé	42	55	6,88	0,517 ± 0,304	4,135 ± 2,078	0,573 - 0,613	0,065
Rio Japurá	43	59	7,38	0,548 ± 0,303	4,383 ± 2,186	0,566 - 0,593	0,046
Rio Juruá	18	**46**	**5,75**	**0,440 ± 0,260**	**3,365 ± 1,770**	0,562 - 0,541	**-0,109**
Rio Icá	36	56	7,00	0,516 ± 0,288	4,130 ± 2,080	0,557 - 0,594	0,065
Tabatinga	45	58	7,25	0,530 ± 0,299	4,027 ± 2,030	**0,549 - 0,582**	0,058
Iquitos	46	59	7,38	**0,579 ± 0,317**	**4,630 ± 2,292**	0,617 - 0,630	0,021
Pucallpa	39	56	7,00	0,509 ± 0,284	4,073 ± 2,053	0,638 - 0,603	-0,061

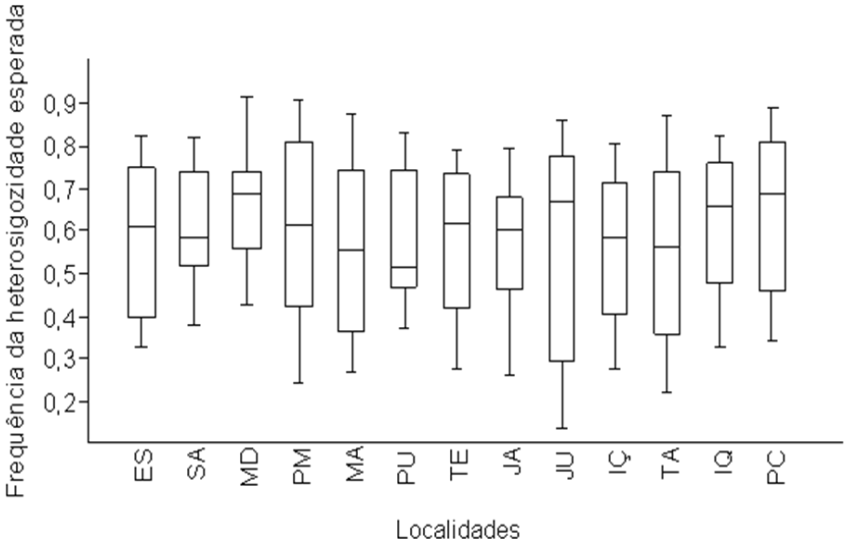

Figura 5. Distribuição das freqüências de heterozigosidade observada em exemplares de *Brachyplatystoma rousseauxii* nas 13 localidades amostradas da Amazônia brasileira e peruana. ES - Estuário, SA - Santarém, MD - rio Madeira, PM - Porto Maldonado; MA: Manaus, PU – rio Purus, TE – Tefé, JA – rio Japurá, JU - rio Juruá, IC – rio Içá, TA – Tabatinga e IQ – Iquitos.

3.2.2. Análise da distribuição da diversidade genética (AMOVA) em *Brachyplatystoma rousseauxii*

Os valores de F_{ST} obtidos para *B. rousseauxii* entre cada par das 13 localidades amostradas variou entre -0,004, observados entre os rios Purus e Japurá e 0,051 entre Santarém e rio Juruá (Tabela 14). Considerando que valores entre 0,00 e 0,05 indicam baixa diferenciação genética, valores entre 0,05 e 0,15 indicam diferenciação intermediária, valores entre 0,15 a 0,20 indicam alta diferenciação genética e valores acima de 0,25 indicam grande diferenciação (Wright, 1951), baixa diferenciação genética foram observadas na espécie entre as localidades estudadas, considerando oito locos microssatélites.

A análise de variância molecular (AMOVA) foi realizada com os oito locos microssatélites, assim como com a região controle, para estimar a variação genética dentro e entre as localidades (Tabela 15). Quando as 13 localidades foram analisadas em um único grupo hierárquico (Análise 1, Tabela 15), não foi observada diferenciação genética significativa (F_{ST} = 0,0004; P=0,245), uma vez que apenas 0,04% da variabilidade genética foi encontrada entre as localidades e 99,96% entre os indivíduos dentro dessas localidades.

Ao analisar as sete localidades da calha em um único nível hierárquico (análise 2, Tabela 15), foi observado que a variabilidade genética encontra-se entre as sete localidades da calha (Estuário, Santarém, Manaus, Tefé e Tabatinga, Iquitos e Pucallpa) (FST = -0,0008; P= 0,599). De uma forma global, e com os resultados obtidos com os oito locos microssatelites, verifica-se que não houve segregação genética significativa entre as 13 localidades onde indivíduos de *B. rousseauxii* foram amostrados.

Neste cenário, também não houve correlação significativa entre a distância genética e a distância geográfica (r =0,200; P=0,111) de acordo com o Teste de Mantel (Mantel, 1967) entre as 13 localidades amostradas.

Quando o programa STRUCTURE 2.3.1 (Pritchard *et al.*, 2000) foi utilizado para estimar o número de populações geneticamente homogêneas (*K*) entre todos os indivíduos amostrados nas 13 localidades, foi observado um *cluster* (*K* =1) (Figura 6a) com maior probabilidade *a posteriori* (-11960,5). Ainda que o resultado de Δ*K* (Evanno *et al.*, 2005) tenha mostrado três *clusters*, os valores de atribuição (Q) de cada uma das 13 localidades foi equivalente em todos os *clusters* (Tabela 16). Adicionalmente, todos os indivíduos amostrados se encontram no centro do triangulo (Figura 6b) (gerado pelo programa STRUCTURE) e embora as 13 localidades não estejam agrupadas em um único *cluster*, todas elas compartilham o mesmo material genético. Dessa forma, uma única população foi detectada para a dourada amostrada em 13 localidades.

Tabela 14. Valores de F_{ST} estimados entre os indivíduos de *Brachyplatystoma rousseauxii* de cada duas (par a par) das 13 localidades amostradas, utilizando oito locos microssatélites. Valores máximos e mínimos obtidos em destaque.

	Estuário	**Santarém**	**rio Madeira**	**Manaus**	**rio Purus**	**Tefé**	**rio Japurá**	**rio Juruá**	**rio Içá**	**Tabatinga**	**Iquitos**	**Pucallpa**
Estuário	0,025											
Santarém	0,013	0,005										
rio Madeira	0,013	0,013	-0,001									
Manaus	0,002	0,008	-0,001	0,003								
rio Purus	0,006	0,017	0,009	0,005	0,001							
Tefé	0,008	0,001	0,003	0,010	-0,002	0,010						
rio Japurá	0,005	0,012	0,005	0,009	**-0,004**	0,005	0,002					
rio Juruá	0,022	**0,051**	0,036	0,042	0,016	0,020	0,026	0,016				
rio Içá	0,002	0,020	0,013	0,014	0,000	0,001	0,014	0,004	0,014			
Tabatinga	0,008	0,014	0,008	0,007	-0,003	0,004	0,007	0,002	0,017	0,003		
Iquitos	0,006	0,003	0,000	0,008	-0,002	0,009	-0,003	-0,002	0,024	0,008	0,000	
Pucallpa	0,004	0,008	0,008	0,007	0,001	0,004	-0,001	0,004	0,017	0,004	-0,001	-0,003

Tabela 15. Análise de variância molecular (AMOVA) em *Brachyplatystoma rousseauxii*, a partir de distância euclidiana estimada com os valores de F_{ST}, utilizando oito locos microssatélites, em 13 localidades distribuídas na Amazônia brasileira e peruana.

Análise	Partição dos grupos	entre as localidades	dentro das localidades	P	F_{ST}
	Grupo	%	%		
1	Todas as localidades	0,04	99,96	0,245	0,0004
2	ES+SA+MA+ TE+TA+IQ+PC	-0,08	100,08	0,599	-0,0008

Porcentagem da variância molecular (%) e estimativa da probabilidade estatística (P) e dos valores de F_{ST}.
ES – Estuário, SA – Santarém, MA – Manaus, TE – Tefé, TA – Tabatinga, IQ – Iquitos e PC – Pucallpa.

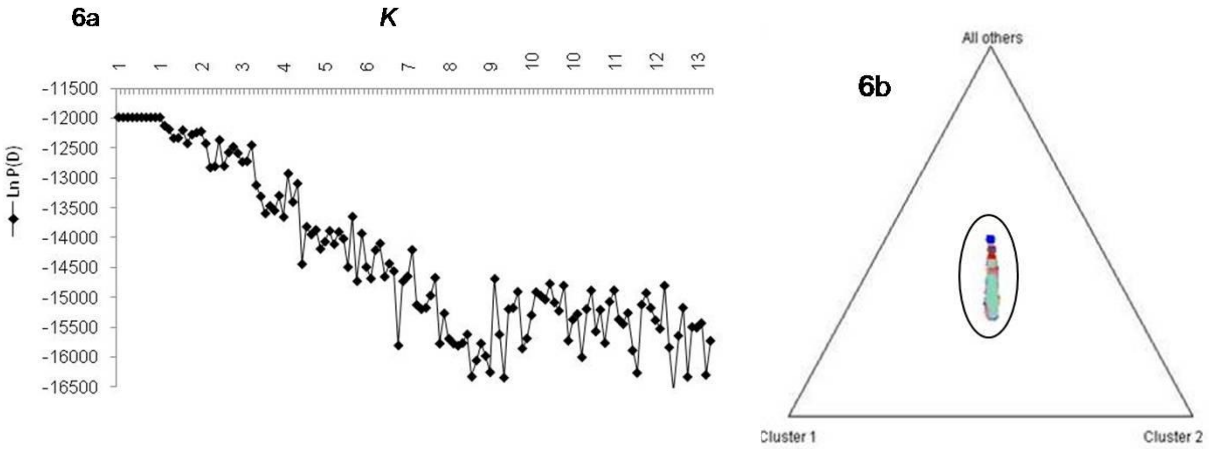

Figura 6. Uma única população (K=1 *cluster*) estimada para *Brachyplatystoma rousseauxii*, amostrada em 13 localidades a partir de inferência Bayesiana implementado no programa STRUCTURE, para K variando entre 1 a 13. **6a** - Valores da probabilidade a posteriori na vertical e na horizontal os números de agrupamentos (K) possíveis. **6b** – Triângulo indicando que todos os indivíduos se encontram no centro.

As taxas de fluxo gênico (taxas de migração), em valores de *Nm* (onde *N* é o tamanho efetivo da população de fêmeas e *m* é a taxa de mutação/sítio por geração) estimada a partir dos valores de F_{ST} par-a-par com o auxílio do programa ARLEQUIN 3.11 (Excoffier *et al.*, 2005), variou de 17,80 entre os exemplares de dourada coletados no estuário e em Santarém, a 2359,30 entre as amostradas em Pucallpa e rio Purus. A referência “inf” entre várias estimativas par-a-par, refletem as altas taxas de fluxo gênico que tendem ao infinito. Dessa forma, em consonância com os dados de sequências de DNA (Tabela 8), taxas relativamente altas de fluxo gênico também foram obtidas para a dourada entre as 13 localidades amostradas, utilizando os oito locos microssatélites (Tabela 18).

Tabela 16. Valores de atribuição (Q) dos exemplares de *Brachyplatystoma rousseauxii* de cada localidade em cada um dos três *clusters* estimado por ΔK (Evanno et al., 2005). Os valores de atribuição (Q) de cada uma das 13 localidades foram equivalentes em todos os clusters sendo que todas as localidades compartilham o mesmo material genético.

Localidades	*Clusters*/Grupos			Tamanho amostral
	1	2	3	
Estuário	0,336	0,336	0,328	47
Santarém	0,334	0,336	0,330	32
Rio Madeira	0,328	0,328	0,344	40
Porto Maldonado	0,331	0,330	0,339	22
Manaus	0,334	0,332	0,334	38
Rio Purus	0,338	0,336	0,326	35
Tefé	0,333	0,335	0,332	42
Rio Japurá	0,334	0,335	0,331	43
Rio Juruá	0,339	0,338	0,323	18
Rio Içá	0,334	0,334	0,332	36
Tabatinga	0,338	0,337	0,325	45
Iquitos	0,331	0,332	0,337	46
Pucallpa	0,336	0,337	0,327	39

Tabela 17. Fluxo gênico (par a par) estimado entre as 13 localidades amostradas para *Brachyplatystoma rousseauxii*, a partir dos valores de Nm (número de migrante por geração baseado nos valores de F_{ST}), utilizando oito locos microssatélites.

	Localidades											
	ES	**SA**	**MD**	**PM**	**MA**	**PU**	**TE**	**JA**	**JU**	**IÇ**	**TA**	**IQ**
SA	**17,80**											
MD	53,05	237,98										
PM	102,57	202,15	inf									
MA	199,44	59,34	inf	inf								
PU	205,34	34,66	114,82	inf	inf							
TE	169,35	inf	inf	43,88	inf	66,85						
JA	93,19	43,74	124,66	86,76	inf	284,53	inf					
JU	inf	20,45	81,26	33,93	inf	155,48	1192,04	inf				
IÇ	inf	31,29	98,38	76,44	inf	inf	27,29	201,08	inf			
TA	156,08	48,64	inf	inf	inf	212,69	inf	inf	inf	inf		
IQ	81,43	509,96	inf	184,70	inf	135,58	inf	inf	inf	109,98	inf	
PC	355,87	72,58	76,32	111,83	inf	**2359,30**	inf	776,74	inf	inf	inf	inf

ES - Estuário, SA - Santarém, MD - rio Madeira, PM - Porto Maldonado; MA: Manaus, PU – rio Purus, TE – Tefé, JA – rio Japurá, JU - rio Juruá, IC – rio Içá, TA – Tabatinga, IQ – Iquitos e PC - Pucallpa. Inf: refere-se a taxas de fluxo gênico que tende ao infinito

3.2.3. Análise de simulação do comportamento filopátrico

Porto Maldonado e rio Madeira foram considerados como uma única localidade na análise de simulação, uma vez que representam um mesmo tributário/cabeceira.

Não foram obtidos valores significativamente menores de F_{IS}, R_{IS} (ambos coeficientes de endocruzamento) e $\Delta\mu$ (estimado a partir da variação de tamanhos dos alelos) para nenhuma das 12 localidades analisadas (Tabela 18). Também não foi observada tendências significativas ao comportamento filopátrico, após o cálculo do teste-t pareado (F_{IS}: P=0,479; R_{IS}: P= 0,483 e $\Delta\mu$: P=0,173) realizado para todas as localidades para cada parâmetro calculado. A partir da análise de simulação, observa-se que cada localidade resultou em uma sub-amostragem do todo (todos os 483 indivíduos genotipados), portanto não é possível rejeitar a hipótese de "escolha aleatória" do rio para desovar feita pela dourada na migração reprodutiva, inferida a partir de marcadores moleculares microssatélites.

3.2.4. Análise de estoques relacionados em *Brachyplatystoma rousseauxii (Mixstock analyses)*

A partir da análise de estoques relacionados (*Mixstock analyses*) foi observado que todas as 11 localidades contribuem para com a parcela da população presente nas áreas hipotecas de criação consideradas para a dourada (estuário e Santarém) (Figura 7). O rio Purus e Tefé apresentaram níveis de contribuição maiores de que as demais localidades. Entretanto, existem genótipos encontrados nas áreas de reprodução da dourada (tributários) que não foram atribuídos às duas áreas hipotéticas de criação. Indicando que uma proporção pode ser encontrada em uma terceira ou mais áreas de criação em consonância com os resultados obtidos para a região controle (Figura 2).

Tabela 18. Simulação realizada entre os indivíduos de *Brachyplatystoma rousseauxii*, amostrados em 12 localidades da Amazônia, para verificar se essa espécie possui comportamento filopátrico (*Homing*), utilizando oito locos microssatélites. Foram calculados o F_{IS}, R_{IS} (ambos coeficiente de endocruzamento) e $\Delta\mu$ (equivalente a variação de tamanho dos alelos) antes (inicial) e depois das 10000 re-amostragens (média, valores de corte a 95% e com correção de bonferroni-CB).

Localidades	F_{IS}				R_{IS}				$\Delta\mu$			
	Inicial	**média**	**95%**	**CB**	**inicial**	**média**	**95%**	**CB**	**Inicial**	**média**	**95%**	**CB**
Estuário	0,64	0,67	0,59	0,56	11,56	22,72	13,47	11,28	14	17,17	14	13
Santarém	0,62	0,68	0,58	0,54	21,38	22,75	12,74	10,60	18	16,27	13	11
rio Madeira	0,58	0,67	0,60	0,57	25,30	22,47	14,30	11,57	15	17,60	15	14
Manaus	0,64	0,68	0,59	0,55	16,49	22,74	13,06	10,86	13	16,72	14	12
rio Purus	0,60	0,68	0,58	0,54	36,22	22,71	12,92	10,76	15	16,47	13	11
Tefé	0,74	0,67	0,59	0,55	24,14	22,56	13,09	11,04	17	16,93	14	12
rio Japurá	0,76	0,68	0,59	0,55	20,00	22,50	13,22	11,12	19	16,98	14	12
rio Juruá	0,85	0,69	0,57	0,52	20,62	23,13	12,32	10,17	15	15,29	11	10
rio Içá	0,64	0,68	0,59	0,55	11,43	22,65	12,98	10,90	14	16,60	14	11
Tabatinga	0,77	0,67	0,59	0,56	28,91	22,62	13,41	11,12	18	17,06	14	12
Iquitos	0,66	0,67	0,59	0,56	24,34	22,60	13,48	11,29	18	17,12	14	12
Pucallpa	0,64	0,68	0,59	0,55	30,58	22,60	13,13	11,02	18	16,75	14	12

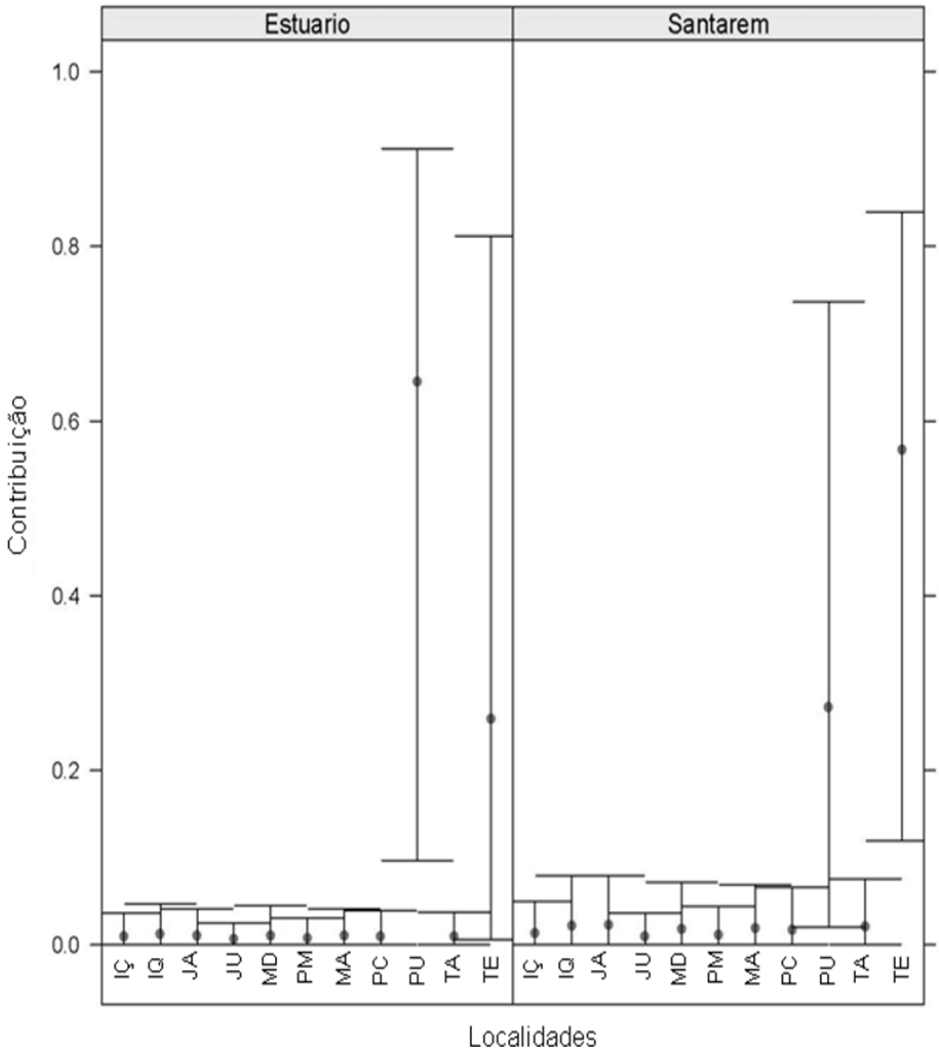

Figura 7. Contribuição de cada uma das 12 localidades para o estuário e Santarém (áreas de criação), consideradas na análise de estoque relacionado (*Mixstock analyses*) para *Brachyplatystoma rousseauxii*, utilizando oito locos microssatélites. Círculos sólidos em cada barra representam a melhor proporção de contribuição. As barras indicam a variação da estimativa ao nível de 95% de confiança. IC – rio Içá, IQ – Iquitos, JÁ - rio Japurá, JU - rio Juruá, MD - rio Madeira, PM - Porto Maldonado; MA: Manaus, PC – Pucallpa, PU – rio Purus, TA – Tabatinga e TE – Tefé.

4. DISCUSSÃO

Para organismos com valor comercial, o conhecimento sobre a história natural das espécies, e em especial de seu ciclo de vida, bem como a identificação de estoques (ou população, como amplamente tratada na literatura envolvendo genética de populações) são os primeiros passos ao se elaborar um plano de manejo consolidado com informações cientificas. Estoque é normalmente tratado como a unidade biológica fundamental de exploração comercial e o objetivo primordial do manejo pesqueiro é sua explotação sustentável no intuito de evitar sua depleção (Carvalho e Hauser, 1994; Waples e Gaggiotti, 2006) e atender à demanda sócio-econômica. Embora a genética raramente seja considerada como importante área a subsidiar políticas de conservação e manejo (Allendorf *et al.*, 1987), sua contribuição é indiscutível, refletida pelo número crescente de estudos e de implementação de metodologias aplicadas (Utter, 1991) a programas internacionais que subsidiam a tomada de decisões (Imsiridou *et al.*, 2003), pois sem políticas de conservação e manejo adequadas, a pesca pode afetar a composição ou mesmo a variabilidade genética de uma espécie, e com isso refletir negativamente em espécies relacionadas na cadeia trófica ou mesmo no ecossistema.

Os marcadores moleculares têm sido amplamente utilizados na identificação de espécies crípticas de importância para pesca (Solé-Cava, 2001). Nesse caso, citam-se o cação anjo (*Squatina argentina*) no sul do Brasil (Solé-Cava e Levy, 1987), o camarão *Penaeus subtilis* da costa brasileira (Gusmão *et al.*, 2000), a pescada-gó *Macrodon ancylodon* (Santos et al., 2003) da costa do Amapá e Pará, o acará disco *Symphysodon* spp. da bacia Amazônica (Amado *et al.*, 2008; Farias e Hrbek, 2008) dentre outros.

Os marcadores moleculares são usados também na identificação de estoques. Além de identificar, é importante também acessar a estrutura e a variabilidade genética do(s) estoque(s) principalmente quando se trata de um recurso pesqueiro em desequilíbrio na sua pescaria, como a sobrepesca, pois esse quadro leva à perda da variabilidade genética (Hauser *et al.*, 2002) e com isso a habilidade da espécie em se adaptar e sobreviver face a novas circunstâncias ambientais (Frankham *et al.*, 2002; Hannesson, 2007; Mace e Purvis, 2008). Nesse cenário, não só é importante identificar e definir “o que é” um estoque para a dourada, mas também caracterizar e estimar a variabilidade genética desse recurso ao longo de sua área de distribuição e captura, na Amazônia.

4.1. Variabilidade genética em *Brachyplatystoma rousseauxii*

A região controle (DNAmt) da dourada resultou em 911 pb. Embora possa ocorrer eventos de inserção e/ou deleção (*indels*) com mais freqüência nessa essa região do DNA mitocondrial, mesmo no nível intra-especifico (Lee *et al.*, 1995), não foi observado nenhum evento dessa natureza na sequência nucleotídica dos 652 indivíduos amostrados. No entanto, esses eventos ocorrem entre indivíduos de pelo menos três espécies do gênero *Brachyplatystoma*, *B. vaillantii* (Formiga-Aquino, 2004; Rodrigues, 2009), *B. filamentosum* e *B. capapretum* (Huergo, 2009). Em face disso, é possível assumir preliminarmente, para a dourada, uma coesão e proximidade genética maior em relação às outras espécies já estudadas do gênero.

A média da frequência de bases nucleotídicas obtida (32,84% para Timina, 31,53% para Adenina, 20,33% para Citosina e 15,29% para Guanina) encontra-se dentro das proporções esperadas presente no genoma mitocondrial de peixes (Meyer, 1993; Zhang e Hewitt, 1996).

A região controle (DNAmt) tem sido o marcador molecular de sequências nucleotídicas preferencialmente utilizado na estimativa e distribuição da variabilidade genética de peixes amazônicos, entre os quais pode-se citar: *Colossoma macropomum* (Santos *et al*. 2007); *Prochilodus nigricans* (Machado, 2009), *Semaprochilodus insignis* (Batalha, 2009), *Symphysodon* spp. (Farias e Hrbek, 2008), *Nannostomus eques* (Terêncio, 2009), *Hypopygus lepturus* (Schmitt, 2005), *Brachyplatystoma vaillantii* (Formiga-Aquino, 2004; Rodrigues, 2009), *B. filamentosum, B. capapretum* (Huergo, 2009) entre outros. A diversidade genética obtida para a dourada tem valores próximos a da maioria dessas espécies (Tabela 19), principalmente com as de comportamento migratório, como a piramutaba, a piraíba, o filhote capapreta, o tambaqui, o jaraqui e o curimatã. Isso é fortemente verificado nos valores altos de diversidade haplotípica (conhecida também como diversidade gênica), que na dourada variou entre 0,993 (rio Japurá) a 0,945 (Manaus). Ainda entre as espécies migradoras (Tabela 19), a dourada apresentou níveis baixos de diversidade nucleotídica, que embora tenha variado entre 0,0079 (rio Branco) e 0,0101 (rio Içá), o valor médio (Pi=0,0089) foi maior apenas do que foi reportado para *B. capapretum*.

Baixa variabilidade genética foi observada em algumas espécies de bagres da família Pimelodidae, oriundas de outras regiões do Brasil, com o uso da região controle (DNAmt). Níveis baixos de diversidade nucleotídica (Pi= 0,0038), foram obtidos para *Zungaro jahu*, um jaú, pertencente a família Pimelodidae, oriundo da bacia Paraná-Paraguai (Boni, 2008). Essa espécie vem sendo afetada pelos represamentos e está listada como vulnerável nos estados brasileiros de Minas Gerais e Paraná (Mikich e Bérnils, 2004). É

considerada localmente extinta em vários trechos das bacias dos rios Grande e Paranaíba devido às cascatas de reservatórios nesses rios (Alves, 2006).

Baixa diversidade nucleotídica (Pi entre 0,0000 a 0,0041) também foi reportada para o bagre migrador *Pimelodus maculatus,* ao se avaliar o impacto de barragens na estrutura e variabilidade genética dessa espécie, em oito localidades do rio São Francisco (Zagonel, 2009), onde se encontram 23% da área ocupada por reservatórios no Brasil (Sato e Godinho, 2004).

Altos níveis de diversidade gênica e nucleotídica foram observados em espécies marinhas como as tainhas (Rocha-Olivares *et al.*, 2000) e atuns (*Thunnus*) (Bremer e Naseri, 1997), cujos valores foram próximos de 1,000 e entre 0,0110 a 0,0720, respectivamente.

A pescada amarela (*Cynoscion acoupa*), capturada na costa Nordeste do Brasil, apresentou baixos valores de diversidade nucleotídica (Tabela 19) e conclusões do estudo sugerem que esse resultado pode está associado à sobreexplotação (Rodrigues *et al*., 2008). Situação similar na Amazônia pode estar ocorrendo com *B. capapretum* cuja captura ocorre conjuntamente com a da piraíba há décadas, e para a qual a pesca pode ter diminuído a diversidade nucleotídica de forma mais severa (Huergo, 2009).

De uma forma geral, para a dourada, o estuário apresentou os maiores valores para a maioria dos índices de diversidade molecular (ETA, S e M_R) (Tabela 5). Estes valores, aliados ao maior número de haplótipos compartilhados (APÊNDICE C), reforça a hipótese, obtida sob o ponto de vista genético, de que o estuário, como área de criação, congrega um número representativo indivíduos nascidos em todas as cabeceiras dos tributários (Batista e Alves-Gomes, 2006) do sistema EAS. Todavia, variações nos valores de HD, K e Pi são observados entre alguns pontos da calha.

De acordo com a distribuição etária da dourada no sistema Estuário-Amazonas-Solimões (EAS), a frequência de indivíduos com mais de três anos de idade é baixa entre Tefé e a região do estuário. Esse dado, aliado às distribuições de comprimento desses indivíduos, indica que a dourada aparentemente passa a ser residente a montante da região de Tefé a partir do quarto ano de vida, ou seja, após ter desovado pelo menos uma vez.

Tabela 19. Índices de variabilidade genética estimados para a dourada (*Brachyplatystoma rousseauxii*) em relação aos obtidos em espécies de peixes amazônicos, distribuídas em quatro Ordens de peixes, estimados com a região controle (DNAmt).

Espécie	Nome popular	Ordem	N	pb	H	S	Hu	HD	Pi	Referencia
Nannostomus eques	peixe-lápis	C	68	1087	51	34	29	0,913	0,0027	Terencio (2009)
Prochilodus nigricans	curimatã	C	348	834	170	169	151	0,914	0,0162	Machado (2009)
Colossoma macropomum	tambaqui	C	45	1077	44	72	43	0,999	0,0120	Santos *et al.* (2007)
Semaprochilodus insignis	jaraqui escama grossa	C	249	1148	121	125	43	0,961	0,0119	Batalha (2009)
Serrasalmus rhombeus	pacu	C	75	963	41	-	67	0,530 a 0,990	0,0010 a 0,007	Hubert *et al.* (2007)
Plagioscion squamosissimus	Pescada	P	81	727	54	71	43	0,978	0,0163	Galletti (2009)
Cynoscion acoupa	pescada amarela	P	297	831	83	42	55	0,892	0,0030	Rodrigues *et al*. (2008)
Hypopygus lepturus	sarapó	G	135	911	48	67 a 110	33	0,348 a 0,978	0,0090 a 0,0570	Schmitt, 2005
Brachyplatystoma vaillantii	piramutaba	S	100	942	92	58	87	0,999	0,0159	Formiga-Aquino (2003)
Brachyplatystoma filamentosum	piraíba	S	225	914	130	68	96	0,987	0,0118	Huergo (2009)
Brachyplatystoma capapretum	filhote capapreta	S	112	913	53	34	40	0,951	0,0041	Huergo (2009)
Brachyplatystoma rousseauxii	dourada	S	45	1037*	31	54	27	0,886 a 1,000	0,0064 a 0,0095	Batista e Alves-Gomes (2006)
Brachyplatystoma rousseauxii	dourada	S	652	911	301	134	240	0,979	0,0089	presente estudo

N: número de indivíduos analisados; PB: pares de bases; S: número de sítios polimórficos; Hu: número de haplótipos únicos; HD: diversidade haplotípica e Pi: diversidade nucleotídica. C - Characiformes; P - Perciformes; G –Gymnotiformes e S – Siluriformes.
* Número de pares de bases resultante do somatório de 12 bp da sequencia nucleotidica tRNA treonina, 70 pb do tRNA da prolina, a completa sequência da região controle (911 pb) e 44 pb da sequencia parcial do tRNA da fenilalanina.

A presença de adultos no baixo Amazonas pode corresponder àqueles oriundos de afluentes próximos a essa região. O estudo indica ainda que indivíduos maiores de que três anos, observados em Santarém e Manaus, podem estar retornando do rio Madeira (Alonso, 2002). A partir dos dados do presente estudo, os rios Tapajós e Branco também podem ser fonte de douradas maiores nesta região. Esses resultados reforçam a idéia de que indivíduos adultos dessa espécie podem não retornar ao estuário em um próximo ciclo migratório e sim à região entre o alto Amazonas e baixo Solimões, área preferencial de alimentação (Barthem e Goulding, 1997; Barthem e Goulding, 2007; Leite *et al.*, 2007), e justificar o aumento nos níveis de variabilidade genética encontrados em Tefé (HD, K e Pi), Tabatinga (%Hu), Iquitos (HD) e Pucallpa (K e Pi) (Tabela 5).

Foram encontrados 240 haplótipos únicos entre os 301 haplótipos obtidos nos 652 indivíduos amostrados (APÊNDICE C). A maior parte dos haplótipos únicos (55%) foi encontrada nos tributários enquanto que 45% foram observados na calha principal do EAS. Interessantemente, os tributários da margem esquerda (rios Branco, Japurá e Içá), reuniram o maior percentual de haplótipos únicos (31,25%), encontrados em 138 indivíduos amostrados, enquanto que os tributários/localidades da margem direita (Porto Maldonado, rio Madeira e rios Purus e Juruá) os menores (24,58%), em 184 exemplares amostrados. Além dos indivíduos do rio Branco terem apresentado o menor valor de média da distância genética (Tabela 7), também foi observado nesse tributário o maior número de haplótipos únicos. No rio Japurá foi observado o maior valor da diversidade haplotípica (HD), e juntamente com o rio Içá, o da razão entre o número de haplótipos e o tamanho amostral (H/N=0,9). No rio Iça, além do maior valor de diversidade nucleotídica (Pi=0,0101), também foi verificado o maior valor das médias de diferenças nucleotídicas par a par (K=9,210) (Tabela 5) e maior distância genética média (1,17±0,49%) (Tabela 7). Esses resultados mostram que os tributários da margem esquerda, excetuando-se o rio Branco, apresentaram uma maior variabilidade genética comparado com os da margem direita. A baixa variabilidade do rio Branco em relação aos outros rios da margem esquerda pode ser o resultado do fato de que a dourada (e os bagres migradores em geral) têm o seu ciclo de vida geralmente associado aos rios de água branca do sistema EAS (Goulding et al., 2003; Barthem e Goulding, 2007) e para encontrar a foz do rio Branco, a dourada precisa viajar por cerca de 700 Km ao longo do rio Negro. Não é comum a ocorrência de dourada no médio e alto rio Negro, corroborando a associação da espécie a rios de água branca e o trecho do rio Negro entre a foz do rio Branco e o encontro com o rio Solimões, em frente a Manaus, pode estar funcionando como uma espécie de “filtro” da diversidade genética. Quando as douradas, a partir do baixo rio Amazonas migram rio acima buscando as cabeceiras para desovar, é provável que um percentual pequeno “erre” o caminho e entre no rio Negro ao invés de seguir no rio Solimões. Ao longo do rio Negro, o primeiro (e um dos

únicos) afluente de águas claras/brancas é rio Branco. Nestas condições, a baixa variabilidade do rio Branco seria uma consequência do baixo número de douradas (em relação aos outros afluentes da margem esquerda) que estariam se direcionando a este tributário e não como consequência restrita de *homing* ou filopatria.

Diferenças na composição química da água já foram apontadas como responsáveis pelo padrão filogeográfico observado em peixes dos gêneros *Symphysodon (*Farias e Hbrek, 2008) e *Cichla* (Willis *et al.*, 2007) em diferentes rios da bacia amazônica. Contudo, ainda é prematuro expandir esta possibilidade para a dourada. Em função de registros fósseis de Siluriformes na Amazônia (Lundberg, 2005) é razoável de estimar que a dourada, como espécie, tenha se diferenciado há cerca de 13 milhões de anos, quando a bacia tinha um desenho muito diferente do atual. É provável que o movimento migratório desta espécie tenha tido que se moldar às transformações geomorfológicas da Amazônia, incluindo o soerguimento dos Andes e mudanças radicais na direção do fluxo da correnteza dos rios (Lundberg *et al.*, 1998).

A maioria dos testes de seletividade neutra (Fu 1997, Tajima 1989b e outros) geralmente é significativa em espécies com expansão populacional recente, por assumirem que a população é estável e ocorre sempre quando apresenta altos valores de *Nm* (geralmente quando *Nm* > 20) (Ray *et al.*, 2003; Excoffier *et al.*, 2009). Os valores negativos e significativos de *Fs* (Fu, 1997) observados em todas as localidades amostradas, os valores baixos de Hri (Tabela 5), aliados ao padrão unimodal de distribuição das diferenças nucleotidicas par a par (*mismatch distribution*) obtido (Figura 3), indicam expansão populacional recente para a dourada. O número acentuado de haplótipos únicos (APÊNDICE C, Tabela 6) e os altos valores de *Nm* (Tabela 8) reforçam esse resultado. Os valores negativos de *D* (Tajima, 1989) e não significativos mostraram equilíbrio genético com relação ao DNA mitocondrial. Expansão populacional tem ocorrido na história da maioria das espécies e em alguns casos de forma dinâmica, com eventos de contração e re-expansão (Taberlet e Cheddadi, 2002; Excoffier *et al.*, 2009). A maioria dos casos de expansão populacional é mais em função da heterogeneidade espacial de que pelas mudanças temporais no ambiente (Wegmann *et al.*, 2006). Sendo assim, eventos históricos e geomorfológicos podem explicar melhor esse cenário para as espécies de peixes amazônicas de que as oscilações anuais do nível dos rios. Com exceção do tambaqui (Santos *et al.,* 2007), expansão populacional foi observada nos estudos envolvendo as espécies de peixes amazônicos que constam na Tabela 19, de acordo com os valores obtidos para o teste de *Fs*.

Todos os oito locos microssatélites foram variáveis em exemplares de *B. rousseauxii* nas 13 localidades amostradas (Tabela 10 e 12). O grau de polimorfismo obtido, tais como número total de alelos, foi igual a 98, com uma média de 12,3 alelos por loco, a

heterozigosidade esperada (H_e) variou entre 0,354 (BR41) e 0,827 (BR45), com uma média de 0,607 por loco e heterozigosidade observada (H_o) variando entre 0,346 (BR7) e 0,809 (BR45), apresentando uma média de 0,588 por loco. Estes números se alinham aos níveis encontrados em outras espécies de peixes, a partir de um estudo utilizando 524 locos microssatélites, em aproximadamente 40.000 indivíduos, distribuídos em 78 espécies, incluindo espécies de peixes de água doce (13), anádromas (sete) e marinhas (12) (DeWoody e Avise, 2000). O estudo citado mostra ainda que os peixes de água doce apresentaram níveis de variação genética (média de H_e = 0,46 e número médio de alelos por loco = 7,5) menores de que aos encontrados em peixes marinhos (média de H_e = 0,79 e número médio de alelos por loco = 20,6) enquanto que valores intermediários foram observados em peixes anádromos (média de H_e = 0,68 e número médio de alelos por loco =11,3). Os níveis de variação genética obtida para a dourada foram aproximados aos obtidos para os peixes anádromos. Esses resultados são de certa forma esperados em função do ciclo de vida da dourada apresentar características parecidas aos de peixes anádromos, que também são peixes migradores.

Os índices de variabilidade genética obtidos para a dourada (H_e, H_o, A_R) (Tabela 13) são comparáveis aos observados em outras sete espécies distribuídas em três Ordens (Characifomes, Osteoglossiformes e Siluriformes) listadas na Tabela 20.

Os valores da riqueza alélica (A_R) foram aproximados ao obtido para o pirarucu *Arapaima gigas* (Leão, 2009), amostrado em 20 localidades da bacia amazônica e na bacia do Tocantins/Araguaia, e com grande pressão da pesca em seus estoques. Os níveis de heterozigosidade observada (H_o) foram maiores do que os obtidos para o pirarucu (Leão, 2009), *Brycon hilarii (*Sanches, 2007*) e Prochilodus costatus* (Carvalho-Costa *et al*., 2008).

Valores homogêneos foram observados para a heterozigosidade observada (ANOVA: F= 0,2426; P=0,9954 e Figura 5) nas 13 localidades amostradas. Os indivíduos do rio Madeira revelaram o maior número de alelos totais (A_T=62) e, por conseguinte, a maior riqueza alélica (A_R=7,75) (Tabela 12) que é equiparada a obtida para algumas espécies de peixes de água doce (DeWood e Avise, 2000). Os menores valores para esses índices foram observados nos indivíduos do rio Juruá (A_T =46 e A_R=5,75).

Tabela 20. Índices de variabilidade genética, obtidos com marcadores moleculares microssatélites, em algumas espécies de peixes distribuídas em três Ordens, e comparados aos obtidos para a dourada (*Brachyplatystoma rousseauxii*) no presente estudo.

Espécie	Ordem	nome popular	N	Nº de locais	Região	Nº de locos	A_R	H_O	H_E	Referência
Paracheirodon axelrodi	*C*	cardinal	294	11	bacia do rio Negro	6	7,7	0,66	0,73	D'Assunção (2006)
Symphysodon spp	*C*	Acará-disco	336	24	Amazônia	11	13	0,40 - 0,50	0 a 1,0	Amado (2008)
Brycon hilarii	*C*	piraputanga	180	4	Rio Miranda	7	8,1	0,57	0,67	Sanches (2007)
Prochilodus costatus	*C*	curimbatá - pióa	57	3	bacia do São Francisco e rio Abaeté	6	7,6	0,45	0,66	Carvalho-Costa (2008)
Arapaima gigas	*O*	pirarucu	436	20	Amazônia e Tocantins/ Araguaia	11	12,4	0,50	0,65	Leão (2009)
Pseudoplatystoma corruscans	*S*	pintado	223	6	Bacia do Paraná-Paraguai	7	15,3	0,73 a 0,92	0,31 a 0,94	Pereira *et al.*(2008)
Brachyplatystoma vaillantii	*S*	piramutaba	161	4	Amazônia	6	9,2	0,78	0,75	Rodrigues (2009)
Brachyplatystoma rousseauxii	*S*	dourada	483	13	Amazônia	8	11,3	0,59	0,61	Presente estudo

N: númereo de indivíduos genotipados; A_R: riqueza alélica (média do número de alelos/loco); H_O: Heterozigosidade observada e H_E: Heterozigosidade esperada.
C - Characiformes , O – Osteoglossiformes e S – Siluriformes

Entre os 98 alelos encontrados, 19 (19,4 %) foram exclusivos (encontrados apenas em uma localidade) e encontrados em sete das 13 localidades estudadas (Tabela 11). No rio Madeira foi observado o maior número (seis dos 19 encontrados) totalizando sete, se somarmos ao único alelo exclusivo que ocorreu em Porto Maldonado, localidade situada no mesmo sistema/tributário. O número de alelos observados por loco aumenta em função do tamanho da amostra e, com isso, aumenta também as chances de se detectar alelos exclusivos (Weir, 1996). O número desses alelos é uma estimativa indireta de fluxo gênico (baseado nos valores de *Nm*), que quanto mais baixo, mais alelos desse tipo surgem por mutação em uma população (Slatkin, 1985; Allendorf e Luikart, 2007).

A baixa freqüência de alelos exclusivos, o fato dos mesmos não terem sido observados em todas as localidades amostradas e as altas taxas de fluxo gênico estimadas entre as localidades, parecem refletir e reforçar a existência do intenso comportamento migratório da dourada na Amazônia.

Níveis altos de diversidade genética encontrados em populações naturais, assim como para a dourada a partir do resultado da maioria dos índices, também podem ser resultantes de um grande tamanho populacional, heterogeneidade ambiental e aspectos da história natural de uma espécie (Nei, 1987).

De uma forma geral, os resultados de variabilidade genética, obtidos tanto com a região controle (DNAmt) quanto para os microssatélites, refletem importância não somente da calha principal (EAS) mais também dos tributários do rio Solimões/Amazonas na manutenção da variabilidade genética e do ciclo de vida da dourada na Amazônia.

4.2. Identificação de estoque em *Brachyplatystoma rousseauxii* na Amazônia brasileira e peruana

O resultado da AMOVA obtido com a região controle (DNAmt) (Tabela 6) mostrou diferenciação genética significativa, porém em níveis reduzidos, em basicamente dois grupos de localidades: um envolvendo localidades da calha (Eixo EAS) e outro formado pelas localidades do rio Tapajós, rio Madeira, Porto Maldonado e rio Japurá. Diferenciação genética significativa foi encontrada somente entre o rio Madeira e rio Japurá após a correção de Bonferroni (F_{ST} = 0,013; P < 0,008) e uma porcentagem reduzida (entre 0,51 a 2,81%) da variabilidade total foi encontrada entre as localidades (análise 4, Tabela 6). Mais do que 97% da diferenciação genética foi devido a diferenças entre os indivíduos dentro das localidades. O resultado da AMOVA realizada com os oito locos microssatélites mostrou ausência de diferenciação genética entre as localidades (Tabela 15). Nessa análise foi observado que 0,04% da variabilidade genética se encontra entre as localidades e 99,96% entre todos os indivíduos amostrados.

Ainda que os resultados entre microssatélites e DNAmt sejam aproximados, é possível que pequenas diferenças estejam associadas aos modos de herança distintos destes marcadores. Os microssatélites possuem herança bi-parental, o que resulta em movimentos migratórios mais difundidos ao longo das gerações após cada ciclo reprodutivo. O DNA mitocondrial possui herança uni-parental (materna), a partir do qual se estima um menor tamanho efetivo, permitindo que a migração seja menos difundida em seus descendentes (Prugnolle e Meeus, 2002). Com os dois marcadores moleculares não foi possível detectar correlação genética e geográfica significativa entre as localidades amostradas conforme observado com o teste de Mantel.

A existência de uma única população, a partir da obtenção de K=1 (Figura 6), foi inferida e corroborada com a análise Bayesiana realizada com o programa STRUCTURE (Pritchard *et al.*, 2000).

A dourada é uma espécie que realiza extensa migração, provavelmente a maior registrada para peixes da América do Sul, em que quase 20.000 Km de rios de águas brancas podem ser incluídos em sua área de vida, favorecendo a migração de cardumes rio acima e sua dispersão nos diferentes tributários (Barthem e Goulding, 1997). Nesse sentido, a migração é um conceito fundamental a ser considerado. Esse termo indica os movimentos direcionados e em massa de indivíduos de uma espécie, a procura de um ambiente adequado para continuar a sua existência (Begon *et al.*, 2007).

As populações podem ser diferenciadas, sob o ponto de vista genético, quando o número de indivíduos migrantes (*Nm*), um estimador de fluxo gênico, assumir valores menores de que um, ao passo que as mesmas podem ser consideradas como uma única unidade populacional panmítica quando a estimativa de *Nm* assumir valores maiores de que quatro (Kimura e Maruyama, 1971). Nesse estudo as estimativas dos valores das taxas de migração por geração (*Nm*), estimadas entre as localidades amostradas, tanto com a região controle quanto com os microssatélites, foram maiores de que quatro (Tabelas 8 e 17, respectivamente), indicando fortes eventos de migração e/ou mistura, por conseguinte, fluxo gênico entre os indivíduos de *B. rousseauxii.*

Uma questão chave para a aplicação de métodos genéticos no manejo pesqueiro é verificar se dada espécie possui populações diferenciadas, pois caso seja, o manejo pesqueiro deverá ser exercido de forma separada (Waples *et al.*, 2008), pois estaríamos diante de unidades de manejo diferenciadas. Em geral, o sucesso evolutivo de uma espécie é maximizado com a manutenção da diversidade adaptativa, voltada a preservar cópias de genes funcionais divergentes na área geográfica de distribuição. Nesse sentido, é importante considerar conjuntamente aspectos genéticos e ecológicos, com ênfase no fluxo gênico (com intercâmbio ecológico) ao invés de ser considerada apenas a distinção genética. A idéia central do intercâmbio ecológico é que os indivíduos podem ser movidos

entre populações e possam ocupar o mesmo nicho ecológico (Crandall *et al.*, 2000). Essa abordagem de unidade de manejo/conservação reforça o conceito de “estoque) compilado e considerado nesse estudo.

A hipótese migratória da dourada na Amazônia foi primeiramente postulada por (Barthem e Goulding, 1997), a partir de dados morfométricos e merísticos, obtidos de uma amostram de 22.000 exemplares de dourada, coletados entre 1976 e 1995 em várias localidades do rio Amazonas (estuário, Santárem, Manaus e Tefé no Brasil e Letícia na Colômbia), médio e alto rio Madeira, rio Purus e rio Juruá. Os resultados obtidos no estudo sugerem que essa espécie é composta por um único estoque pesqueiro.

Um outro estudo, envolvendo 5699 exemplares de dourada coletados entre os anos de 1998 e 1999, foi realizado para verificar o padrão espaço-temporal da estrutura populacional e o estado da explotação pesqueira dessa espécie em sete localidades (estuário, Santárem, Manaus e Tefé no Brasil, Letícia na Colômbia e Iquitos no Peru). A partir de dados morfométricos e merísticos, que incluem a distribuição etária e de comprimento, foi também sugerida a existência de um único estoque pesqueiro da dourada ao longo do sistema EAS (Alonso, 2002).

Utilizando a região controle (DNAmt) como marcador molecular, a dourada foi pioneiramente estudada, sobre o ponto de vista genético, em uma amostragem (N=45) realizada entre os anos de 1998 a 2000 oriunda de três localidades do Sistema EAS (Estuário, Manaus e Tabatinga). A hipótese migratória com a existência de uma única população fora corroborada pela primeira vez sobre o ponto de vista genético (Batista, 2001; Alves-Gomes, 2006).

A partir de um estudo que utilizou o mesmo marcador molecular em exemplares amostrados em duas localidades ao longo do rio Branco (Boa Vista e Caracaraí) foi sugerido que a dourada compõe uma única população na bacia desse rio (Briglia-Ferrreira, 2007).

Considerando que a caracterização e estimativa da variabilidade genética de uma população que possui ampla distribuição, incluindo diferentes rios, indicam a intensidade do fluxo gênico entre as localidades em que a mesma ocorre (Hilsdorf *et al*., 2006), o presente estudo foi realizado no intuito de complementar os anteriores para esta espécie, bem como de testar a utilidade de um marcador molecular de descendência biparental nestas estimativas de diferenciação intra-específica. Além de englobar uma amostragem maior (envolvendo 700 exemplares, Tabela 1) e ampliar o número de localidades amostradas (de três para 15, Figura 1), a comparação entre marcadores pode fornecer dados mais robustos sobre o status desta espécie na Amazônia.

Portanto, a análise conjunta dos resultados das taxas de fluxo gênico (Tabelas 8 e 17), valores de F_{ST} (Tabela 14), os resultados da AMOVA (Tabelas 6 e 15), da correlação entre distância genética e geográfica (teste de Mantel, realizados com a região

controle/DNAmt e microssatélites), da distribuição de haplótipos (APÊNDICE C), da distância genética média (Tabela 7) (região controle), e da analise Bayesiana com o programa STRUCTURE (microssatélites) (Figura 6) aponta para um cenário de panmixia em que a dourada é composta por um único estoque genético que se distribui (e migra) ao longo da Amazônia brasileira e peruana. Esse cenário corrobora os estudos anteriormente realizados para a dourada, com outros tipos de ferramentas como os dados morfométricos e merísticos (Alonso, 2002; Barthem e Goulding, 1997) bem como com a primeira abordagem genética, utilizando a região controle (DNAmt) como marcador molecular, em indivíduos coletados na calha principal do rio Solimões/Amazonas (Batista, 2001; Alves-Gomes, 2006).

Várias espécies de peixes amazônicos de importância comercial, para as quais foi utilizada a região controle (DNAmt), se enquadram nesse cenário de panmixia formando um único estoque, entre as quais: o tambaqui (*Colossoma macropomum*) amostrado em cinco localidades do eixo EAS (Santos et al. 2007), a pescada (*Plagioscion squamosissimus*) amostrada em cinco localidades da bacia amazônica (Galletti, 2009) e a pescada amarela (*Cynoscion acoupa*) oriunda das regiões costeiras do Pará e Amapá (Rodrigues *et al.* 2008).

A piramutaba (*Brachyplatystoma vaillantii*), um bagre migrador de valor comercial e em sobrepesca, do mesmo gênero ao qual pertence a dourada, também compõe uma única população panmítica no eixo EAS, inferido com a região controle como marcador molecular (Formiga-Aquino, 2004). Esse resultado foi corroborado, a partir de uma amostragem envolvendo duas localidades do eixo EAS (Manaus e Tefé) e dois tributários (rio Japurá e Madeira) utilizando seis locos microssatélites e a região controle (Rodrigues, 2009).

Ausência de estrutura genética também foi observada em *Pangasianodon hypophthalmus* e *Pangasius bocourti*, duas espécies de bagres migradores amostrados em seis localidades do rio Mekong na Cambódia (Ásia), a partir de um estudo com PCR-RFLP do DNA mitocondrial (So *et al*., 2006).

Prochilodus costatus (curimbatá-pióa), um peixe migrador amostrado em três localidades do médio-alto rio São Francisco no estado de Minas Gerais, compõem uma única população panmítica a partir de um estudo com seis microssatélites (Carvalho-Costa et al., 2008).

Diferenciação populacional foi encontrada para o jaraqui (*Semaprochilodus insignis*), um peixe migrador de importância comercial, mas entre exemplares das bacias amazônica e do orinoco, utilizando a região controle (DNAmt). Todavia, essa espécie compreende um único estoque na região amazônica ao analisar exemplares oriundos de 10 localidades (Batalha, 2009).

Utilizando o mesmo marcador molecular, a presença de estoques geneticamente distintos foi reportada para o curimatã (*Prochilodus nigricans*) envolvendo localidades dos rios Tapajós, Xingu e alto Madeira (Machado, 2009).

Por outro lado, diferentemente das outras espécies do gênero *Brachyplatystoma*, a piraíba *(Brachyplatystoma filamentosum),* outro bagre migrador de importância comercial, apresenta fortes indícios de compreender três estoques geneticamente distintos (resultados também da região controle do DNAmt), sendo cada estoque relacionado a cada tipo água (branca, preta e clara) (Huergo, 2009).

Combinando dados de genes mitocondriais (ND1 e ATP6 e 8) com marcadores microssatélites (14 locos), foi observado intenso fluxo gênico entre as localidades onde foram coletados exemplares de pirarucu (*Arapaima gigas*), porém o efeito de isolamento, com fluxo gênico significantemente restrito à distâncias maiores que 2.500 Km, foi observado somente com os locos microssatélites. Um sistema de manejo diferenciado, respeitando a estruturação genética encontrada nas três macrorregiões analisadas (Amazônia ocidental, Amazônia central e Amazônia oriental) foi sugerido para esta espécie (Hrbek et al., 2007; Leão, 2009).

Altos níveis de estrutura genética foram reportados em quatro espécies de importância comercial no mercado de peixes ornamentais amostradas em diferentes regiões da Amazônia: o peixe lápis (*Nannostomus eques) (Terencio, 2009)* e o peixe borboleta *(Carnegiella strigata)* (Schneider, 2007)*,* utilizando a região controle (DNAmt) e os genes ATPase 8/6 (DNAmt), respectivamente, o cardinal (*Paracheirodon axelrodi*) (d' Assunção, 2007) e o acará-disco (espécies do gênero *Symphysodon* spp.) (Amadio, 2008), ambos utilizando locos microssatélites.

Grande parte dos estudos envolvendo peixes amazônicos enquadrados em um cenário de panmixia (formam uma única população) relaciona essa ausência de estruturação genética ao sistema de várzea na Amazônia, que em épocas de cheia produzem conexões que favorecem o fluxo gênico entre os indivíduos de diferentes localidades.

4.3. A questão do *homing*/filopatria em *Brachyplatystoma rousseauxii*

Batista e Alves-Gomes (2006) originalmente levantaram a hipótese de *homing* em *B. rousseauxii* como uma forma de interpretar o decréscimo significativo na diferenciação genética entre indivíduos coletados na região do estuário e em Tabatinga. Esta mesma tendência foi verificada neste estudo, mas a inclusão de um número maior de localidades amostradas bem como de indivíduos coletados, não corroboram o cenário de filopatria.

A análise conjunta dos resultados dos diferentes marcadores (região controle e microssatélites) juntamente com a análise de simulação (Tabelas 9 e 18) indica que as populações de dourada não podem ser diferenciadas em função dos afluentes e,

consequentemente, não pode ser caracterizada como apresentando comportamento filopátrico. A alternativa para este cenário é a escolha aleatória do rio para desovar.

Se por um lado os resultados aqui obtidos não permitem a caracterização de *homing* para a dourada, por outro lado não é possível desconsiderar alguns sinais e tendências de estruturação genética obtidas. A Tabela 6 demonstra que há estrutura genética quando alguns tributários são incluídos/excluídos das análises de AMOVA com os dados da região controle (Tabela 6). A Tabela 8 mostra fluxo gênico reduzido entre vários dos rios amostrados. Ainda que para o rio Tapajós os resultados provavelmente sejam enviesados em função do tamanho amostral reduzido, há valores baixos associados com os rios Içá, Juruá e Madeira**.** Estas tendências, ainda que não sejam fortes o suficiente, parecem apontar para duas possibilidades: 1) ainda que a dourada não possua um comportamento de *homing* conspícuo ou de fácil observação, é provável que uma parte das douradas nascidas em um determinado tributário eventualmente voltem (ou pelo menos tentem voltar) para este mesmo tributário para desovar. Contudo, o percentual de sucesso nesta jornada é variado e isso se reflete na homogenização genética encontrada. Contudo, se a escolha do tributário fosse totalmente aleatória, nenhum tipo de diferença significativa (entre Estuário e Tabatinga, ou entre Madeira e Japurá, por exemplo) ou estrutura na AMOVA deveriam ser detectadas. É bem provável que a migração de desova da dourada seja um *homing* parcial, sendo que ainda não se pode estimar o percentual de indivíduos que conseguem chegar aos seus respectivos tributários de nascimento. 2) O ciclo de vida da dourada é mais complexo do que o inicialmente postulado e ainda não está completamente esclarecido. A escolha do tributário para a desova, a influência de variáveis climáticas e das características fisico-químicas das águas neste processo, o local de permanência dos indivíduos adultos na Amazônia, o número de desovas que cada fêmea é capaz de realizar ao longo da vida, são somente alguns dos aspectos ainda a serem elucidados.

Straying é o termo usado para caracterizar a migração de indivíduos para desovar em um rio onde eles não nasceram. Em situações não filopátricas, o peixe tende a entrar em um rio com características físico-químicas (captadas sensorialmente) parecidas com as do rio onde nasceu (Pascual e Quinn, 1994), e possui a probabilidade maior de escolher o local específico de desova em um afluente a montante do rio de origem (Quinn, 1991). Isso também pode está ocorrendo com a dourada, uma vez que a maioria das cabeceiras utilizadas para a desova se encontra em rios geologicamente andinos com características físico-químicas da água semelhantes.

O comportamento filopátrico ocorre em vários organismos e diferentes métodos são utilizados para estudá-lo (Papi, 1992; Wehner *et al.*, 1996). Em peixes, esse estudo é conhecido em uma parte de espécies pertencentes à família Salmonidae, que inclui o salmão do atlântico (*Salmo salar*). Utilizando locos microssatélites, estrutura populacional foi

observada nessa espécie em sete rios da província de Quebec, Canadá (Fontaine *et al.*, 1997). Esse comportamento também foi reportado para o pintado, *Pseudoplatystoma corruscans*, uma espécie de bagre da família Pimelodidae de importância comercial, amostrado em seis rios da bacia Paraná-Paraguai, utilizando sete locos microssatélites (Pereira *et al*., 2008).

4.4. Análise de estoque relacionado (*Mixstock analyses*) em *Brachyplatystoma rousseauxii*

A partir do resultado da análise de estoque relacionado (*Mixstock analyses*), realizada tanto com a região controle quanto com os microssatélites (Figuras 2 e 7, respectivamente) foi possível estabelecer que todos os tributários e demais locais da calha contribuem aproximadamente de forma similar para o estuário e Santarém, as duas áreas de criação consideradas na análise. Com exceção do rio Purus e Tefé, que apresentaram níveis de contribuição maiores de que as demais localidades a partir da analise realizada com os microssatélites. A proporção de contribuição estimada com a região controle (DNAmt) (Figura 2) foi maior de que a estimada com os microssatélites (Figura 7), para todas as localidades consideradas na análise. Além da questão amostral, esse resultado pode ser explicado pelas mesmas razões anteriormente expostas sobre os dois marcadores. Todavia, os dois resultados indicam que existem haplótipos/genótipos encontrados nas áreas de reprodução da dourada (tributários) (APÊNDICE C) que não foram encontrados nas duas áreas de criação (estuário e Santarém).

Nem todos os indivíduos gerados nas cabeceiras voltam para a área de criação caracterizada pelo estuário e Santarém (Alonso, 2002; Alonso e Pirker, 2005; Leite *et al.*, 2007). A captura de exemplares de dourada com 24 cm já foi reportado a 40 Km de Letícia (Fabré et al., (Eds.), 2000). Há registros de um lote de indivíduos jovens de dourada, entre 15 e 25 cm, capturado na região de Iquitos e destinado a atender ao mercado internacional de peixes ornamentais. Juvenis de diferentes espécies de grandes bagres são capturados para atender o mercado de peixes ornamentais para a exportação na Bolívia (Alonso, 2002). Exemplares juvenis de dourada, classificadas de não migrantes (<40 cm), foram registrados no estuário, Manaus e em menor proporção em Tefé (Alonso e Pirker, 2005). De acordo com relatos de pescadores, juvenis não migrantes também são capturados em lagos de várzea como o Arari (em Itacoatiara) e em lagos perto de Manaus (Barros e Ribeiro, 2005) e em Tefé (Alonso, 2002; Barros e Ribeiro, 2005). Em Tefé, especificamente, ressalta-se a hipótese de que os alevinos de dourada gerados entre maio e junho no alto rio Japurá, descem e utilizam os arredores dessa região, no baixo rio Japurá, para o seu desenvolvimento (Alonso, 2002).

Esse último efeito pode ser uma explicação para a maior proporção de contribuição das localidades de Tefé, e possivelmente do rio Purus, a partir da análise com os microssatélites de estoque relacionado. As amostras do rio Japurá analisada no presente estudo, são oriundas da região de Vila Bitencourt (fronteira do Brasil com a Colômbia) e do município de Japurá (AM). Ambas na porção média do rio e em um raio de 770 Km de distância até o município de Tefé. O ambiente alagável na área de desembocadura do rio Japurá no rio Solimões, forma um complexo mosaico que durante o período de cheia (em torno de junho) os lagos dessa região podem se unir (Henderson, 1999). Esse cenário propiciaria áreas de refúgio e alimentação para o desenvolvimento de jovens de dourada, e também de outras espécies oriundas do rio Japurá (Alonso, 2002).

4.5. Implicação para conservação e manejo de *Brachyplatystoma rousseauxii* na Amazônia

A conservação pode ser vista como a tentativa de proteger a diversidade genética produzida pela evolução ao longo de 3,5 bilhões de anos em nosso planeta (Eisner *et al.*, 1995).

O alvo preferencial de estratégias conservacionistas precisa ser focado na população (e se estas forem diferenciadas), especialmente as de espécies vulneráveis, sobre risco de explotação ou sobrepescadas, ao invés de focalizar a espécie propriamente dita (Hobbs e Mooney, 1998)

Um plano de conservação precisa também prever ações voltadas à proteção do habitat, pois este é fortemente relacionado à história natural e ciclo de vida de uma espécie (Agostinho *et al.*, 2005; Allendorf e Luikart, 2007). Em outras palavras, além da importância de conhecer a variabilidade genética e identificar os estoques é necessário adotar e aplicar medidas de conservação ao ambiente de distribuição geográfica. A degradação e/ou fragmentação dos ecossistemas ripários são apontadas como as principais causas da diminuição das populações explotáveis de peixes (Beverton, 1992; Agostinho *et al.*, 1994). Principalmente nos dias atuais, quando muito se vê e comenta-se sobre mudanças ambientais de origem antrópica e sobre mudanças climáticas. No caso da dourada, as cabeceiras de diferentes afluentes do Solimões/Amazonas são áreas de reprodução onde os adultos desovam e as larvas geradas são carreadas pela correnteza do rio até áreas de criação, como a região estuarina, por onde ficam até 2 a 3 anos. A partir daí uma grande parcela do estoque migra, no inicio da vazante para a Amazônia central onde ficará nesta região até estarem aptos a reproduzir e, nesse momento, iniciam a regressar às cabeceiras de algum tributário para desovar e o ciclo recomeçar. De forma que não há um único

ecossistema e país que englobe o ciclo de vida completo dessa espécie. Portanto, a conservação e manejo da dourada na Amazônia precisam incluir medidas de proteção não somente ao complexo ciclo de vida dessa espécie mais também ao ecossistema como um todo.

A compilação dos resultados do presente estudo mostrou que, de uma forma geral, todos os tributários amostrados são igualmente importantes para a manutenção da variabilidade genética do estoque da dourada, além das localidades do eixo EAS.

Uma agenda de metas para o desenvolvimento do Brasil está sendo executada pelo atual governo federal. Entre essas metas inclui a construção de hidrelétricas (UHE) em alguns rios no país, entre os quais o rio Madeira, afluente utilizado pela dourada em sua rota migratória. Existem na literatura vários registros de populações de diferentes espécies de peixes impactadas por esse tipo de empreendimento (Nielsen *et al.*, 1997; Jagera *et al.*, 2001; Knaepkens *et al.*, 2004; Sanches, 2007; Zagonel, 2009). A dourada foi um forte alvo de conflitos e polêmicas ligado à construção das UHEs do rio Madeira que se encontra em andamento. A partir da reunião de esforços da comunidade cientifica, medidas mitigadoras foram propostas e aceitas para minimizar os impactos, não somente da dourada mas também de outras espécies de peixes. Será que essas ações serão satisfatoriamente efetivadas e o suficiente para evitar algum impacto no estoque genético da dourada? Medidas de monitoramento precisam ser de fato executadas para ajudar a responder essa questão a longo prazo. Ainda que os resultados do presente estudo indiquem que não há uma população geneticamente restrita ao rio Madeira, este rio contribui substancialmente para os níveis de variabilidade genética e número de migrantes. Nas cabeceiras dos rios com hidroelétricas, as barreiras à migração podem resultar em isolamento genético e demográfico que poderá levar a redução da variabilidade genética em todo o sistema, e potencialmente comprometer o tempo de vida das populações (Wofford *et al.*, 2005). Por hora, o quadro de panmixia para a dourada, pode favorecer sua condição do ponto de vista genético, frente a um cenário de impactos que podem ser causados por esses empreendimentos. Por outro lado, o impacto sócio-econômico pode ser de grande magnitude, face à cadeia produtiva que depende e sustenta a pesca desse recurso além de outros países como a Bolívia e o Peru estarem envolvidos.

Em uma escala maior de distribuição geográfica da dourada, poucas normas específicas e ações isoladas voltadas à conservação e manejo têm sido feitas. A dourada, ao lado do tambaqui e da piramutaba, foram incluídas na lista de espécies de peixes sobreexplotadas ou ameaçadas de sobreexplotação no Brasil (MMA, 2004). Na Colômbia e no Peru existem algumas leis aplicadas à conservação e manejo da dourada e outros bagres de importância comercial (Vieira, 2005). Face a esse cenário, a partir de uma iniciativa no Brasil, do Projeto Manejo de Recursos Naturais da Várzea – ProVárzea do

IBAMA/MMA, foi elaborada a proposta de um sistema integrado para o manejo dos grandes bagres migradores – SISMI. A elaboração dessa proposta foi realizada por um conjunto de profissionais de diferentes áreas do conhecimento (ecologia, pesca, sócio-economia, conhecimento tradicional, legislação) incluindo a genética (Fabré *et al.*, 2005). Entretanto, poucas ações foram concretizadas até o momento.

A dourada é uma das duas espécies de grandes bagres, mais importante comercialmente para pesca na Amazônia como fonte de alimento, emprego, renda e como pescado beneficiado de interesse para os mercados locais e internacionais. Por essa razão, e devido aos padrões de distribuição geográfica e da natureza de seu ciclo de vida, essa espécie é capturada pela pesca comercial há décadas ao longo da bacia Amazônica em territórios políticos que inclui mais de cinco países (Barthem e Goulding, 1997; Petrere *et al.*, 2004; Parente *et al.*, 2005; IBAMA, 2008). Esse histórico de captura e explotação, resultou na sobrepesca de crescimento da dourada (Alonso, 2002). Sinais desse quadro já são percebidos pelos diferentes atores da pesca de bagres incluindo os pescadores artesanais (Barros e Ribeiro, 2005).

Diante desse cenário, é importante a elaboração de um plano de conservação e manejo integrados, bem como sua execução e monitoramento, que se fundamente em informações e atores oriundos de diferentes áreas do conhecimento (biologia pesqueira, pesca, ecológicas e genéticas, sócio-economia, geografia, conhecimento tradicional e outras) e dos diferentes segmentos da cadeia produtiva, envolvendo também tomadores de decisões pertencentes aos Estados e Países Amazônicos que explotam esse recurso (Isaac *et al.*, 1996; Barthem e Goulding, 1997; Ruffino *et al.*, 2000; Alonso, 2002; Fabré *et al.*, 2005). Todos os atores envolvidos precisam fornecer sua parcela de contribuição e comprometimento. Esse quadro é emergencial , uma vez que a sobrepesca afeta as populações humanas de todos os países envolvidos, além de interferir na interligação ecológica (por exemplo, reprodução e cadeia alimentar) existente nessa grande área geográfica.

A área da genética, com o presente estudo, fornece importantes subsídios para conservação e manejo da dourada na Amazônia. Entre as principais contribuições incluem: i) que uma ou mais regiões, além do estuário e Santarém, estão sendo utilizadas pela dourada como área de criação e ii) a dourada pode ser considerada, para fins de manejo, como um único estoque genético que sazonalmente migra em uma ampla área de distribuição na Amazônia.

5. CONCLUSÕES GERAIS

- Os 36 locos microssatélites isolados e caracterizados foram eficientes na detecção da variabilidade genética de *B. rousseauxii* (Capitulo I);
- A amplificação heteróloga dos 36 locos microssatélites resultou em 18 locos amplificados em todas as seis espécies do gênero *Brachyplatystoma*. O número de locos amplificados variou entre 22 em *B. tigrinum* e 35 em *B. capapretum* e o número de locos polimórficos variou entre 15 em *B. tigrinum* a 27 em *B. filamentosum* (Capitulo I);
- Os marcadores microssatélites obtidos poderão ser utilizados em estudos genéticos que poderão não só subsidiar políticas de conservação e manejo da dourada, mas também das demais espécies comerciais do gênero *Brachyplatystoma* (Capitulo I);
- A partir da caracterização genética, realizada tanto com a região controle (DNAmt) (911bp; N=652; 15 localidades) quanto para os microssatélites (oito locos; N=483; 13 localidades), foi possível estimar a variabilidade genética da espécie que se mostrou compatíveis aos níveis estimados em outras espécies de peixes (Capitulo II);
- Altas taxas de fluxo gênico foram estimadas para a dourada entre as localidades amostradas. Não foi observada correlação entre a distância genética e geográfica (Capitulo II);
- A análise com a região controle (DNAmt) permitiu verificar que a localidade do estuário apresentou os maiores níveis de variabilidade genética, aparentemente em função de reunir os indivíduos gerados em diferentes afluentes do Solimões/Amazonas (Capitulo II);
- Os resultados obtidos não permitem a confirmação do comportamento de *homing* (filopátrico) em dourada. Porém, algumas tendências de estruturação genética encontradas não permitem o descarte completo da hipótese de um percentual da população (maior do que o previsto por chance somente) conseguir voltar aos respectivos tributários de origem, para desova (Capitulo II);
- Todos os tributários amostrados são igualmente importantes na composição e manutenção da variabilidade genética da dourada (Capitulo II);
- Uma ou mais áreas/regiões podem está servindo como área de criação para a dourada, além do estuário e Santárem;
- A dourada compõe uma única população panmítica, distribuída na Amazônia brasileira e peruana, podendo ser considerada como um único estoque para fins de manejo e conservação, corroborando outros estudos envolvendo dados morfométricos e merísticos (Capitulo II).

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Agostinho, A.A.; Júlio JR, H.F.; Petrere JR, M. 1994. Itaipu reservoir (Brazil): impacts of the impoundment on the fish fauna and fisheries. *In*: Cowx, I.G., (Ed.), *Rehabilitation of freshwater fisheries.* Oxford: Fishing News Books. Osney Mead,. pp. 13.

Agostinho, A.A.; Thomaz, S.M.; Gomes, L.C. 2005. Conservação da biodiversidade em águas continentais do Brasil. *Megadiversidade*, 1: 9.

Allendorf, F.; Ryman, N.; Utter, F. 1987. Genetics and Fishery Management: Past, Present, and Future. *In*: Ryman, N.; Utter, F., (Eds.), *Population Genetics and Fishery Management*. Universidade de Washington. Washington. pp. 18.

Allendorf, F.W.; Luikart, G. 2007. *Conservation and the genetics of populations.* Blackwell. Malden (MA)

Alonso, J.C. 1998. *Pesca e esforço de pesca dos grandes bagres (Siluriformes-Pimelodidae) em um setor colombiano do Alto Amazonas*. Dissertação de Mestrado, BADPI, UFAM/INPA, 78 pp.

Alonso, J.C. 2002. *Padrão espaço temporal da estrutura populacional e estado atual da exploração pesqueira da dourada Brachyplatystoma flavicans, Castelnau, 1855 (Siluriformes: Pimelodidae), no sistema Estuário-Amazonas-Solimões*. INPA/UFAM, Manaus,

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., (Eds.), *O manejo da pesca dos grandes bagres migradores: piramutaba e dourada no eixo Solimões-Amazonas*. IBAMA/Pro Várzea, Coleção Estudos Estratégicos. Manaus. pp. 21-28.

Alves-Gomes, J.A. 1998. The phylogenetic position of the South American electric fish genera *Sternopygus* ans *Archolaeumus* (Ostariophysi; Gymnotiformes) according to 12S and 16S mitochondrial DNA sequences. *In*: L. R. Malabarba, R.E.R., R. P. Vari, Z. M. Lucena And C. A. S. Lucena (Ed.), *Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes*. Porto Alegre. pp. 447-460.

Alves, C.B.M. 2006. Jaú (*Zungaro jahu*): Um peixe mais ameaçado que os outros? *Boletim sociedade Brasileira de Ictiologia*: 2.

Amado, M.V. 2008. *Caracterização genética de populações do peixe ornamental acará-disco (Symphysodon spp., Cichlidae, Perciformes), Utilizando marcadores microssatélites.* Doutorado, Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas, Universidade Federal do Amazonas - UFAM, Manaus, 174 pp.

Amado, M.V.; Hrbek, T.; Gravena, W.; Fantin, C.; Assunção, E.N.D.; 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 Resources*, 8: 1451-1453.

Anônimos, A. 2009. PGDSpider: A program to exchange Population Genetics Data (PGD) between commonly used population genetics programs, Heidi E. L. Lischer, Laurent Excoffier. In preparation.

Aquadro, C.F.; Greenberg, B.D. 1983. Human mitochondrial DNA variation and evolution: Analysis of nucleotide sequences from seven individuals. *Genetics*, 103: 287-312.

Araujo-Lima, C.R.M.; Ruffino, M.L. 2003. Migratory Fishes of the Brasilian Amazon. *In*: Carolsfeld, J.; Harvey, B.; Ross, C.; Baer, A., (Eds.), *Migratory Fishes of South America: Biology, Fisheries and conservation Status*. IDRC & The world Bank. pp. 233-301.

Arcot, S.S.; Wang, Z.; Weber, J.L.; Deinniger, L.; Batzer, M.A. 1995. Alu repeats: A source for the genesis of primate microsatellites. *Genomics*, 29: 136-144.

Avise, J.C. 1986. Mitochondrial DNA and the evolutionary genetics of higher animals. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London, B*, 312: 325-342.

Avise, J.C. 2004. *Molecular Markers, Natural History and Evolution, second edition*. Sinauer Associates. Sunderland, MA. 541 pp.

Barbosa, R.P. 1962. Rios brasileiros com mais de 500 km de extensão. *Revista Brasileira De Geografia*, 1: 134.

Barthem, R.; Goulding, M. 1997. *Os Bagres Balizadores: Ecologia, Migração e Conservação de Peixes Amazônicos*. Sociedade Civil Mamirauá, MCT - CNPq, IPAAM. Brasilia, Brazil. 140 pp.

Barthem, R.B. 1999. A Pesca Comercial no Médio Solimões e sua Interação com a Reserva de Desenvolvimento Sustentável Mamirauá. *In*: Queiroz, H.; Cramp, L.; Willliam, G.R., (Eds.), *Estratégias para Manejo de Recursos Pesqueiros em Mamirauá*. Sociedade Civil Mamirauá/CNPq. Belém. pp. 72-107.

Barthem, R.B. 2004. O desembarque na região de Belém e a pesca na foz amazônica. *In*: Ruffino, M.L., (Ed.), *A pesca e os recursos pesqueiros na Amazônia Brasileira*. Ibama/ProVárzea. Manaus. pp. 272.

Barthem, R.B.; Goulding, M. 2007. *An unexpected ecosystem: the Amazon revealed by the fisheries. Gráfica Biblos, Lima*. Botanical Garden Press. Missouri. 241 pp.

Barthem, R.B.; Petrere Jr, M. 1995. Fisheries and population dynamics of Brachyplatystoma vailantii (Pimelodidae) in the Amazon Estuary. *Condition of the World's Aquatic Habitat. Proceedings of the World Fisheries Congress, Theme*, 1: 329-340.

Batalha, K.P. 2009. *Genética populacional do jaraqui de escama grossa (Semaprochilodus insignis - Prochilodontidae, Characiformes)*. Dissertação de Mestrado, UFAM, Manaus, 57 pp.

Batista, J.S. 2001. *Estimativa da Variabilidade intraespecífica da dourada (Brachyplatystoma flavicans) (Castelnau,1855) no eixo estuário, Amazonas-Solimões*. Dissertação de Mestrado, BADPI, INPAUFAM, Manaus, 97 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: 723-740.

Batista, J.S.; Farias, I.F.; Formiga-Aquino, K.; Sousa, A.C.B.; Alves-Gomes, J.A. 2009. DNA microsatellite markers for "dourada" (Brachyplatystoma rousseauxii, Siluriformes: Pimelodidae), a migratory catfish of utmost importance for fisheries in the Amazon: development, characterization and inter-specific amplification. *Conservation Genetics Resources*.

Bayley, P.B. 1981. Fish Yield from the Amazon in Brazil: Comparison with African River Yields and Management Possibilities. *Transactions of the American Fisheries Society*, 110: 351-359.

Begon, M.; Townsend, C., R.; Harper, J.L. 2007. *Ecologia: de indivíduos a ecossistemas*. Artmed. Porto Alegre

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

Beheregaray, L.B.; Piggott, M.; Chao, N.L.; Caccone, A. 2006. Development and characterization of microsatellite markers for the Amazonian blackwing hatchetfish, (*Carnegiella marthae*) (Teleostei, Gasteropelecidae). *Molecular Ecology Notes*, 6: 787-788.

Bentzen, P.; Olsen, J.B.; McLean, J.E.; Seamons, T.R.; Quinn, T.P. 2001. Kinship Analysis of Pacific Salmon: Insights Into Mating, Homing, and Timing of Reproduction. *J Hered*, 92: 127-136.

Beverton, R.J.H. 1992. Fish resources; threats and protection. *Netherlands Journal of Zoology*, 42: 36.

Billotte, N.; Lagoda, P.; Risterucci, A.; Baurens, F. 1999. Microsatellite-enriched libraries: applied methodology for the development of SSR markers in tropical crops. *Fruits*, 54: 277-288.

Bolker, B. 2009. *Mixed stock analysis in R: getting started with the mixstock package*.

Bolker, B.M.; Okuyama, T.; Bjorndal, K.A.; Bolten, A.B. 2007. Incorporating multiple mixed stocks in mixed stock analysis: 'many-to-many' analyses. *Molecular Ecology*, 16: 685-695.

Bone, Q.; Marshall, N.B.; Blaxter, J.H.S. 1995. *Biology of Fishes*

Boni, T.A. 2008. *Comparação molecular de populações naturais de Jaú (Zungaro) (Pisces, Siluriformes, Pimelodidae) das bacias amazônica e do Paraná-Paraguai*. Dep. de Biologia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 59 pp.

Botstein, D.; White, R.; Skolnick, M.; Davis, R. 1980. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am J Hum Genet* 32: 314-331.

Braga, T.M.P.; Fabré, N.N. 2001. *Pesca comercial de grandes bagres (Pimelodidae) na Amazônia Central: Municípios de Iranduba e Manacapuru, Amazonas*. XIV EBI.

Bremer, J.R.A.; Naseri, I.E.B. 1997. Orthodox and unorthodox phylogenetic relationships among tunas revealed by the nucleotide sequence analysis of the mitochondrial DNA control region. *Journal of fish biology*, 50: 14.

Briglia-Ferreira, S.R. 2007. *Variabilidade Genética Da Dourada (Brachyplatystoma Rousseauxii-Siluriformes:Pimelodidae), Na Bacia Do Rio Branco, Roraima, Amazônia Brasileira Boa Vista*. Dissertação de Mestrado, Programa De Pós-Graduação Em Recursos Naturais, Universidade Federal De Roraima, Roraima, 59 pp.

Brown, W.M.; Prager, E.M.; Wang, A.; Wilson, A.C. 1982. Mitochondrial DNA sequences of primates: Tempo and mode of evolution. *Journal of Molecular Evolution*, 18: 15.

Carrillo-Avila, M.; Resende, E.; Marques, D.; Galetti, P. 2009. Isolation and characterization of polymorphic microsatellites in the threatened catfish Jaú, Zungaro jahu (Siluriformes, Pimelodidae). *Conservation Genetics*, 10: 1597-1599.

Carvalho-Costa, L.F.; Hatanaka, T.; Galetti, P.M.J. 2008. Evidence of lack of population substructuring in the Brazilian freshwater fish Prochilodus costatus. *Genetics and Molecular Biology*, 31: 4.

Carvalho, G.R.; Hauser, L. 1994. Molecular genetics and the stock concept in fisheries. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 4: 326-350.

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: 10.

Council, N.R. 1996. *Upstream: salmon and society in the pacific Northwest. Washington, DC.* National academy.

Crandall, K.A.; Bininda-Emonds, O.R.P.; Mace, G.M.; Wayne, R.K. 2000. Considering evolutionary process in conservation biology. *Trends in Ecology & Evolution*, 15: 6.

D'Assunção, A.A.A. 2006. *Estudo da variabilidade genética do cardinal (Ostariophysi: Characiformes: Paracheirodon axelrodi) na bacia do rio Negro.* Mestrado, Programa de Pós-graduação em Biologia Tropical e Recursos Naturais, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia - INPA, Manaus, 67 pp.

DeWoody, J.A.; Avise, J.C. 2000. Microsatellite variation in marine, freshwater and anadromous fishes compared with other animals. *Journal of fish biology*, 56: 461-473.

Di Rienzo, A.; Peterson, A.C.; Garza, J.C.; Valdes, A.M.; Slatkin, M.; Freimer, N.B. 1994. Mutational processes of simple-sequence repeat loci in human populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91: 3166-3170.

Dittman, A.H.; Quinn, T.P.; Nevitt, G.A. 1996a. Timing of imprinting to natural and artificial odors by coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *Can. J. Fish. Aquat. Sci*, 53: 8.

Dittman, A.H.; Quinn, T.P.; Nevitt, G.A. 1996b. Timing of imprinting to natural and artificial odors by coho salmon (Oncorhynchus kisutch). *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 53: 434-442.

Earl, D.A. 2009. *Structure Harvester v0.3, from website: http://users.soe.ucsc.edu/ ~dearl/software/struct_harvest/*.

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

Eisen, J.A. 1999. Mechanistic basis for microsatellite instability. *In*: Goldstein, D.B.; Schlotterer, C., (Eds.), *Microsatellites: Evolution and Applications*. Oxford University Press. New York. pp. 34-48.

Eisner, T.; Lubchenco, J.; Wilson, E.O.; Wilcove, D.S.; Bean, M.J. 1995. Building a Scientifically Sound Policy for Protecting Endangered Species. *Science*, 269: 1231-1232.

Evanno, G.; Regnaut, S.; Goudet, J. 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software structure: a simulation study. *Molecular Ecology*, 14: 2611-2620.

Excoffier, L.; Foll, M.; Petit, R.e.J. 2009. Genetic Consequences of Range Expansions. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.*, 40: 24.

Excoffier, L.; Laval, G.; Schneider, S. 2005. Arlequin ver. 3.1: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online*, 1: 47-50.

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.

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., (Eds.), *O manejo da pesca dos grandes bagres migradores: piramutaba e dourada no eixo Solimões-Amazonas*. IBAMA. Manaus.

Fabré, N.N.; Donato, J.C.; Alonso, J.C. 2000. *Bagres de la Amazonia Colombiana: Um Recurso sin Fronteiras*. nstituto Amazónico de Investigaciones Científicas SINCHI. Bogotá

Falush, D.; Stephens, M.; Pritchard, J.K. 2003. Inference of Population Structure Using Multilocus Genotype Data: Linked Loci and Correlated Allele Frequencies. *Genetics*, 164: 1567-1587.

FAO-COPESCAL 2000. *Inform del taller regional sobre el manejo de las pesquerías de bagres migratorios del Amazonas (Iquitos - Perú)*. Page 103. Informe de campo F-5: Comisión de pesca continental para América Latina. FAO, Roma.

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

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. *Molecular Ecology Notes*, 3: 128-130.

Farias, I.P.; Muniz, L.B.; Astolfi-Filho, S.; Sampaio, I. 2006. Isolation and characterization of DNA microsatellite primers for (*Cynoscion acoupa*), the most exploited sciaenid fish along the coast of Brazil. *Molecular Ecology Notes*, 6: 660-663.

Ferguson, A.; Taggart, J.B.; Prodhol, A.; McMeel, O.; Thompson, C.; Stone, C.; McGinnity, P.; Hynes, R.A. 1995. The application of molecular markers to the study and conservation of fish population with special reference to *Salmo*. *J Fish Biol*, 47: 103-126.

Ferreira, E.J.G.; Zuanon, J.A.S.; Santos, G.M. 1998. *Peixes comerciais do médio Amazonas Região de Santarém - PA*. Brasilia

Ferreira, M.E. 2001. Técnicas e estratégias para a caracterização molecular e uso de recursos genéticos. *In*: GARAY, I.G.; DIAS, B., (Eds.), *Conservação da Biodiversidade em Ecossistemas Tropicais*. Vozes. pp. 233-267.

Ferreira, M.E.; Grattapaglia, D. 1998. *Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética*. Embrapa. Brasília

Fontaine, P.M.; Dodson, J.J.; Bernatchez, L.; Slettan, A. 1997. A genetic test of metapopulation structure in Atlantic salmon (*Salmo salar*) using microsatellites. *Can. J. Fish. Aquat. Sci*, 54: 8.

Fonteles Filho, A.A. 1989. *Recursos pesqueiros: Biologia e dinâmica populacional*. Fortaleza

Formiga-Aquino, K. 2004. *Variabilidade genética da piramutaba - Brachyplatystoma vaillantii (Velenciennes, 1840) (Siluriformes - Pimelodidae) no sistema Estuário-Amazonas-Solimões*. Mestrado, CPBA, INPA/UA, Manaus, 73 pp.

Frankham, R.; Ballou, J.R.; Briscoe, D.A. 2002. *Introduction to Conservation Genetics*. Cambridge University Press. Cambridge, England. 640 pp.

Fu, Y.X. 1997. Statistical Tests of Neutrality of Mutations Against Population Growth, Hitchhiking and Background Selection. *Genetics*, 147: 915-925.

Gaggiotti, O.E.; Lange, O.; Rassmann, K.; Gliddon, C. 1999. A comparison of two indirect methods for estimating average levels of gene flow using microsatellite data. *Molecular Ecology*, 8: 1513-1520.

Galetti, E.S. 2009. *Distribuição da variabilidade genética da pescada, Plagioscion squamosissimus (Heckel, 1840) na calha do Rio Amazonas*. Dissertação de Mestrado, INPA, Manaus, 67 pp.

Garcia, A.; Tello, S.; Vargas, G.; Duponchelle, F. 2009. Patterns of commercial fish landings in the Loreto region (Peruvian Amazon) between 1984 and 2006. *Fish Physiology and Biochemistry*, 35: 53-67.

Garcia, M. 1995. *Aspectos ecológicos dos peixes das águas abertas de um lago no Arquipélago das anavilhanas, Rio Negro, AM*. Mestrado, CPBA, INPA/UA, Manaus,

Glaubitz, J.C. 2004. convert: A user-friendly program to reformat diploid genotypic data for commonly used population genetic software packages. *Molecular Ecology Notes*, 4: 309-310.

Goldstein, D.B.; Pollock, D.D. 1997. Launching microsatellites: A Review of Mutation Processes and Methods of Phylogenetic Inference. *Journal of Heredity*, 88: 8.

Goldstein, D.B.; Schlotterer, C. 1999. *Microsatellites: Evolution and applications*. Oxford. New York

Goudet, J. 2001. *FSTAT, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices (version 2.9.3). Available from http://www.unil.ch/izea/softwares/fstat.html. Updated from Goudet (1995)*.

Goulding, M.; Barthem, R.B.; Ferreira, E. 2003. *The Smithsonian Atlas of the Amazon*. Princeton Editorial Associates. Hong Kong

Gray, M.W. 1989. Origin and Evolution of Mitochondrial DNA. *Annual Review of Cell Biology*, 5: 25-50.

Gusmão, J.; Lazoski, C.; Solé-Cava, A.M. 2000. A new species of Penaeus (Crustacea: Penaeidae) revealed by allozyme and cytochrome oxidase I analyses. *Marine Biology*, 137: 435-446.

Hall, T.A. 1999. Bio Edit: a user-friendlybiological sequence alignment editor end analysis program for windows 95/98/NT. *Nucl. Acidr. Fynp. Ser.*, 41: 95-98.

Hamada, H.; Petrino, M.G.; Kakunaga, T.; M., S.; Stollar, B.D. 1984. Characterization of genomic poly (dT-dG) ápoly (dCdA) sequences: structure, organization, and conformation. *Molecular and Cellular Biology*, 4: 2610-2621.

Hammer, Ø.; Harper, D.A.T.; Ryan, P.D. 2001. PAST: Palaeontological statistics software package for education and data analysis. *Paleontologia Electronica*, 4: 1-9.

Hannesson, R. 2007. Geographical distribution of fish catches and temperature variations in the northeast Atlantic since 1945 *Marine Policy*, 31: 7.

Harpending, H.C. 1994. Signature of ancient population growth in a low-resolution mitochondrialDNA mismatch distribution. *Hum Biol* 66: 591-600.

Hartl, D.L.; Clark, A.G. 1997. *Principles of Population Genetics*. Sinauer Associates. Sunderland, MA. 542 pp.

Hasegawa, M.; Kishino, H.; Yano, T.-a. 1985. Dating of the human-ape splitting by a molecular clock of mitochondrial DNA. *Journal of Molecular Evolution*, 22: 160-174.

Hasler, A.D.; Scholz, A.T. 1983. *Olfactory imprinting and homing in salmon*. Springer-Verlag. Berlin

Hauser, L.; Adcock, G.J.; Smoth, P.J.; Bernal Ramirez, J.H.; Carvalho, G.R. 2002. Loss of microsatellite diversity and low effective population size in an overexploited

population of New Zealand snapper (Pagrus auratus). *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99: 5.

Hijazi, N.C.; Doria, C.R.C. 2005. *Comunidade da Cachoeira de Teotônio: Produção Pesqueira e Importância Sócio-Econômica da Pesca*. XVI Encontro Brasileiro de Ictiologia - Ictiofauna Brasileira: estado atual do conhecimento, João Pessoa.

Hobbs, R.J.; Mooney, H.A. 1998. Broadening the extinction debate: population deletions and additions in California and western Australia. *Conserv. Biol.*, 12: 271-283.

Hoelzel, A. 1998. Genetic structure of cetacean populations in sympatry, parapatry, and mixed assemblages: implications for conservation policy. *J Hered*, 89: 451-458.

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

Hubert, N.; Duponchelle, F.; Nuñez, J.; Rivera, R.; Bonhomme, F.; Renno, J.-F. 2007. Isolation by distance and Pleistocene expansion of the lowland populations of the white piranha *Serrasalmus rhombeus*. *Molecular Ecology*, 16: 2488-2503.

Huergo, G.M. 2009. *Estimativa da diversidade genética da piraíba (Brachyplatystoma filamentosum Lichtenstein, 1919) e da piraíba negra (B. capapretum Lundberg & Akama, 2005), na Amazônia brasileira, inferidas através de DNA mitocondrial: subsídio para manejo e conservação.* Tese de Doutorado, BADPI, INPA, Manaus, 114 pp.

IBAMA 1999. *Reunião do grupo permanente de estudos sobre a piramutaba*. Page 92. Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais renováveis, Centro de pesquisa e Extensão Pesqueira do Norte do Brasil, Brasília.

IBAMA 2002. *Estatística pesqueira do Amazonas e Pará - 2001*. Page 73. Ibama; ProVárzea, Manaus.

IBAMA 2008. *Estatística da pesca 2006 Brasil: grandes regiões e unidades da federação*. Page 174. IBAMA, Brasília.

IBGE 1992. *Anuário Estatístico do Brasil*. Pages 1-1119, Rio de Janeiro.

Imsiridou, A.; Hardy, H.; Maudling, N.; Amoutzias, G.; Zaldivar Comenges, J.-M. 2003. Web Database of Molecular Genetic Data From Fish Stocks. *J Hered*, 94: 265-267.

Isaac, V.J.; Milstein, A.; Ruffino, M.L. 1996. A pesca arsenal no Baixo Amazonas: análise multivariada da captura por espécies. *Acta Amazônica*, 26: 33.

Isaac, V.J.; Ruffino, M.L.; Melo, P. 2000. *Considerações sobre o método de amostragem para coleta de dados sobre captura e esforço pesqueiro no Médio Amazonas*. *In*: IBAMA, (Ed.), *Coleção Meio Ambiente. Série Estudos de Pesca, 22*. IBAMA. Brasília. pp. 175-199.

Jagera, H.I.; Chandlerb, J.A.; Leplab, K.B.; Winklec, W.V. 2001. A theoretical study of river fragmentation by dams and its effects on white sturgeon populations. *Environmental Biology of Fishes*, 60: 347-361.

Jamielson, A. 1974. Genetic " tags" for marine fish stocks. *In*: Harden Jones, F.R., (Ed.), *Sea Fisheries Research*. Paul Elek Scientific Books Ltd. London. pp. 91-99.

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

Jones, D.A. 1972. Blood samples: Probability of discrimination. *J. Forensic Sci. Soc.*, 12: 355-359.

Kimura, M.; Crow, J.F. 1964. The number of alleles that can be maintained in a finite population. *Genetics*, 49: 725-738.

Kimura, M.; Maruyama, T. 1971. Pattern of neutral polymorphism in a geographically structured population. *Genet. Res.*, 1: 9.

King, M. 1995. *Fisheries Biology, Assessment and management. Fishing*. New books, Oxford. England

Knaepkens, G.; Verheyen, E.; Galbusera, P.; Eens, M. 2004. The use of genetic tools for the evaluation of a potential migration barrier for the bullhead. *Journal of Fish Biology*, 64: 1737-1744.

Larkin, P.A. 1972. *The stock concept and management of Pacific salmon*. H. R. MacMillan Lectures in fisheries, Univ. Britisth Columbia. Vancouver

Leão, A.S.d.A. 2009. *Análise da variabilidade genática das populações de pirarucu (Arapaima gigas, Schinz 1822) dos principais tributários do rio Amazonas através do uso de marcadores microssatélites.* Mestrado, Programa Integrado de Pós-Graduação em Biologia Tropical e Recursos Naturais Instituto Nacional de Pesquisa do Amazonas/ INPA, Manaus, 88 pp.

Lee, W.-J.; Conroy, J.; Howell, W.H.; Kocher, T.D. 1995. Structure and evolution of teleost mitochondrial control regions. *Journal of Molecular Evolution*, 41: 54-66.

Leite, R.A.N. 1993. *Efeitos da usina hidroelétrica de Tucuruí sobre a composição da ictiofauna das pescarias experimentais de malhadeiras realizadas no baixo rio Tocantins (Pará)*. Dissertação de Mestrado, CPBA, INPA/UA, Manaus,

Leite, R.G.; Cañas, C.; Forsberg, B.; Barthem, R.B.; Goulding, M. 2007. *Larvas dos Grandes Bagres Migradores*. Lima, Peru. 127 pp.

Lévêque, C.; Oberdorff, T.; Paugy, D.; Stiassny, M.L.J.; Tedesco, P.A. 2008. Global diversity of fish (Pisces) in freshwater. *Hydrobiologia*: 545–567.

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

Li, W.H.; Graur, D. 1991. *Fundamentals of Molecular Evolution*. Sinauer Associates. Sunderland, Massachusetts

Li, Y.C.; Korol, A.B.; Fahima, T.; Beiles, A.; Nevo, E. 2002. Microsatellites: genomic distribution, putative functions, and mutational mechanisms: a review. *Molecular Ecology*, 11: 2453-2465.

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

Lin, J.; Quinn, T.P.; Hilborn, R.; Hauser, L. 2008. Fine-scale differentiation between sockeye salmon ecotypes and the effect of phenotype on straying. *Heredity*, 101: 341-350.

Lohmann, K.J.; Putman, N.F.; Lohmann, C.M.F. 2008. Geomagnetic imprinting: A unifying hypothesis of long-distance natal homing in salmon and sea turtles. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105: 19096-19101.

Lowe-Mcconnel, R.H. 1999. *Estudos Ecológicos de Comunidades de Peixes Tropicais* Editora da Universidade de São Paulo. São Paulo

Lundberg, J.; Littmann, M.W. 2003. Family Pimelodidae: Long-Whiskered catfishes. *In*: Reis, R.E.; Kulander, S.O.; Ferraris, C.J., (Eds.), *Check list of the freshwater fishes oh south and central America.* Porto Alegre-RS. pp. 432-446.

Lundberg, J.G. 2005. *Brachyplatystoma promagdalena*, new species, a fossil goliath catfish (Siluriformes: Pimelodidae) from the Miocene of Colombia, South America. *Neotrop. ichthyol.*, 3: 597-605.

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*, 2005: 492-516.

Lundberg, J.G.; Marshall, L.G.; Guerrero, J.; Horton, B.; Malabarba, M.C.; Wesselingh, F. 1998. The Stage for Neotropical Fish Diversification: A History of Tropical South American Rivers. *In*: Malabarba, L.R.; Reis, R.E.; Vari, R.P.; Lucena, C.A.S.; Lucena, Z.M.S., (Eds.), *Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes*. Museu de Ciências e Tecnologia, PUCRS. Porto Alegre. pp. 13-48.

Mace, G.M.; Purvis, A. 2008. Evolutionary biology and practical conservation: bridging a widening gap. *Molecular Ecology*, 17: 10.

Machado, V.N. 2009. *Análise da variabilidade genética da curimatã Prochilodus nigricans (Agassiz, 1829) na calha do rio Amazonas e seus principais tributários*. Mestrado, UFAM, Manaus,

Manoukis, N.C. 2007. FORMATOMATIC: A program for converting diploid allelic data between common formats for population genetic analysis. *Molecular Ecology Notes*, 7: 592 - 593.

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

Marão-Siqueira, T. 2003. *Estimativa da variabilidade genética da piramutaba (Brachyplatystoma vaillantii - Valenciennes 1840) do rio madeira na Amazônia*. Uninilton Lins/INPA, Manaus, 48 pp.

Martins, W.S.; Lucas, D.C.S.; Neves, K.F.d.S.; Bertioli, D.J. 2009. WebSat - A web software for microsatellite marker development *Bioinformation* 3: 282-283

McCouch, S.R.; Chen, X.; Panaud, O.; Temnykh, S.; Xu, Y.; Cho, Y.G.; Huang, N.; Ishii, T.; Blair, M. 1997. Microsatellite marker development, mapping and applications in rice genetics and breeding. *Plant Molecular Biology*, 35: 89-99.

McVean, G.; Awadalla, P.; Fearnhead, P. 2002. A Coalescent-Based Method for Detecting and Estimating Recombination From Gene Sequences. *Genetics*, 160: 1231-1241.

Meyer, A. 1993. Evolution of mitochondrial DNA in fishes. *Biochemistry and molecular biology of fishes*, 2: 1-38.

Michalakis, Y.; Excoffier, L. 1996. A Generic Estimation of Population Subdivision Using Distances Between Alleles With Special Reference for Microsatellite Loci. *Genetics*, 142: 1061-1064.

Mikich, S.B.; Bérnils, R.S. 2004. *Livro vermelho da fauna ameaçada no Estado do Paraná*. Curitiba

MMA 2004. *Instrução Normativa N° 5, de 21 de Maio de 2004. Diário Oficial N° 102 de 28 de Maio de 2004. Dispõe: Reconhecer como espécies ameaçadas de extinção e espécies sobreexplotadas ou ameaçadas de sobreexplotação, os invertebrados aquáticos e peixes, constantes dos Anexos a Instrução Normativa.*

Moeser, A.A.; Bermingham, E. 2005. Isolation and characterization of eight microsatellite loci for the Neotropical freshwater catfish (*Pimelodella chagresi*) (Teleostei: Pimelodidae). *Molecular Ecology Notes*, 5: 363-365.

Mullis, K.; Faloona, F. 1987. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *In*, *Recombinant DNA Part F*. pp. 335-350.

Munday, P.L.; Dixson, D.L.; Donelson, J.M.; Jones, G.P.; Pratchett, M.S.; Devitsina, G.V.; DÃ¸ving, K.B. 2009. Ocean acidification impairs olfactory discrimination and homing ability of a marine fish. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106: 1848-1852.

Muñoz-Sosa, D.L. 1996. *Age Structure and Exploitation of Giant Catfish Populations (Brachyplatystoma spp.) in the Lower Caqueta River, Colombia.* State University of New York, Syracuse. N.Y., 100 pp.

Narum, S.R.; Stephenson, J.J.; Campbell, M.R. 2007. Genetic Variation and Structure of Chinook Salmon Life History Types in the Snake River. *Transactions of the American Fisheries Society*, 136: 1252-1262.

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

Ngamsiri, T.; Ohashi, Y.; Sukumasavin, N.; Nakajima, M.; Na-Nakorn, U.; Taniguchi, N. 2006. Characterization of microsatellite DNA markers in a critically endangered species, Mekong giant catfish, *Pangasianodon gigas*. *Molecular Ecology Notes*, 6: 313-315.

Nicholas, J.W.; Downey, T.W. 1983. *Coastal chinook salmon studies, 1980-1983*. Oregon Dep. Fish Wildl. (U.S.A.) Prog. Rep. Oregon

Nielsen, J.L.; Carpanzano, C.; Fountain, M.C.; Gan, C.A. 1997. Mitochondrial DNA and nuclear microsatellite diversity in hatchery and wild *Oncorhynchus mykiss* from

freshwater habitats in southern California. *Transactions of the American Fisheries Society*, 12: 397–417.

Papi, F. 1992. *General aspects In Animal Homing*. Chapman & Hall. London. 408 pp.

Parente, V.d.M.; Vieira, E.F.; Carvalho, A.R.; Fabré, N.N. 2005. A pesca e a economia da pesca de bagres no eixo Solimões-Amazonas. *In*: Fabré, N.N.; Barthem, R.B., (Eds.), *O manejo da pesca dos grandes bagres migradores: piramutaba e dourada no eixo Solimões-Amazonas.* IBAMA. Manaus.

Park, S.D.E. 2001. *Trypanotolerance in West African Cattle and the Population Genetic Effects of Selection* Ph.D. thesis (in prep.), University of Dublin,

Pascual, M.A.; Quinn, T.P. 1994. Geographical patterns of straying of fall chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) from Columbia River (U.S.A.) hatcheries. *Aquacult. Fish. Manage*, 25: 17-30.

Peakall, R.; Smouse, P.E. 2006. genalex 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes*, 6: 288-295.

Pereira, L.H.G.; Foresti, F.; Oliveira, C. 2008. Genetic structure of the migratory catfish *Pseudoplatystoma corruscans* (Siluriformes: Pimelodidae) suggests homing behaviour. *Ecology of Freshwater Fish*, 18: 215-225.

Petrere, M.; Barthem, R.; Cordoba, E.; Gomez, B. 2004. Review of the large catfish fisheries in the upper Amazon and the stock depletion of piraíba (*Brachyplatystoma filamentosum* Lichtenstein). *Rev. Fish. Biol. Fish.*, 14: 403-414.

Porto, J.I.R. 1999. *Análise cariotípica e sequenciamento de mtDNA de populações de Mylesinus paraschomburgkii (Characiformes, Serrasalmidae) da Bacia Amazônica*. Tese de Doutorado, INPA, Manaus,

Posada, D.; Crandall, K. 1998. MODELTEST: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics*, 14: 817-818.

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

Prugnolle, F.; Meeus, T. 2002. Inferring sex-biased dispersal from population genetic tools: a review. *Heredity*, 88: 5.

Queller, D.C.; Goodnight, K.F. 1989. Estimating relatedness using genetic markers. *Evolution*, 43: 258-275.

Quinn, T.P. 1991. *Models of Pacific salmon orientation and navigation on the open ocean*. *Journal of Theoretical Biology*, 150: 539-545.

Quinn, T.P. 1993. A review of homing and straying of wild and hatchery-produced salmon. *Fisheries Research*, 18: 29-44.

Quinn, T.P.; Fresh, K. 1984. Homing and straying in chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha)* from Cowlitz River Hatchery, Washington. *Can. J. Fish. Aquat. Sci*, 41: 1078-1082.

Quinn, T.P.; Nemeth, R.S.; O., M.D. 1991. Homing and straying patterns of fall chinook salmon in the lower Columbia River. *Trans. Amer. Fish. Soc*, 120: 150-156.

Ray, N.; Currat, M.; Excoffier, L. 2003. Intra-Deme Molecular Diversity in Spatially Expanding Populations. *Mol Biol Evol*, 20: 76-86.

Raymond, M.; Rousset, F. 1995. GENEPOP (Version 1.2): Population Genetics Software for Exact Tests and Ecumenicism. *J Hered*, 86: 248-249.

Rêgo, V.H.; Fabré, N.N.; Pérez, L.A. 1998. Estruturas calcificadas de dourada (*Brachyplatystoma flavicans*) para determinação da idade. *Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi, Serie Zoologia*, 14: 143-173.

Reis, R.E.; Kullander, S.O.; Ferraris, J. 2003. *Check list of the freshwater of the south and central américa*. EDIPUCRS. Porto Alegre. 729 pp.

Revaldaves, E.; Pereira, L.H.G.; Foresti, F.; Oliveira, C. 2005. Isolation and characterization of microsatellite loci in *Pseudoplatystoma corruscans* (Siluriformes: Pimelodidae) and cross-species amplification. *Molecular Ecology Notes*, 5: 463-465.

Rezende, L.F.B. 1998. *Aspectos Biológicos e pesqueiros da Dourada (Brachyplastistoma flavicans) Pimelodidae - Siluroidei, em um setor da Amazônia Central*. CPBA, INPA/FUA, Manaus,

Rice, W.R. 1989. Analyzing tables of statistical tests. *Evolution*, 43: 223-225.

Roberts, T.R. 1972. Ecology of fishes in the Amazon and Congo Basins. *Bull. Mus. Comp. Zool*, 2: 117–142.

Rocha-Olivares, A.; Garber, N.M.; Stuck, K.C. 2000. High genetic diversity, large interoceanic divergence and historical demography of the striped mullet. *Journal of fish biology*, 57: 15.

Rodrigues, F.; Farias, I.; Batista, J.; 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 Genetics Resources*.

Rodrigues, F.C. 2009. *Estimativa da variabilidade genética da piramutaba (Brachyplatystoma vaillantii) por meio de marcadores moleculares microssatélites e D-loop em quatro localidades da Amazônia: diferenças entre calha e tributários*. Dissertação de Mestrado, GCBEv, INPA, Manaus, 96 pp.

Roger, A.R.; Harpending, H. 1992. Population Growth Makes Waves in the Distribution of Pairwise Genetic Differences. *Mol Biol Evol.*, 9: 552-569.

Rose, O.; Falush, D. 1998. A threshold size for microsatellite expansion. *Mol. Biol. Evol.*, 15: 613–615.

Rosel, P.E.; Reeves, R.R. 2000. Genetic and demographic considerations for the conservation of river cetaceans. *In*: Reeves, R.R.; Smith, B.D.; Kasuya, T., (Eds.), *Biology and Conservation of Freshwater Cetaceans in Asia*. Occasional Papers of the IUCN Species Survival Commission Gland, Switzerland.

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. pp. 465-386.

Ruffino, M.L.; Barthem, R.B.; Fischer, C.F.A. 2000. Perspectivas do manejo dos bagres migradores na Amazônia. *In*: Fisher, C.F.A., (Ed.), *Recursos pesqueiros do médio Amazonas: Biologia e estatística pesquiera*. IBAMA. Brasília. pp. 141-152.

Ruffino, M.L.; Isaac, V.J. 1995. Life cycle and biological parameters of several brazilian amazon fish species. *The ICLARM Quartely, Fishbyte Section*, 8: 40-45.

Salati, E.; Junk, W.J.; Schubart, H.O.; Oliveira, A.E. 1983. *Amazônia: Desenvolvimento, Integração e Ecologia. Brasiliense*. CNPq. São Paulo

Sambrook, J.; Fritsch, E.F.; Maniatis, T. 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Springs Harbor Laboratory Press. Cold Springs Harbor, NY

Sambrook, J.; Russell, D.W. 2001. *A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York

Sanches, A. 2007. *Estrutura genética populacional Brycon hilarii (Characidae) da sub-bacia do rio Miranda, e seu significado para programas de conservação.* Doutorado, Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais, Universidade Federal de São Carlos - UFSCar, São Carlos, 126 pp.

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

Santos, M.D.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.

Santos, M.D.C.F.; Ruffino, M.L.; Farias, I.P. 2007. High levels of genetic variability and panmixiaof the tambaqui *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818) in the main channel of the Amazon River. *J. Fish Biol.*, 71a: 33-44.

Santos, S.; Schneider, H.; Sampaio, I. 2003. Genetic differentiation of Macrodon ancylodon (Sciaenidae, Perciformes) populations in Atlantic coastal waters of South America as revealed by mtDNA analysis. *Genetics and Molecular Biology*, 26: 10.

SANYO 1998. *The fishery resources study of the Amazon and Tocantins River mouth areas in the Federative Republic of Brazil: Final report. Japan International Cooperation Agency (JICA)*. Page 331 in MARINE, S.T., editor. *Museu Paraense Emílio Goeldi (MPEG).* Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Renováveis (IBAMA).

Sato, Y.; Godinho, H. 2004. Migratory fishes of the São Francisco River. *In*: Carolsfeld, J.; Harvey, B.; Ross, C.; Baer, A., (Eds.), *Migratory Fishes of South America: Biology, Fisheries and Conservation Status*. IDRC. Victoria. pp. 380.

Schlotterer, C. 2004. The evolution of molecular markers: just a matter of fashion? *Nature Reviews Genetics* 5: 7.

Schlötterer, C. 2000. Microsatellite analysis indicates genetic differentiation of the neo-sex chromosomes in *Drosophila americana americana*. *Heredity*, 85: 610-616.

Schlotterer, C.; Tautz, D. 1992. Slippage synthesis of simple sequence DNA. *Nucleic Acids Research*, 20: 211-215.

Schmitt, R. 2005. *Filogeografia de Hypopygus lepturus Hoedman, 1962 (Gymnotformes: Rhamphicthyidae) ao longo do médio rio Negro, Amazônia.* Mestrado, CPBA, INPA/UFAM, Manaus, 95 pp.

Schuelke, M. 2000. An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. *Nature Biotechnology*, 18: 233-234.

Selkoe, K.A.; Toonen, R.J. 2006. Microsatellites for ecologists: a practical guide to using and evaluating microsatellite markers. *Ecology Letters*, 9: 615-629.

Shaklee, J.; Salini, J. 1985. Genetic variation and population subdivision in Australian barramundi, *Lates calcarifer* (Bloch). *Marine and Freshwater Research*, 36: 203-218.

Silva, T.D.J.D.; Hrbek, T.; Farias, I.P. 2009. Microsatellite markers for the silver arowana, *Osteoglossum bicirrhosum* (Osteoglossidae, Osteoglossiformes). *Molecular Ecology Resources*, 9: 1019-1022.

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.

Slatkin, M. 1985. Rare alleges as indicators of gene flow. *Evolution*, 39: 12.

Slatkin, M. 1995. A Measure of Population Subdivision Based on Microsatellite Allele Frequencies. *Genetics*, 139: 457-462.

Slatkin, M.; Hudson, R.R. 1991. Pairwise Comparisons of Mitochondrial DNA Sequences in Stable and Exponentially Growing Populations. *Genetics*, 129: 555-562.

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

Solé-Cava, A.M.; Levy, J.A. 1987. Biochemical evidence for a third species of angel shark (Squatina) of the East cost of South America. *Biochemical Systematics and Ecology*, 15: 8.

Sousa, C.; Santos, C.; Sousa, A.; Paula-Silva, M.; Souza, A.; Farias, I.; Ferreira-Nozawa, M.; Almeida-Val, V. 2009. Development and characterization of microsatellite markers in Astronotus crassipinis (Heckel, 1840). *Conservation Genetics Resources*.

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

Spruell, P.; Hemmingsen, A.R.; Howell, P.J.; Kanda, N.; Allendorf, F.W. 2003. Conservation genetics of bull trout: Geographic distribution of variation at microsatellite loci. *Conservation Genetics*, 4: 17-19.

Stabell, O.B. 1984. Homing and olfaction in salmonids: a critical review with special reference to the atlantic salmon. *Biological Reviews*, 59: 333-388.

Staden, R. 1996. The Staden sequence analysis package. *Molecular Biotechnology*, 5: 233-241.

SUDEPE 1986. *Anuário Estatístico. Controle de desembarque de pescado em nove municípios do estado do Amazonas, ano de 1985*. SUDEPE, Manaus.

Swofford, D.L. 2003. *PAUP*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and Other Methods)*. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.

Taberlet, P.; Cheddadi, R. 2002. Ecology. Quaternary refugia and persistence of biodiversity. *Science*, 297: 2.

Tajima, F. 1989. Statistical Method for Testing the Neutral Mutation Hypothesis by DNA Polymorphism. *Genetics*, 123: 585-595.

Tello, S.; García, A. 2009. *Diagnostico actualizo de la pesqueria de grandes bagres*. Page 28. Instituto de Investigaciones de la Amazonía Peruana Peru.

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.

Terêncio, 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, CGBEv, INPA, Manaus 102 pp.

Thompson, J.D.; Higgins, D.G.; Gibson, T.J. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*.

Utter, F.M. 1991. Biochemical genetics and fishery management: an historical perspective. *Journal of fish biology*, 39: 1-20.

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. *Molecular Ecology Notes*, 4: 535-538.

Varnavskaya, N.V.; Wood, C.C.; Everett, R.J.; Wilmot, R.L.; Varnavsky, V.S.; Midanaya, V.V.; Quinn, T.P. 1994. Genetic differentiation of subpopulations of sockeye salmon (*Oncorhynchus nerka*) within lakes of Alaska, British Columbia, and Kamchatka, Russia. *Can. J. Fish. Aquat. Sci*, 51: 147-157.

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

Waples, R.S.; Gaggiotti, O. 2006. What is a population? An empirical evaluation of some genetic methods for identifying the number of gene pools and their degree of connectivity. *Molecular Ecology*, 15: 1419-1439.

Waples, R.S.; Punt, A.E.; Cope, J.M. 2008. Integrating genetic data into management of marine resources: how can we do it better? *Fish and Fisheries*, 9: 26.

Weber, J.L. 1990. Informativeness of human (dC-dA)n (dG-dT)n polymorphisms. *Genomics*, 7: 524-530.

Wegmann, D.; Currat, M.; Excoffier, L. 2006. Molecular Diversity After a Range Expansion in Heterogeneous Environments. *Genetics*, 174: 11.

Wehner, R.; Lehrer, M.; Harvey, W.R. 1996. Navigation. *The Journal of Experimental Biology*, 199: 1-261.

Weir, B.S.; Cockerham, C.C. 1984. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution*, 38: 1358-1370.

Welcomme, R.L. 1992. *The fisheries ecology of floodplain rivers*. Longmann. London

Willis, S.C.; S., N.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: 17.

Wofford, J.E.B.; Gresswell, E.R.; Banks, M.A. 2005. Influence of barriers to movement on within-watershed genetic variation of coastal cutthroat trout. *Ecological Applications*, 15: 628-637.

Wolstenholme, D.R.; Clary, D.O. 1985. Sequence Evolution Of Drosophila Mitochondrial Dna *Genetics*, 109: 725-744.

Wright, S. 1931. Evolution in Mendelian populations. *Genetics*, 16.

Wright, S. 1951. The genetical structure of populations. *Annals of Eugenics*, 15: 323-354.

Wright, S. 1969. *Evolution and the Genetics of Populations, Theory of Gene Frequencies*. Chicago

Wright, S. 1978. *Evolution and the Genetics of Populations*. University of Chicago Press. Chicago

Zagonel, L.B. 2009. *Avaliação do impacto das barragens na variabilidade e estruturação genética Pimelodus Maculatus lacepede, 1803 (Siluriformes, Pimelodidae) do rio São Francisco.* Zoologia, Universidade Federal do Paraná, Paraná, 76 pp.

Zhang, D.-X.; Hewitt, G.M. 1996. Nuclear integrations: challenges for mitochondrial DNA markers *Trends in Ecology & Evolution*, 11: 247-251.

Zhu, Y.; Strassmann, J.E.; Queller, D.C. 2000. Insertions, substitutions, and the origin of microsatellites. *Genetics Research*, 76: 227-236.

Zuanon, J.A. 1990. *Aspectos da biologia, ecologia e pesca de grandes bagres (Pisces, Siluriformes, Siluroidei) na área da Ilha da Marchantaria - Rio Solimões, AM.* . Mestrado, CPBA, INPA/FUA, Manaus, 186 pp.