

INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA – INPA

Programa de Pós-Graduação do INPA

Programa de Pós-Graduação em Biologia de Água Doce e Pesca Interior

Estimativa da diversidade genética da piraíba (*Brachyplatystoma filamentosum* Lichtenstein, 1819) e da piraíba negra (*Brachyplatystoma capapretum* Lundberg e Akama, 2005), na Amazônia Brasileira, inferidas por meio do DNA mitocondrial: subsídios para manejo e conservação.

GIULIANO PALEMÃO CARLOS MAIA HUERGO

MANAUS-AM
Julho/2009

INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA – INPA

Programa de Pós-Graduação do INPA

Programa de Pós-Graduação em Biologia de Água Doce e Pesca Interior

Estimativa da diversidade genética da piraíba (*Brachyplatystoma filamentosum* Lichtenstein, 1819) e da piraíba negra (*Brachyplatystoma capapretum* Lundberg e Akama, 2005), na Amazônia Brasileira, inferidas por meio do DNA mitocondrial: subsídios para manejo e conservação.

GIULIANO PALEMÃO CARLOS MAIA HUERGO

Orientador: José Alves Gomes, PhD.

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação do INPA, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Doutor em Ciências Biológicas, área de concentração em Biologia de Água Doce e Pesca Interior.

MANAUS-AM

Julho/2009

Fontes financiadoras: CAPES, FAPEAM e CNPq

H887

Huergo, Giuliano Palemão Carlos Maia

Estimativa da diversidade genética da piraíba (*Brachyplatystoma filamentosum* Lichtenstein, 1819) e da piraíba negra (*Brachyplatystoma capapretum* Lundberg e Akama, 2005), na Amazônia Brasileira, inferidas por meio do DNA mitocondrial: subsídios para manejo e conservação/
Giuliano Palemão Carlos Maia Huergo.--- Manaus : [s.n.], 2010.
xii, 116 f. : il. color.

Tese (doutorado)-- INPA, Manaus, 2010

Orientador : José Antônio Alves Gomes

Área de concentração : Biologia de Água Doce e Pesca Interior

1. Piraíba (peixe) – Amazônia. 2. DNA mitocondrial. 3. Variabilidade genética. 4. Manejo. 5. Piraíba negra (peixe). 6. Pesca. I. Título.

CDD 19. ed. 597.520415

AGRADECIMENTOS

Ao Criador do Universo, por tudo.

Ao orientador, Prof. Dr. José Antônio Alves Gomes, pela amizade e confiança depositada na realização do trabalho.

À amiga Tatiana Marão-Siqueira, pessoa que me ensinou os procedimentos de bancada na arte da biologia molecular.

À amiga Rosa Jaqueline Figueiras Souza, que muito me ajudou nas extrações de DNA e seqüenciamentos da região controle.

A todos os integrantes do Projeto Pirada, em especial a MSc. Jacqueline Batista e a MSc. Kyara Formiga-Aquino, pela condução de todo apoio logístico no Laboratório Temático de Biologia Molecular do INPA.

A todas as pessoas que contribuíram nas coletas das amostras nos rios de águas brancas: Cristiano, Eduardo, John, Liliane, Francisca, Fabíola, Gracy, Paula, Sigueru, Násser, Túlio, Ariovaldo, Boaventura, Marinês, André, Lucien, Igor, Tomas, Lucicleide, Jamili, Giselle, Will, Fagner, Naiara, Rodrigo e Yane.

À amiga Daniela Pauletto e ao amigo Tone Assunção, pela coleta das amostras na cidade de São Gabriel da Cachoeira.

Ao Prof. Dr. Claudio Oliveira, do Laboratório de Biologia de Peixes da UNESP de Botucatu, pelas amostras da região do rio Araguaia.

À Profa. Dra. Miriam Leal Carvalho, do Programa Nacional de Desenvolvimento da Pesca Amadora/IBAMA, que articulou os contatos com as pousadas de pesca esportiva.

Ao Sr. Francisco Carlos Munhoz Arroyo, proprietário da Pousada Salto do Thaimaçu, pela hospitalidade e disponibilidade de toda logística para coletas das amostras na região do rio Teles Pires.

Aos amigos de Roraima, Romério Briglia Ferreira e Sebastião Pereira do Nascimento, pelas amostras coletadas no rio Branco.

À Coordenadora do Curso de Biologia de Água Doce e Pesca Interior, Profa. Dra. Angela Maria Bezerra Varella, e a secretaria do curso, especialmente a Carminha e Elany.

A todo corpo de Pesquisadores-Docentes do Curso de Biologia de Água Doce e Pesca Interior.

A todos os colegas acadêmicos do Curso de Biologia de Água Doce e Pesca Interior.

Aos colegas do LFCE, Gilberto, Adília, Renata, David e Diana.

Às Agências de Fomento, CAPES pela concessão da bolsa e doutorado, e a FAPEAM e ao CNPq pelo financiamento do trabalho.

A todos que contribuíram de forma indireta a realização do trabalho.

Aos meus pais Ezoel e Dalva, e ao meu amor Patrícia, dedico.

ÍNDICE

LISTA DE TABELAS	ix
LISTA DE FIGURAS	x
RESUMO GERAL	xi
GENERAL ABSTRACT	xii
INTRODUÇÃO GERAL	13
Contexto geral das duas espécies: piraíba (<i>Brachyplatystoma filamentosum</i>) e da piraíba negra (<i>B. capapretum</i>)	13
Pesca comercial e identificação de estoques pesqueiros	17
Estudos genéticos como ferramentas para a identificação de populações de peixes.....	19
BIBLIOGRAFIA CITADA	23
CAPÍTULO I.....	30
 Estimativa da divergência genética e frequências médias de captura das piraíbas <i>Brachyplatystoma filamentosum</i> e <i>B. capapretum</i> em rios de águas brancas da Amazônia brasileira.	31
RESUMO.....	31
ABSTRACT	32
INTRODUÇÃO	33
MATERIAL E MÉTODOS.....	36
Coleta das amostras e seqüenciamento da região controle do DNA mitocondrial	36
Identificação e alinhamento das seqüências.....	37
Estimativa da frequência média de <i>B. filamentosum</i> e <i>B. capapretum</i> entre as piraíbas capturadas pela pesca comercial em rios de águas brancas da Amazônia brasileira	41
Estimativa da diversidade genética das espécies.....	42
Estimativa da divergência genética entre as espécies	43

RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	44
Estimativa da frequência média de <i>B. filamentosum</i> e <i>B. capapretum</i> , entre as piraibas capturadas pela pesca comercial em rios de águas brancas da Amazônia brasileira	44
Estimativa da diversidade genética das espécies.....	50
Estimativa da divergência genética entre as espécies	54
BIBLIOGRAFIA CITADA	56
CAPÍTULO II	65
Estrutura genética da piraíba branca (<i>Brachyplatystoma filamentosum</i>, Siluriformes: Pimelodidae) capturada comercialmente na Amazônia brasileira, inferida pela região controle do DNA mitocondrial.....	66
RESUMO.....	66
ABSTRACT	67
INTRODUÇÃO	68
MATERIAL E MÉTODOS.....	71
Coleta das amostras e sequenciamento da região controle do DNA mitocondrial	71
Distribuição de haplótipos e análise da estrutura genética.....	75
Análise filogenética	76
Estimativa da diversidade genética dos clados	76
Estimativa da divergência genética dentro e entre os clados	77
Análises de contração-expansão populacional dos clados.....	77
RESULTADOS	79
Distribuição de haplótipos e análise da estrutura genética.....	79
Análise filogenética	86
Estimativa da diversidade genética dos clados	88
Estimativa da divergência genética dentro e entre os clados	90
Análise de contração-expansão populacional dos clados	90

DISCUSSÃO	92
BIBLIOGRAFIA CITADA	103
CONSIDERAÇÕES FINAIS	115

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

Tabela 1 – Regiões e seus respectivos locais de coleta, suas localizações político-geográficas e o número de amostras de piraíba (<i>Brachyplatystoma ssp</i>) coletadas por local.	39
Tabela 2 – Mutações nucleotídicas da região controle do DNA mitocondrial de <i>B. filamentosum</i> e <i>B. capapretum</i> utilizadas na identificação das sequências e suas respectivas espécies.....	40
Tabela 3 – Número de amostras identificadas como sendo de <i>B. filamentosum</i> e <i>B. capapretum</i> para cada região e seus respectivos locais.....	46
Tabela 4 – Estimativas dos parâmetros genéticos para a região controle do DNA mitocondrial de <i>B. filamentosum</i> e <i>B. capapretum</i>	50

CAPÍTULO II

Tabela 1 – Regiões, seus respectivos locais de coleta, localizações político-geográficas, classificação por tipo de água e número de sequências de <i>Brachyplatystoma filamentosum</i> por local e região.	74
Tabela 2 – Frequência dos haplótipos de <i>Brachyplatystoma filamentosum</i> nas regiões amostradas.....	79
Tabela 3 – Análise de variância molecular espacial (SAMOVA) para <i>B. filamentosum</i> considerando k=2, k=3 e k=4 grupos de regiões.	84
Tabela 4 – Valores de Φ_{st} par a par entre <i>Brachyplatystoma filamentosum</i> de 12 regiões da Amazônia brasileira.	85
Tabela 5 – Estimativas dos parâmetros genéticos da região controle do DNA mitocondrial de <i>Brachyplatystoma filamentosum</i> nos clados.	89
Tabela 6 – Estimativas médias (\pm e.p.) das divergências genéticas par a par não corrigidas de <i>Brachyplatystoma filamentosum</i> entre (abaixo da diagonal) e dentro (diagonal) dos clados obtidos pelo método de aproximação de vizinhos. Acima da diagonal as estimativas do fluxo gênico entre os clados, em número de fêmeas migrantes por geração (Nm).	90

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

Figura 1 – Locais amostrados e seus respectivos agrupamentos por região indicados pelas cores dos marcadores: 1) Belém; 2) Santarém; 3) Manaus; 4) Tefé; 5) Japurá; 6) Tabatinga; 7) Boa Vista; 8) Manicoré; 9) Porto Velho; 10) Guajará Mirim; 11) Lábrea; 12) Boca do Acre; 13) Eirunepé e 14) Cruzeiro do Sul. 42

Figura 2 – Frequências de *B. filamentosum* e *B. capapretum* por região, e a estimativa da frequência média de cada espécie entre as piraibas comercializadas nos rios de águas brancas da Amazônia brasileira, reveladas pelo sequenciamento da região controle do DNA mitocondrial. 47

CAPÍTULO II

Figura 1 – A bacia hidrográfica amazônica e os locais amostrados: 1) Belém; 2) Santarém; 3) Manaus; 4) Tefé; 5) Japurá; 6) Tabatinga; 7) Boa Vista; 8) Porto Velho; 9) Guajará Mirim; 10) Lábrea; 11) Eirunepé; 12) Cruzeiro do Sul; 13) São Gabriel da Cachoeira; 14) Paranaíta e 15) São Miguel do Araguaia. Os agrupamentos por região são indicados na figura pelas cores dos marcadores, ESA=Eixo Solimões/Amazonas..... 73

Figura 2 – Filograma com 262 sequências (154 haplótipos) da região controle do DNA mitocondrial de *Brachyplatystoma filamentosum*, estimado pelo método de aproximação dos vizinhos. As sequências são identificadas por seus respectivos números haplotípicos e siglas das regiões de amostragem, como descrito na tabela 2. As cores das sequências correspondem a três clados suportados por valores de *bootstrap* indicados na figura. A barra corresponde à escala de divergência genética. 87

Figura 3 – Mapa indicando as distribuições de frequência dos haplótipos em cada clado, dentro de cada região. 88

Figura 4 – Estimativas dos valores do teste de neutralidade mutacional F_s e histogramas de distribuição de frequência das diferenças genéticas par a par dos três clados, como os valores observados e simulados. * significativo a 5%. 91

RESUMO GERAL

A piraíba (*B. filamentosum*, Siluriformes: Pimelodidae) possui uma ampla distribuição na bacia amazônica, ocorrendo a partir dos rios costeiros do estado do Amapá até os cursos d'água que cortam o sopé da cordilheira dos Andes. Desde a década de 1970 já havia dúvidas sobre a existência de uma ou mais espécies chamadas de piraíba, mas apenas em 2005 uma nova espécie denominada piraíba negra (*Brachyplatystoma capapretum*) foi descrita, com base em caracteres morfológicos. Há poucos dados sobre a biologia da piraíba e os que existem geralmente são tratados em conjunto com outras espécies de grandes bagres. Esta tese é escrita em dois capítulos. No primeiro capítulo, as duas espécies popularmente conhecidas como piraíba (*Brachyplatystoma filamentosum* e *B. capapretum*) e oriundas dos desembarques pesqueiros realizados em nove regiões inseridas em calhas de rios de águas brancas da Amazônia brasileira, foram caracterizadas geneticamente por meio do sequenciamento da região controle do DNA mitocondrial. Para um total de 337 amostras, foi verificado que em média, na totalidade da área amostrada 66,81% dos peixes pertenciam à espécie *B. filamentosum* e 33,19% à espécie *B. capapretum*. Os valores de diversidade haplotípica foram altos em ambas as espécies, entretanto, a diversidade nucleotídica foi maior em *B. filamentosum*. Esses valores foram comparados aos valores de diversidade nucleotídica da região controle de outras espécies sobreexplotadas ou ameaçadas de sobreexplotação na Amazônia, e sugerem que do ponto de vista genético, *B. filamentosum* e principalmente *B. capapretum* necessitam de medidas urgentes de manejo visando sua conservação. O modelo de substituição nucleotídica de Tamura-Nei revelou que a divergência genética entre as duas espécies foi de 0,1018. Esse valor poderá ser usado como referência para estudos relacionados às distâncias genéticas de outras espécies do gênero *Brachyplatystoma*. O segundo capítulo teve como objetivo inferir sobre a estrutura genética de *B. filamentosum* na Amazônia brasileira, por meio do sequenciamento da região controle do DNA mitocondrial. Para isso foram analisadas 262 amostras de *B. filamentosum* oriundas da captura comercial em nove regiões caracterizadas por possuir rios de águas brancas, duas regiões com rios de águas claras e uma região com um rio de águas pretas. A SAMOVA resultou em um Fct de 0,62079 para k=3 grupos, nos quais as regiões amostradas se agruparam de acordo com o tipo de água. A análise filogenética indicou a existência de três clados que possuem uma forte relação com a distribuição geográfica dos três tipos de águas da bacia amazônica. Os clados relacionados às águas claras e pretas revelaram baixos valores de diversidade haplotípica ($\pi=0,0037$ e $0,0036$, respectivamente). Os resultados foram discutidos no contexto evolucionário da bacia amazônica e também revelaram a necessidade de ações de manejo com fins conservacionistas para *B. filamentosum*.

Palavras-chave: piraíba, DNAm, região controle, pesca, Amazônia.

Estimates of genetic diversity of piraíba (Brachyplatystoma filamentosum, Lichtenstein 1819) and black piraíba (Brachyplatystoma capapretum, Akama and Lundberg 2005), in the Brazilian Amazon, inferred by mitochondrial DNA: subsidies to management and conservation.

GENERAL ABSTRACT

The piraíba (*B. filamentosum*, Siluriformes: Pimelodidae) has a wide distribution in the Amazon basin, occurring from coastal rivers of Amapá state to the water courses across foothills of the Andes. Since the 1970s there were doubts about the existence of one or more species called piraíba, but in 2005 a new species named black piraíba (*Brachyplatystoma capapretum*) was described based on morphological characters. There are few data on the biology of piraíba and these are usually treated together with other species of large catfish. This thesis is written and divided into two chapters. In the first chapter, the two species known as “piraíba” (*Brachyplatystoma filamentosum* and *Brachyplatystoma capapretum*) from fishery landings held in 9 regions inserted in white water rivers basins of the Brazilian Amazon, were genetically characterized through mitochondrial DNA control region. For a total of 337 samples, it was verified that, in medium, in all sampled area, 66.81% of the fishes belonged to *B. filamentosum* species and 33.19% to *B. capapretum* species. The values of haplotypic diversity were high for both species, however the nucleotide diversity was higher in *B. filamentosum* ($\pi = 0.0118$) when compared to *B. capapretum* ($\pi = 0.0041$). These values were compared to the nucleotide diversity values of other overfished species or threatened species in the Amazon and suggesting that the *B. filamentosum* and *B. capapretum* need urgent management actions for conservation. The nucleotide substitution model Tamura-Nei showed that the genetic divergence between this species was 0.1018. This value can be used as a reference for genetic distance studies for others *Brachyplatystoma* species. The second chapter aimed to infer the genetic structure of *B. filamentosum* in the Brazilian Amazon, through the sequencing of the control region of mitochondrial DNA. 262 samples of *B. filamentosum* were analyzed from the commercial catch in nine regions characterized by having white-water rivers, two regions of rivers with clear waters and one region with a black waters river. The SAMOVA resulted in $F_{ct} = 0.62079$, for $k = 3$ groups, where the regions sampled were grouped according to water type. Phylogenetic analysis indicated the existence of three clades that have a strong relationship with the geographical distribution of three types of waters of the Amazon basin. Clades related to the clear and black waters showed low diversity of nucleotides ($\pi = 0.0037$ and 0.0036 respectively). The results were discussed in the evolutionary context of the Amazon basin and also revealed the need for management actions for conservation purposes for *B. filamentosum*.

Key-words: piraíba, DNAmt, control region, fishery, Amazon.

INTRODUÇÃO GERAL

Contexto geral das duas espécies: piraíba (*Brachyplatystoma filamentosum*) e da piraíba negra (*B. capapretum*)

A bacia amazônica possui a maior diversidade de peixes de água doce do mundo, com um número estimado em até 5.000 espécies, sendo que 43% dos peixes pertencem à ordem characiformes, 39% à ordem siluriformes, 3% a ordem gymnotiformes e o restante dividido entre 14 famílias de diferentes ordens (Santos e Ferreira, 1999). Embora, há décadas a biologia pesqueira seja alvo de estudos na Amazônia, o conhecimento adquirido permanece ainda limitado quando se leva em consideração a riqueza de espécies e a produção biológica e econômica dos recursos pesqueiros explorados (Barthem e Fabré, 2004).

Os peixes migradores são os animais de maior valor econômico para a Amazônia. Sua bacia hidrográfica abriga a maior diversidade de peixes migradores do continente Sul Americano (Barthem e Goulding, 1997). Junto à bacia do rio Orinoco, a bacia amazônica provavelmente apresenta a maior diversidade de predadores de grande porte (> 50 cm), quando comparada a qualquer outro sistema de água doce do mundo. Esses predadores são principalmente representados pela Família Pimelodidae, que compreende pelo menos 12 espécies de grandes bagres (Burgess, 1989; Barthem e Goulding, 1997), das quais destacam-se comercialmente as do gênero *Pseudoplatystoma*, com oito espécies (Buitrago-Suárez e Burr, 2007), e as do gênero *Brachyplatystoma*, com as seguintes espécies: a piramutaba, *B.*

vaillantii; a dourada, *B. rousseauxii*; a piraíba, *B. filamentosum*, e a zebra, *B. juruense* (Lundberg e Littmann, 2003); o babão, *B. platynemum*; a dourada zebra *B. tigrinum*; e a piraíba negra *B. capapetrum* (Lundberg e Akama, 2005).

Os jovens de algumas dessas espécies podem ser encontrados no estuário e os adultos sexualmente maduros no alto Amazonas, no Brasil, Colômbia e Peru, indicando grande migração reprodutiva que pode chegar a 3500 Km. A calha do rio Amazonas serve como via de dispersão natural das larvas e juvenis para o estuário e como ambiente onde os adultos e subadultos encontram as presas (Ruffino, 2000). Contudo, de uma maneira geral, os padrões de migração dos grandes bagres ainda são desconhecidos e sobre eles ainda são insuficientes os estudos sobre a dinâmica populacional (FAO, 2000).

A pesca dos bagres é feita com redes de emalhe e espinhel ao longo da calha do rio Amazonas e seus principais afluentes de águas brancas. Devido à rejeição do consumo de peixes de couro pela população da Amazônia Central, sua captura é voltada principalmente para a exportação. Desde 1991 existe um comércio de exportação dessas espécies. A piramutaba é responsável por quase 90% do pescado exportado pelo estado do Amazonas (Ruffino *et al.*, 2000). As outras espécies de bagres como a dourada, o surubim e a piraíba também não são populares nos mercados locais do estado do Amazonas, entretanto são bem apreciados nos estados de Rondônia, Acre e Pará (Araújo-Lima e Ruffino, 2003), sendo capturados pela pesca artesanal e comercial em toda a bacia. A composição e a quantidade do pescado capturado dependem do tipo de ambiente que predomina na área de captura e de preferências de consumo regional. Nesse sentido, o caracádeo curimatã *Prochilodus nigricans* e

a dourada são as espécies mais importantes na região amazônica como um todo (Barthem e Fabré, 2004). Entre as três espécies de grandes bagres do gênero *Brachyplatystoma* mais explorados comercialmente, apenas em torno da piramutaba é que se desenvolveu a pesca industrial de pescado de água doce na Amazônia, sendo feita pela frota de pesca de arrasto (Batista *et al.*, 2004). Esse é o peixe de grande importância como item de exportação da Amazônia, e como principal exportador destaca-se o estado do Pará que exportou 28.000 toneladas no ano de 1977 (Dias Neto *et al.*, 1985), e em 1986 foi a terceira espécie mais exportada pelo Brasil (Revista CACEX, 1988). Atualmente a pesca da piramutaba não possui mais a grande importância de décadas atrás (Ruffino *et al.*, 2000).

A piraíba (*B. filamentosum*) possui uma ampla distribuição na bacia amazônica, ocorrendo a partir dos rios costeiros do estado do Amapá até os cursos de água que cortam o sopé da cordilheira dos Andes. Habita os canais dos rios principais, de água branca, preta e clara, tributários e lagos de várzea. Há poucos dados sobre a biologia da piraíba e os que existem geralmente são tratados em conjunto com outras espécies de grandes bagres. Um dos primeiros pesquisadores a estudar essa espécie foi o zoólogo Emílio Goeldi (Santos e Jegu, 2004; Barthem e Goulding, 1997). Filhote é a designação dada no Brasil para os indivíduos pequenos (< 60 cm). Na Colômbia é chamada de *lechero* devido ao líquido branco (com função desconhecida) que sai das glândulas abaixo das nadadeiras peitorais (Agudelo-Córdoba *et al.*, 2000). Essa espécie é caracterizada por apresentar dorso escuro e ventre claro (Barthem e Goulding, 1997), e em relação ao seu porte, na Amazônia, só é superada pelo pirarucu *Arapaima gigas* (Agudelo-Córdoba *et al.*, 2000).

Lundberg e Littmann (2003) mencionam um indivíduo com 360 cm. de comprimento total. Já o peso máximo registrado é de 200 Kg. (Boujard *et al.*, 1997). As fêmeas são com frequência maiores do que os machos (Agudelo-Córdoba *et al.*, 2000). A piraíba também é encontrada junto com a piramutaba e a dourada no estuário. Barthem e Goulding (1997) propuseram para essas duas últimas espécies um modelo migratório onde ocupam, em algum momento, do ciclo de vida, a região do estuário como área de criação, a Amazônia central como área de alimentação dos adultos e subadultos e os tributários do oeste da bacia como áreas de desova. Entretanto, os mesmos autores sugerem que a piraíba realiza migrações, embora existam poucos dados disponíveis para detectar seus movimentos sazonais, além de registrarem que as migrações a partir do estuário não têm sido relatadas para essa espécie. Em suma, o padrão migratório da piraíba ainda é desconhecido (Araújo-Lima e Ruffino, 2003; Barthem e Goulding, 2007).

Desde a década de 70 já havia dúvidas sobre a existência de uma ou mais espécies entre os peixes chamados popularmente de piraíba (Goulding, 1979). Os dados coletados pelo Projeto “Calhamazon”, realizado pela *National Science Foundation* e colaboradores brasileiros (Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia - INPA e Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo - MZUSP), resultaram no registro da existência de uma nova espécie do gênero *Brachyplatystoma*, *B. capapretum* diagnosticada (Lundberg e Akama, 2005) por apresentar as seguintes características: dentição das mandíbulas fina e densamente espaçada, jovens com grandes manchas escuras e redondas nos flancos, adultos com o dorso muito escuro e nadadeira caudal pouco furcada. Indivíduos semelhantes a *B. filamentosum*, que apresentavam o dorso muito

escuro, também foram coletados pelo projeto “PIRADA - Subsídios para o manejo e conservação dos grandes bagres migradores pela caracterização genética dos estoques pesqueiros”, executado entre 1998 e 2008 pelo INPA. Essas amostras foram depositadas no banco de tecidos do referido projeto, algumas acompanhadas com observações, às quais se referem aos indivíduos como “piraíba negra”.

Pesca comercial e identificação de estoques pesqueiros

Existem poucas informações se as espécies pescadas comercialmente na Amazônia pertencem a uma única população, ou a várias populações (Bayley e Petrere, 1989; Batista, 2001), e a definição de grupos intra-específicos é fundamental para o manejo da pesca (Barthem e Fabré, 2004). Barthem *et al.* (1991) sugeriu que distintas populações de bagres se reproduzem nas cabeceiras dos tributários do rio Amazonas, e o conhecimento disponível sobre a identificação de estoques pesqueiros para as espécies de grandes bagres na região, é limitado (FAO, 2000). Indícios de sobreexploração (Petrere *et al.*, 2004), dúvidas sobre a existência de uma ou várias populações da piraíba, e a ocorrência de uma segunda espécie (*B. capapretum*), na bacia amazônica, estimularam a realização de estudos voltados a compreensão da complexidade envolvida com esse recurso, que por sua vez, é de fundamental importância em programas de conservação e manejo da pesca.

Segundo Agostinho e Gomes (2006), o manejo para fins conservacionistas deve viabilizar a manutenção dos limiares demográficos e genéticos necessários para a reprodução e para os processos evolutivos das

espécies, enquanto o manejo para fins pesqueiros deve contribuir para o rendimento sustentável da atividade.

Um problema clássico e frequentemente encontrado no manejo das pescarias é a identificação de grupos geneticamente diferenciados mas tratados como um único estoque. Muitas espécies apresentam uma estrutura genética mais ou menos distinta, em discretas populações. Acredita-se que as espécies de água doce geralmente são divididas em um grande número de populações, que por sua vez são isoladas reprodutivamente em diferentes bacias hidrográficas (Allendorf *et al.*, 1987). Beaumont e Hoare (2003) chamam a atenção para as várias denominações usadas na caracterização desses grupos geneticamente diferenciados, citando as mais comuns utilizadas pelos biólogos pesqueiros, como “variedades”, “raças”, “linhagens”, “populações” e “estoques”. Essa última é a mais freqüente, e pode ser definida como um grupo de peixes explorado por uma arte de pesca específica, ou que existe em uma área em particular. Entretanto, esses autores acreditam que a denominação “estoque” não é apropriada para casos em que a subdivisão genética é quase indistinguível, e preferem referir-se a ela como população, a qual define um grupo intra-específico de indivíduos que se reproduzem ao acaso e que existem em uma área e tempo definidos. Quando a pesca é realizada em uma área onde se encontram várias populações misturadas, é essencial para o manejo pesqueiro identificar a contribuição de cada população na captura (Larkin, 1981). Com base nessa informação, as agências que regulam a pesca possuem mais elementos para sua atuação (Pella *et al.*, 1987). Contudo, na prática, a identificação dessas populações visando o manejo das pescarias não é uma tarefa simples, devido à

indisponibilidade de certos dados biológicos e aos fatores políticos e econômicos envolvidos (Ward, 2000).

Estudos genéticos como ferramentas para a identificação de populações de peixes

Além do DNA contido no núcleo celular, as células animais também apresentam um DNA extra nuclear denominado DNA mitocondrial (DNAmt), que encontra-se no interior das mitocôndrias. O genoma mitocondrial dos peixes contém 13 genes codificadores de proteínas, 2 genes codificadores de RNA ribossômico, 22 genes codificadores de RNA transportador e uma seção não codificante, a região controle ou alça – D, responsável pela replicação do DNAmt e transcrição do RNA. Segundo Ferris e Berg (1987), as maiores taxas de mutação ocorrem na região controle e nos genes codificadores de RNA. A elevada taxa de mutação, somada a características como a herança maternal e a não recombinação durante a meiose, tornam o DNAmt um excelente marcador molecular para estudos populacionais e filogenéticos (Awise *et al.*, 1984; Bermingham, 1990).

Vários são os exemplos de estudos populacionais em peixes, que utilizaram análises baseadas no seqüenciamento da região controle. Martins *et al.* (2003) estudaram a variação do DNAmt em populações de *Leporinus elongatus* (Anostomidae : Characiformes) na bacia do rio Paraná. Na América do Norte, Brown *et al.* (1993) verificaram a existência de duas populações de *Acipenser transmontanus* (Acipenseridae : Acipenseriformes) nos rios Columbia e Fraser. Para *Rhodeus ocellatus kurumeus* (Cyprinidae : Cypriniformes), Kawamura *et al.* (2001) encontraram baixa diversidade

genética nas populações estudadas no Japão. Sato *et al.* (2001) encontraram diferenças populacionais para *Oncorhynchus keta* (Salmonidae : Salmoniformes). Garber *et al.* (2004) verificaram a existência de apenas uma população de *Lutjanus campechanus* (Perciformes : Lutjanidae) habitando todo o Golfo do México e a costa da Flórida. Os corredores de migração de *Xiphias gladius* (Perciformes : Xiphiidae) no oceano Pacífico foram inferidos por Reeb *et al.* (2000).

Para o estudo da diversidade genética dos siluriformes amazônicos, diferentes tipos de marcadores moleculares já foram utilizados, e entre eles, o seqüenciamento da região controle do DNA mitocondrial. A estrutura genética do surubim (*Pseudoplatystoma fasciatum*) e do caparari (*Pseudoplatystoma tigrinum*) foi investigada na bacia amazônica e nos rios Orinoco e Magdalena através de marcadores isoenzimáticos e RAPD. Diferenças populacionais para o surubim ocorreram entre as duas bacias. As isozimas revelaram diferenças entre os indivíduos do caparari das bacias do Orinoco e Amazonas. Os resultados das isozimas e do RAPD indicaram a existência de duas populações de surubim na bacia amazônica (Ramirez, 2001). A variabilidade genética do surubim no rio Magdalena também foi investigada por Gallo e Díaz-Sarmiento (2003) através de isozimas, sugerindo uma única população da espécie habitando a bacia. Características genéticas (fórmula cariotípica, número fundamental e NORs) e bioquímicas (eletroforese de hemoglobina e enzimas) da piracatinga (*Calophysus macropterus*) nos rios Solimões e Negro, demonstram que para essa espécie existe apenas uma população habitando a área (Ramirez, 1993). Batista e Alves-Gomes (2006) utilizaram a região controle do DNA mitocondrial para estudar a estrutura genética da dourada (*B.*

rousseauxii) ao longo do eixo Amazonas/Solimões e observaram que a variabilidade genética dos peixes diminuiu à medida em que se distanciaram da região de Belém e se aproximavam da região de Letícia, sugerindo que existem populações distintas migrando para os diferentes tributários das cabeceiras do Solimões/Amazonas. Utilizando alozimas e DNA mitocondrial, Coronel *et al.* (2004) encontraram alta variabilidade genética no estudo populacional da dourada e do surubim nos rios Ichilo e Beni na Bolívia. Formiga-Aquino (2004), além de encontrar alta variabilidade genética para a piramutaba no eixo Amazonas/Solimões, verificou que esta espécie está representada por uma única população migradora na calha principal da bacia, revelada por meio da análise das sequências da região controle do DNA mitocondrial. Recentemente, por meio do seqüenciamento da região controle e do gene *ATPase 6* do DNA mitocondrial, Boni (2008) confirmou geneticamente a existência de duas espécies de jaú, o *Zungaro zungaro* na bacia amazônica e o *Zungaro jahu* nas bacias dos rios Paraná-Paraguai. Torrico *et al.* (2009) realizaram um estudo sobre a filogenia do gênero *Pseudoplatystoma* com base no seqüenciamento da região controle do DNA mitocondrial.

Essa tese divide-se em dois capítulos. O primeiro capítulo aborda a diferença genética entre as sequências da região controle do DNA mitocondrial de *B. filamentosum* e *B. capapretum*, utilizando a caracterização molecular como forma de estimar as proporções das duas espécies capturadas pela pesca comercial nos rios de águas brancas da Amazônia brasileira. O segundo capítulo aborda a estrutura genética de *B. filamentosum* em rios de águas brancas, claras e pretas da Amazônia brasileira, com o uso do mesmo marcador molecular.

Após segundo capítulo, foram escritas as considerações finais do trabalho.

BIBLIOGRAFIA CITADA

- Agostinho, A. A.; Gomes, L. C. 2006. O Manejo da Pesca em Reservatórios da Bacia do Alto rio Paraná: Avaliação e Perspectivas. *In: Nogueira, M.C.; Henry, R.; Jorcin, A. (Eds). Ecologia de Reservatórios. São Carlos, Rima, p. 23 – 55.*
- Agudelo-Córdoba, E.; Y. Salinas-Coy; C. L. Sánchez; Muñoz-Sosa, D. L.; Alonso-González, J. C.; Arteaga-Díaz, M. E. A; Rodríguez-Pietro, O. J. R.; Anzola-Potes, N. R.; Acosta-Muñoz, L. E.; Núñez-Avellaneda, M.; Valdés-Carrillo, H. 2000. *Bagres de la amazonía colombiana: Un Recurso sin Fronteras*. Instituto Amazónico de Investigaciones Científicas-SINCHI. Bogota. Colombia. 253 p.
- Allendorf, F.W.; Ryman, N.; Utter, F. M. 1987. Genetics and Fishery Management, Past, Present, and Future. *In: Ryman, N., Utter, F. (Eds). Population Genetics & Fishery Management*. University of Washington Press, Seattle. 1 -19.
- Araújo-Lima, C. A. R. M., Ruffino, M. L. 2003. Migratory Fishes of the Brazilian Amazon. *In: Carosfeld, J.; Harvey, B.; Baer, A.; Ross, C. (Eds). Migratory Fishes of the South America: Biology, Social Importance and Conservation Status*, World Bank Technical Paper, Victoria, 380 p.
- Awise, J. C., Neigel, J. E., Arnold, J. 1984. Demographic influences on mitochondrial DNA lineage survivorship in animal populations. *Journal of Molecular Evolution.*, 20: 99 -105.

- Barthem, R. B., Fabré, N. N. 2004. Biologia e Diversidade dos Recursos Pesqueiros da Amazônia. In: Ruffino, M. L. (Eds). *A Pesca e os Recursos Pesqueiros na Amazônia Brasileira*. Manaus, IBAMA/ProVárzea. p. 17 – 62.
- Barthem, R. B., Goulding, M. 1997. *Os Bagres Balizadores: Ecologia, Migração e Conservação de Peixes Amazônicos*. Sociedade Civil Mamirauá; CNPq, Brasília. 140 pp.
- Barthem, R. B., Ribeiro, M. C. L. B., Petrere, M. 1991. Life Strategies of some Long-Distance Migratory Catfish in Relation to Hydroelectric Dams in the Amazon Basin. *Biological Conservation*, 55: 339 – 345.
- Batista, J. S. 2001. *Estimativa da variabilidade genética intra-específica da dourada - Brachyplatystoma flavicans Castelnau 1855 (Pimelodidae - Siluriformes) no Sistema Estuário-Amazonas-Solimões*. Dissertação de Mestrado. INPA/FUA. Manaus. 97 p.
- 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 Resesarch*, 5(4): 723-740.
- Batista, V. S., Issac, V. J., Vianna, J. P. 2004. Exploração e manejo dos recursos pesqueiros da Amazônia. In: Ruffino, M. L. (Eds). *A Pesca e os Recursos Pesqueiros na Amazônia Brasileira*. Manaus, IBAMA/ProVárzea. pp. 63 – 151.
- Bayley, P. N., Petrere, M. 1989. Amazon fisheries : assessment methods, current status and management options. In: Dodge, D. (Eds). *Especial*

- publications of the Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences.*
106 : 385 – 398.
- Beaumont, A. R.; Hoare, K. 2003. *Biotechnology and Genetics in Fisheries and Aquaculture*. Blackwell Science, Oxford. 155 p.
- Bermingham, E. 1990. Mitochondrial DNA and the Analysis of Fish Population Structure. In: Whitmore, D. H. (Eds). *Electrophoretic and Isoelectric Focusing Techniques in Fisheries Management*. CRC Press, Boca Raton. 349 p.
- Boni, T. A. 2008. *Comparação Molecular de Populações Naturais de Jaú (Zungaro) (Pisces, Siluriformes, Pimelodidae) das Bacias Amazônica e do Paraná –Paraguai*. Tese de Doutorado. Universidade estadual de Maringá. Maringá. 59 p.
- Boujard, T., Pascal, M., Meunier, J. F., Le Bail, P. Y. 1997. *Poissons de Guyane. Guide Écologique de L'approuague et de la Réserve des Nourages*. Institut National de La Recherche Agronomique, Paris, 219 p.
- Brown, J. R., Beckenback, A. T., Smith, M. J. 1993. Intraespecific DNA sequence variation of the mitochondrial control region of White Sturgeon (*Acipenser transmontanus*). *Molecular Biology Evolution*, 10(2): 326 -341.
- Buitrago–Suárez, U.A.; Burr, B. M. 2007. Taxonomy of the catfish genus *Pseudoplatystoma* Bleeker (Siluriformes: Pimelodidae) with recognition of eight species. *Zootaxa*, 1512: 1–38.

- Burgess, W. E. 1989. *An Atlas of freshwater marine catfishes*. T. F. H. Plaza Neptune, City, N.J. USA. 784 p.
- Revista CACEX 1988. Perfil estatístico das espécies mais vendidas. Rio de Janeiro, Banco do Brasil. Ano 23. Junho. nº 1.075.
- Coronel, J. S., Maes, G. E., Claus, S., Van Damme, P. A., Volckaert, F. A. M. 2004. Differential population history in the migratory catfishes *Brachyplatystoma flavicans* and *Pseudoplatystoma fasciatum* (Pimelodidae) from the Bolivian Amazon assessed with nuclear and mitochondrial DNA markers. *Journal of Fish Biology*, 65: 859 – 868.
- Dias Neto, J., Damasceno, F. G., Pontes, A. C. P. 1985. Biologia e Pesca da Piramutaba, *Brachyplatystoma vaillantii* Valenciennes, na região Norte do Brasil. SUDEPE, *Série Documentos Técnicos*, 35: 47 – 112.
- FAO. 2000. *Informe del taller regional sobre manejo de lãs pesquerias de bagres migrat6rios del amazonas*. Informe de Campo F-5, FAO. Roma, 99 p.
- Ferris, S. D., Berg, W. J. 1987. The Utility of Mitochondrial DNA in Fish Genetics and Fishery Management. *In*: Ryman, N., Utter, F. (Eds). *Population Genetics & Fishery Management*. University of Washington Press, Seattle. 277 -299.
- Formiga-Aquino, K. 2004. *Variabilidade gen6tica da piramutaba - Brachyplatystoma vaillantii (Valenciennes, 1840) (Siluriformes:Pimelodidae) no sistema Estu6rio-Amazonas-Solim6es*. Disserta73o de Mestrado. INPA/FUA. Manaus. 76 p.

- Gallo, H., Díaz-Sarmiento, J. 2003. Variabilidad genética del bagre rayado *Pseudoplatystoma fasciatum* (Pises: Pimelodidae) en el río Magdalena (Colombia). *Revista de La academia de ciências exactas físicas e naturais*, 27(105): 599 – 606.
- Garber, A. F., Tringali, M. D., Stuck, K. C. 2004. Population Structure and Variation in Red Snapper (*Lutjanus campechanus*) from the Gulf of Mexico and Atlantic Coast of Florida as Determined from Mitochondrial DNA Control Region Sequence. *Marine Biotechnology*, 6: 175 – 185.
- Goulding, M. 1979. *Ecologia da Pesca no Rio Madeira*. CNPq/INPA. Manaus. 172 p.
- Kawamura, K., Nagata, Y., Ohtaka, H., Kanoh, Y., Kitamura, J. 2001. Genetic diversity in the Japanese rosy bitterling, *Rhodeus ocellatus kurumeus* (Cyprinidae). *Ichthyological Research*, 48: 369 – 378.
- Larkin, P.A. 1981. A perspective on population genetics and salmon management. Canadian. *Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 38:1469 – 1475.
- Lundberg, J. G., Akama, A. 2005. *Brachyplatystoma capapretum*: a New Species of Goliath Catfish from the Amazon Basin, with a reclassification of Allied Catfishes (Siluriformes: Pimelodidae). *Copeia*, 3: 492 – 516.
- Lundberg, J. G., Littmann, M. W. 2003. Family Pimelodidae. *In*: Reis, R. E., Kullander, S. O. Ferraris, C.J. (Eds). *Check list of the freshwater fishes of South and Central America*. Porto Alegre, EDIPUCRS. pp. 432 – 435.

- Martins, C., Wasko, A.P., Oliveira, C. Foresti, F. 2003. Mitochondrial DNA variation in wild populations of *Leporinus elongatus* from the Paraná River basin. *Genetics and Molecular Biology*, 26(1): 33 – 38.
- Pella, J. J., Milner, G. B. 1987. Use of Genetic Marks in Stock Composition Analysis. In: Ryman, N., Utter, F. (Eds). *Population Genetics & Fishery Management*. University of Washington Press, Seattle. 247 - 275.
- Petriere, M., Barthem, R. B., Córdoba, E. A., Gómez, B. C. 2004. Review of the large catfish fisheries in the upper Amazon and stock depletion of Piraíba (*Brachyplatystoma filamentosum* Lichtenstein). *Reviews in Fish Biology and Fisheries* , 14(4): 403 – 414.
- Ramírez, G. H. 1993. *Características genéticas, moleculares e fisiológicas de Collophysus macropterus (Siluriformes, Pimelodidae) do Rio Solimões e do Rio Negro (Amazônia Central)*. Dissertação de Mestrado. INPA/FUA. Manaus. 111 p.
- Ramírez, G. H. 2001. *Diferenciação genética de populações de Surubim (Pseudoplatystoma fasciatum) e de Caparari (Pseudoplatystoma tigrinum) nas bacias Magdalena, Orinoco e Amazonas*. Tese de Doutorado. INPA/UFUA. Manaus. 114 p.
- Reeb, C. A., Arcangeli, L., Block, B. A. 2000. Structure and migration corridors in Pacific populations of the Swordfish *Xiphias gladius*, as inferred through analyses of mitochondrial DNA. *Marine Biology*, 136: 1123 – 1131.

- Ruffino, M. L. 2000. Manejo dos Recursos pesqueiros no Médio Amazonas. *In: IBAMA. Recursos Pesqueiros do médio Amazonas: Biologia e Estatística Pesqueira*. Brasília. pp. 115 – 140.
- Ruffino, M. L., Barthem, R. B., Fischer, C. F. A. 2000. Perspectivas do Manejo dos Bagres Migradores na Amazônia. *In: IBAMA. Recursos Pesqueiros do médio Amazonas: Biologia e Estatística Pesqueira*, Brasília. pp. 115 – 140.
- Santos, G. M., Ferreira, E. J. G. 1999. Peixes da Bacia Amazônica. *In: Lowe-McConnell, R.H. (Eds). Estudos Ecológicos de Comunidades de Peixes tropicais*. São Paulo, EDUSP, pp. 345 – 373.
- Santos, G. M., Jegu, M. 2004. Piraíba, o peixe gigante. *Ciência Hoje*, 34: 69 - 71.
- Sato, S., Ando, J., Ando, H., Urawa, S., Urano, A., Abe, S. 2001. Genetic Variation among Japanese Populations of Chum Salmon Inferred from the Nucleotide Sequences of the Mitochondrial DNA Control Region. *Zoological Science*, 18: 99 – 106.
- Torraco, J.P.; Hubert N.; Desmarais E.; Duponchelle F.; Nuñez Rodriguez, J.; Montoya-Burgos, J.; Garcia Davila, C.; Carvajal-Vallejos, F.M.; Grajales, A.A.; Bonhomme, F.; Renno, J.F. 2009. Molecular phylogeny of the genus *Pseudoplatystoma* (Bleeker, 1862): biogeographic and evolutionary implications. *Molecular phylogenetics and evolution*, 51(3): 88-94.
- Ward, R. D. 2000. Genetics in fisheries management. *Hydrobiologia*, 420: 191 – 201.

CAPÍTULO I

Estimativa da divergência genética e frequências médias de captura das piraíbas *Brachyplatystoma filamentosum* e *B. capapretum* em rios de águas brancas da Amazônia brasileira.

RESUMO

Duas espécies de peixes popularmente conhecidas como piraíba (*Brachyplatystoma filamentosum* e *B. capapretum*; Siluriformes: Pimelodidae), oriundas dos desembarques pesqueiros realizados em nove regiões inseridas em calhas de rios de águas brancas da Amazônia brasileira, foram caracterizadas geneticamente por meio do sequenciamento da região controle do DNA mitocondrial. Para um total de 337 amostras, foi verificado que em média, na totalidade da área amostrada 66,81% dos peixes pertenciam à espécie *B. filamentosum* e 33,19% a espécie *B. capapretum*. Os valores de diversidade haplotípica foram altos em ambas as espécies; entretanto, a diversidade nucleotídica foi maior em *B. filamentosum* ($\pi = 0,0118$) quando comparada a *B. capapretum* ($\pi = 0,0041$). Esses valores foram comparados aos valores de diversidade nucleotídica da região controle de outras espécies sobreexploradas ou ameaçadas de sobreexploração na Amazônia, e sugerem que do ponto de vista genético, *B. filamentosum* e principalmente *B. capapretum* necessitam de medidas urgentes de manejo visando sua conservação. O modelo de substituição nucleotídica de Tamura-Nei revelou que a divergência genética entre as duas espécies foi de 0,1018. Esse valor poderá ser usado como referência para estudos relacionados às distâncias genéticas de outras espécies do gênero *Brachyplatystoma*.

Palavras-chave: Bagre, peixe, DNAmt, região controle, pesca, água doce.

Estimative of genetic divergence and average frequency of catching piraíbas Brachyplatystoma filamentosum and B. capapretum in white water rivers of the Brazilian Amazon.

ABSTRACT

Two fishes species popularly known as piraíba (Brachyplatystoma filamentosum and Brachyplatystoma capapretum, Siluriformes: Pimelodidae) originated from fishery landings held in 9 regions inserted in white water rivers basins of the Brazilian Amazon, were genetically characterized through mitochondrial DNA control region. For a total of 337 samples it was verified that, 66.81% of the fishes belonged to B. filamentosum species and 33.19% to B. capapretum species. The values of haplotypic diversity were high for both species. However the nucleotide diversity was higher in B. filamentosum ($\pi = 0.0118$) when compared to B. capapretum ($\pi = 0.0041$). These values were compared to the nucleotide diversity values of other overfished species or overfishing-threatened species in Amazon and suggesting that B. filamentosum and, more specifically, B. capapretum needs urgent management actions of conservation. The nucleotide substitution model Tamura-Nei showed that the genetic divergence between these species was 0.1018. This value can be used as a reference for genetic distance studies for other Brachyplatystoma species.

Key words: Catfish, finfish, mtDNA, control region, fishery, freshwater.

INTRODUÇÃO

A bacia amazônica possui a maior diversidade de peixes de água doce do mundo, estimando-se a existência de até 5.000 espécies. Entretanto, a atividade pesqueira na região explora menos de 50 espécies, e entre essas, sete espécies de bagres migradoras de médio a grande porte, do gênero *Brachyplatystoma* (Siluriformes: Pimelodidae) (Barthem e Goulding, 1997; Santos e Ferreira, 1999), que podem ser caracterizadas como de elevada importância socioeconômica (Carvalho e Barros, 2008). A pesca dos grandes bagres é compartilhada por países como o Brasil, Peru, Colômbia e Bolívia. A Comissão da Pesca Continental para a América Latina (COPESCAL) apontou entre outros aspectos, a necessidade de identificação de seus possíveis estoques pesqueiros (FAO, 2000), sendo que a delimitação desses é crucial para subsidiar as ações de manejo e conservação (Vrijenhoek, 1998; Ward, 2000). Na Amazônia, a maior produção pesqueira ocorre em rios de águas brancas, em comparação a outros rios da região, de águas claras e pretas (Santos e Santos, 2005).

A piraíba ou filhote (*Brachyplatystoma filamentosum*) é considerada o maior predador dos canais dos rios amazônicos e frequentemente ultrapassa 100 kg de peso. Desde a década de 1970 já havia dúvidas sobre a possível existência de uma ou mais espécies de piraíba. Em 2005, *Brachyplatystoma capapretum*, conhecida como piraíba negra, foi descrita com base em caracteres morfológicos (Lundberg e Akama, 2005). No presente texto, o termo “piraíba” fará referência às duas espécies em conjunto.

Embora seja possível a distinção entre as duas espécies pela observação atenta das diferenças entre os dentes da pré-maxila, é comum os peixes chegarem aos portos de desembarque sem a cabeça, o que dificulta a sua identificação. Além disso, os setores pesqueiro e governamental ainda não se adaptaram à nova revisão taxonômica e consideram erroneamente as duas espécies, para fins de comercialização e estatística pesqueira, apenas como *B. filamentosum*. Com base em amostras contendo as duas espécies misturadas, foi gerado todo o conhecimento disponível sobre a biologia e dinâmica populacional da “piraíba”. Sua carne é classificada pelo mercado como sendo de primeira classe, mas possíveis diferenças nos padrões migratórios e na importância relativa de *B. filamentosum* e *B. capapretum* para a pesca comercial ainda são desconhecidos (Araújo-Lima e Ruffino, 2003; Barthem e Goulding, 2007). Entretanto, existem observações quanto à distribuição geográfica das duas espécies que indicam a presença de *B. filamentosum* em toda a extensão da bacia amazônica, enquanto *B. capapretum* parece ocorrer apenas em tributários de águas brancas e pretas, abaixo da cota altimétrica de 200m acima do nível do mar (Barthem e Goulding, 1997; Lundberg e Akama, 2005).

Dessa maneira, por meio da análise de sequências da região controle do DNA mitocondrial de *B. filamentosum* e *B. capapretum*, os objetivos do presente trabalho foram estimar: i) a frequência média de cada espécie entre as piraibas capturadas pela pesca comercial em rios de água branca da Amazônia brasileira; ii) a variabilidade genética de cada espécie; e iii) a divergência genética entre as duas espécies. Os resultados obtidos poderão

respaldar ações de manejo pesqueiro e embasar estudos sobre a biologia de *B. filamentosum* e *B. capapretum*.

MATERIAL E MÉTODOS

Coleta das amostras e seqüenciamento da região controle do DNA mitocondrial

Um total de 337 amostras (Tabela 1) de tecidos musculares ou nadadeiras de peixes comercializados sob o nome popular de “piraíba”, foram coletadas em 14 portos de desembarque pesqueiro e de comercialização do pescado ao longo de rios de água branca da bacia amazônica, no Brasil, entre os anos de 1998 e 2008. As amostragens foram conduzidas no âmbito do Projeto “Subsídios para manejo e conservação dos grandes bagres migradores na Amazônia pela identificação e caracterização genética dos estoques pesqueiros” (PROJETO PIRADA), realizado pelo Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA). Foram realizadas 48 campanhas amostrais em intervalos temporais diversos, adequados ao esforço logístico necessário para a coleta das amostras na grande extensão geográfica da área estudada. A coleta das amostras foi autorizada pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) por meio do processo nº 02005.001811/04-65. Durante as coletas, foram medidos os comprimentos furcais de 71,81% dos peixes amostrados, os quais estavam sem cabeça e eviscerados. As amostras foram conservadas em álcool 90%, numeradas e depositadas no banco de tecidos do Laboratório Temático de Biologia Molecular (LTBM/INPA).

Os 14 locais amostrados foram agrupados em nove regiões (Fig. 1) caracterizadas pelas sub-bacias hidrográficas às quais estavam inseridas ou

pela localização em relação ao eixo principal do rio Solimões/Amazonas (Tabela 1).

Embora exista uma classificação diferenciada para o rio Branco relativa à condutividade da água (Ferreira *et al.*, 2007), no presente trabalho esse foi considerado como de águas brancas, a cor associada a rios com elevada quantidade de sólidos em suspensão.

Não foi possível determinar as datas exatas em que os exemplares foram retirados da água e quantificar o tempo decorrido entre a pesca, o armazenamento, venda e coleta das amostras. Entretanto, para assegurar que as amostras eram oriundas do local amostrado, os pescadores e vendedores foram questionados acerca da área de pesca de origem dos exemplares capturados.

A extração do DNA total, a amplificação e o seqüenciamento completo da região controle do DNA mitocondrial foram realizados seguindo os procedimentos e primers descritos por Batista e Alves Gomes (2006).

Identificação e alinhamento das sequências

Seis sequências de referência (três de cada espécie) foram obtidas de peixes diagnosticados morfológicamente pelo Dr. John Lundberg, como *B. filamentosum* ou *B. capapretum*. A identificação das espécies às quais a demais sequências pertenciam, foi realizada pela comparação baseada em 60 mutações características de cada espécie que foram observadas nas sequências de referência (Tabela 2).

Após identificadas as espécies às quais pertenciam as 337 sequências, essas foram alinhadas (incluindo as oito sequências de referência) com o

auxílio dos programas computacionais BioEdit 7.0.9.0 (Hall, 1999) e Chromas 2.24 (Technelisyum, 1998). Inicialmente as sequências foram alinhadas separadamente para cada espécie. Em seguida todas as sequências foram agrupadas em uma matriz, na qual foi feito o alinhamento final entre as duas espécies com a inserção de 5 *gaps* em *B. filamentosum* e 6 *gaps* em *B. capapretum*, resultando em uma matriz com 337 sequências de 919 sítios.

Tabela 1 – Regiões e seus respectivos locais de coleta, suas localizações político-geográficas e o número de amostras de piraíba (*Brachyplatystoma ssp*) coletadas por local.

Região	Local	Estado	Latitude Longitude	n° de amostras de piraíba
Belém Eixo Solimões/Amazonas	Belém	PA	01°27'18,04"S 48°30'08,90"W	36
Santarém Eixo Solimões/Amazonas	Santarém	PA	02°26'25,58"S 54°41'54,70"W	42
Manaus Eixo Solimões/Amazonas	Manaus	AM	03°05'39,60"S 60°01'33,63"W	28
Tefé Eixo Solimões/Amazonas	Tefé	AM	03°18'22,60"S 64°45'33,50"W	18
	Japurá	AM	01°49'34,81"S 66°35'58,32"W	64
Tabatinga Eixo Solimões/Amazonas	Tabatinga	AM	04°15'11,62"S 69°56'19,36"W	25
Rio Branco	Boa Vista	RR	02°50'23,75"N 60°39'43,61"W	21
Rio Madeira	Porto Velho	RO	08°45'42,85"S 63°54'06,77"W	51
	Guajará Mirim	RO	10°47'27,28"S 65°19'56,74"W	04
	Manicoré	AM	05°48'33,77"S 61°18'01,77"W	02
Rio Purus	Lábrea	AM	07°12'20,72"S 64°50'36,99"W	30
	Boca do Acre	AM	08°43'45,81"S 67°24'29,67"W	03
Rio Juruá	Cruzeiro do Sul	AC	07°38'10,54"S 72°40'02,86"W	05
	Eirunepé	AM	06°37'40,87"S 69°54'04,24"W	08
Total				337

Tabela 2 – Mutações nucleotídicas da região controle do DNA mitocondrial de *B. filamentosum* e *B. capapretum* utilizadas na identificação das sequências e suas respectivas espécies.

N° da amostra	Espécie	Posição do sítio nucleotídico																													
		0 0 0 0 0 0 0 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 2 2 2 2 2 2 3 3 3																													
		0 1 1 1 2 2 8 0 1 1 2 3 5 5 5 5 6 6 6 6 7 4 4 6 7 8 9 2 2 3																													
		5 3 5 9 3 4 9 0 1 9 1 6 1 2 8 9 1 2 5 6 8 5 6 2 4 1 0 0 9 1																													
0353	<i>B. filamentosum</i>	T	T	T	T	T	G	C	C	G	A	C	C	A	C	C	A	A	A	C	C	C	C	C	C	G	A	A	C	T	
0354	<i>B. filamentosum</i>	T	T	T	T	T	G	C	C	G	A	C	C	A	C	C	A	A	A	C	C	C	C	C	C	G	A	A	C	T	
0368	<i>B. filamentosum</i>	T	T	T	T	T	G	C	C	G	A	C	C	A	C	C	A	A	A	C	C	C	C	C	C	G	A	A	C	T	
0370	<i>B. capapretum</i>	C	C	C	C	C	A	T	G	T	G	T	T	G	T	T	G	T	C	T	T	A	T	T	T	T	A	G	T	T	A
0363	<i>B. capapretum</i>	C	C	C	C	C	A	T	G	T	G	T	T	G	T	T	G	T	C	T	T	A	T	T	T	T	A	G	T	T	A
0369	<i>B. capapretum</i>	C	C	C	C	C	A	T	G	T	G	T	T	G	T	T	G	T	C	T	T	A	T	T	T	T	A	G	T	T	A

N° da amostra	Espécie	Posição do sítio nucleotídico																													
		3 3 3 3 4 4 4 4 5 5 5 6 6 6 6 6 6 6 6 6 7 7 7 7 7 7 8 8 8																													
		3 3 3 6 3 5 5 5 4 6 9 0 0 0 2 4 5 6 6 7 8 0 1 2 4 5 5 0 2 3																													
		3 4 8 9 4 4 5 6 9 5 0 5 8 9 8 8 4 7 8 2 6 9 7 7 3 0 1 0 2 1																													
0353	<i>B. filamentosum</i>	A	T	C	C	G	G	C	C	T	T	A	A	G	A	A	A	A	A	T	A	T	C	C	A	T	G	C	C	C	T
0354	<i>B. filamentosum</i>	A	T	C	C	G	G	C	C	T	T	A	A	G	A	A	A	A	A	T	A	T	C	C	A	T	G	C	C	C	T
0368	<i>B. filamentosum</i>	A	T	C	C	G	G	C	C	T	T	A	A	G	A	A	A	A	A	T	A	T	C	C	A	T	G	C	C	C	T
0370	<i>B. capapretum</i>	G	C	T	T	A	C	A	T	C	C	G	G	A	T	G	G	G	T	C	G	C	T	T	G	C	A	T	T	T	C
0363	<i>B. capapretum</i>	G	C	T	T	A	C	A	T	C	C	G	G	A	T	G	G	G	T	C	G	C	T	T	G	C	A	T	T	T	C
0369	<i>B. capapretum</i>	G	C	T	T	A	C	A	T	C	C	G	G	A	T	G	G	G	T	C	G	C	T	T	G	C	A	T	T	T	C

Estimativa da frequência média de *B. filamentosum* e *B. capapretum* entre as piraibas capturadas pela pesca comercial em rios de águas brancas da Amazônia brasileira

Para cada local amostrado foi identificado, por meio das sequências de DNA processadas, o número de indivíduos de cada espécie. Posteriormente esses números foram agrupados por região e usados para calcular a frequência de cada espécie no desembarque pesqueiro de cada região (Alcântara Filho, 1988). A média das frequências de cada espécie, considerando todas as regiões, foi assumida como a estimativa da frequência média de cada espécie entre as piraibas capturadas pela pesca comercial, em rios de águas brancas da Amazônia brasileira.

Após a identificação da espécie, os comprimentos furcais medidos nas coletas foram agrupados por espécie e as suas médias comparadas por meio do teste t com significância estatística de 5%.

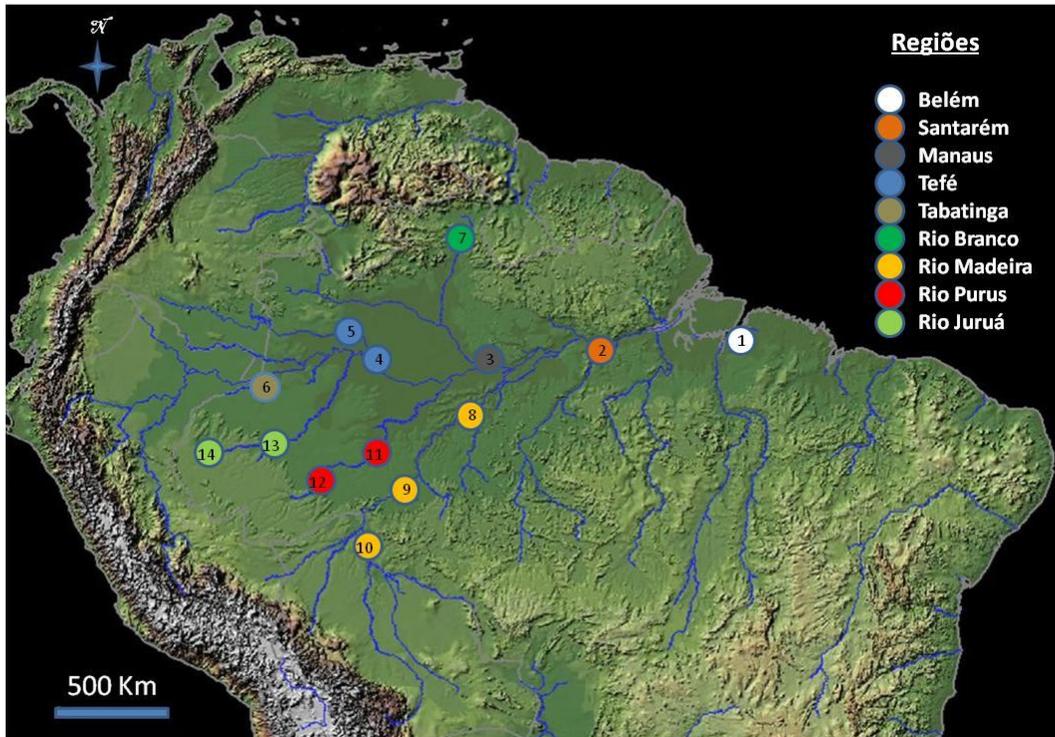


Figura 1 – Locais amostrados e seus respectivos agrupamentos por região indicados pelas cores dos marcadores: 1) Belém; 2) Santarém; 3) Manaus; 4) Tefé; 5) Japurá; 6) Tabatinga; 7) Boa Vista; 8) Manicoré; 9) Porto Velho; 10) Guajará Mirim; 11) Lábrea; 12) Boca do Acre; 13) Eirunepé e 14) Cruzeiro do Sul.

Estimativa da diversidade genética das espécies

Com auxílio do programa computacional Arlequin 3.11 (Excoffier *et al.*, 2005), foram estimados os seguintes parâmetros genéticos para a região controle do DNA mitocondrial de cada espécie: o número de haplótipos, o número de haplótipos únicos, a diversidade haplotípica (H_d : probabilidade de duas sequências serem diferentes em uma população) (Nei, 1987a), a diversidade nucleotídica (π : número de diferenças nucleotídicas por sítio entre as sequências) (Nei 1987a), o número total de sítios, o número de sítios

polimórficos (S), o número de transições (TS), o número de transversões (TV), o número de *indels* e a composição nucleotídica.

Estimativa da divergência genética entre as espécies

O modelo de substituição nucleotídica para a região controle do DNA mitocondrial, considerando as duas espécies em conjunto, foi elaborado por meio do programa computacional Modeltest (Posada e Crandall, 1998). O modelo TN93 (Tamura e Nei, 1993) e o valor da distribuição gamma ($\Gamma = 0,3602$), foram utilizados para estimar a média (\pm e. p.) das divergências genéticas par a par inter e intraespecífica, com o uso do programa computacional MEGA 4.0 (Tamura *et al.*, 2007).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Estimativa da frequência média de *B. filamentosum* e *B. capapretum*, entre as piraíbas capturadas pela pesca comercial em rios de águas brancas da Amazônia brasileira

O número de amostras de *B. filamentosum* e *B. capapretum* identificadas por meio da região controle do DNA mitocondrial, para cada local e agrupadas por região, são apresentados na Tabela 3. As frequências de cada espécie por região, e a estimativa da frequência média de cada espécie entre as piraíbas capturadas pela pesca comercial em rios de águas brancas da Amazônia brasileira, são apresentadas na Figura 2. Em todas as regiões, exceto em Manaus e no rio Purus, a frequência de *B. filamentosum* foi superior à frequência de *B. capapretum*. O valor médio das frequências indicou que de cada três piraíbas comercializadas, aproximadamente duas são *B. filamentosum* e uma *B. capapretum*.

O seqüenciamento da região controle e de genes mitocondriais é empregado para detectar diferenças populacionais e elucidar relações filogenéticas em peixes, além de identificar espécies e produtos oriundos da pesca (Fraga *et al.*, 2007; Gil, 2007; Hubert *et al.*, 2008; Pappalardo *et al.*, 2008). No presente trabalho, o sequenciamento da região controle do DNA mitocondrial mostrou bom potencial para revelar a composição específica da piraíba comercializada nos rios de águas brancas da Amazônia brasileira, que até então era desconhecida. O mesmo marcador molecular foi usado com sucesso para inferir a filogeografia da dourada (*Brachyplatystoma rouseauxxi*),

e a panmixia da piramutaba (*Brachyplatystoma vaillantii*) e do tambaqui (*Colossoma macropomum*), no eixo dos rios Solimões/Amazonas (Formiga-Aquino, 2004; Batista e Alves Gomes 2006; Santos *et al.*, 2007).

Tabela 3 – Número de amostras identificadas como sendo de *B. filamentosum* e *B. capapretum* para cada região e seus respectivos locais.

Região	Local	n° de amostras por local		n° de amostras por região	
		<i>B. filam.</i>	<i>B. capap.</i>	<i>B. filam.</i>	<i>B. capap.</i>
Belém	Belém	31	05	31	05
Eixo Solimões/Amazonas	Santarém	25	17	25	17
Manaus	Manaus	06	22	06	22
Eixo Solimões/Amazonas	Tefé	12	06	56	26
	Japurá	44	20		
Tabatinga	Tabatinga	15	10	15	10
Eixo Solimões/Amazonas	Boa Vista	18	03	18	03
Rio Branco	Porto Velho	43	08	47	10
Rio Madeira	Guajará Mirim	04	-		
	Manicoré	-	02		
Rio Purus	Lábrea	15	15	15	18
	Boca do Acre	-	03		
Rio Juruá	Cruzeiro do Sul	05	-	12	01
	Eirunepé	07	01		
			Total	225	112

Mais de 50 % das capturas da piraíba na Amazônia ocorrem na região fronteira entre o Brasil, Peru e Colômbia, e 90% dessas são comercializadas na cidade colombiana de Letícia, vizinha a cidade brasileira de Tabatinga. Nesse local, a produção anual de piraíba declinou de 4000 toneladas em 1983 para valores insignificantes em 2000, indicando a possibilidade de sobreexploração (Petrere 2004, Barthem e Goulding, 2007).

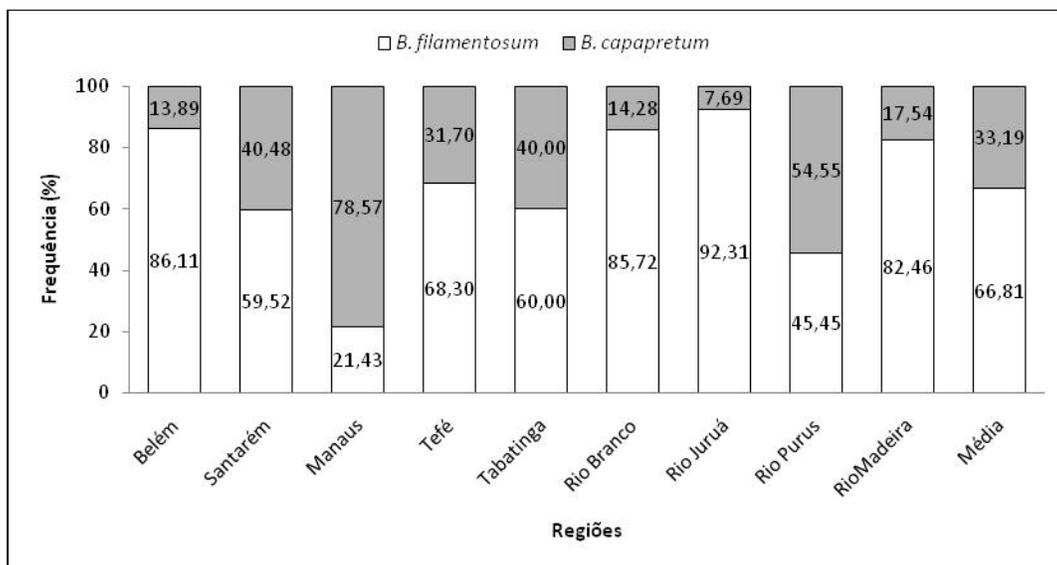


Figura 2 – Frequências de *B. filamentosum* e *B. capapretum* por região, e a estimativa da frequência média de cada espécie entre as piraibas comercializadas nos rios de águas brancas da Amazônia brasileira, reveladas pelo sequenciamento da região controle do DNA mitocondrial.

Os valores médios das proporções entre os desembarques de *B. filamentosum* e *B. capapretum* obtidos no presente trabalho, permitiram uma estimativa da produção brasileira dessas espécies, quando os aplicamos aos dados oficiais da estatística pesqueira divulgados pelo Instituto Brasileiro de

Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) entre 2001 e 2004 (Ruffino *et al.*, 2002, 2005, 2006; Thomé-Souza, 2007). Desse modo, estimamos que aproximadamente 670 toneladas de *B. capapretum* (33% do total capturado como “piraíba”) podem ter sido comercializadas como *B. filamentosum* naquele período, nos estados do Amazonas e Pará. Devido à interrupção do sistema de coleta de dados da estatística pesqueira em 2005 (Ruffino, 2008), não foi possível estimar essa produção relativa a partir de 2004.

A piraíba é capturada principalmente, com o uso de dois apetrechos de pesca, o espinhel e a rede de emalhe. Para o mercado, como não há distinção entre *B. filamentosum* e *B. capapretum*, inexistente a preferência pela carne ou diferenças de preço entre ambas. Assim, assumindo que na ocasião da captura, o esforço de pesca e a seletividade dos apetrechos foram os mesmos para as duas espécies, consideramos que esses fatores não influenciaram os resultados das frequências por região e suas médias estimadas, sendo esses uma expressão aproximada das frequências encontradas no ambiente natural abrangido pela área estudada. Porém, é importante considerar que devido ao desconhecimento do tempo decorrido entre a retirada dos peixes da água e a coleta das amostras, além da aleatoriedade temporal na amostragem, as estimativas das frequências entre as duas espécies podem ter sido influenciadas por uma limitação amostral cujos efeitos foram impossíveis de quantificar. Além disso, os valores de frequência discrepantes encontrados nas regiões de Manaus e rio Purus, nas quais os de *B. capapretum* foram maiores do que os de *B. filamentosum*, indicam que pode ter existido um fator

desconhecido atuando no balanço das proporções entre as duas espécies, pelo menos na região de Manaus. A primeira vista, esse fator pode estar relacionado ao movimento migratório, que provavelmente é distinto entre ambas as espécies. Segundo Lowe McConell (1999), espécies de peixes biologicamente semelhantes podem apresentar diferenças no comportamento. Embora os seus padrões migratórios sejam desconhecidos (Barthem e Goulding, 2007), é fato que a piraíba realiza migrações longitudinais em direção às cabeceiras dos rios (Agudelo-Córdoba *et al.*, 2000) e, como em outros peixes da Amazônia, esse comportamento é intimamente ligado ao ciclo de cheias e vazantes da bacia (Santos e Jegu, 2004).

Na Amazônia colombiana, a época reprodutiva da piraíba ocorre durante a descida do nível das águas e os primeiros eventos de reprodução provavelmente se iniciam entre os seis e os dez anos de idade (Agudelo-Córdoba *et al.*, 2000). Nesse sentido, estudos sobre os padrões migratórios das duas espécies e as suas relações com as proporções desembarcadas, devem ser conduzidos com o auxílio de outras ferramentas além da genética, como a biotelemetria (Slavík *et al.*, 2007).

As médias (\pm d. p.) dos comprimentos furcais foram obtidas para 164 exemplares de *B. filamentosum* ($88,23 \pm 25,75$ cm) e 78 exemplares de *B. capapretum* ($71,35 \pm 23,01$ cm), sendo que para essas, o teste t revelou não existir diferença estatisticamente significativa.

Estimativa da diversidade genética das espécies

As estimativas dos parâmetros genéticos para a região controle do DNA mitocondrial de *B. filamentosum* e *B. capapretum* são apresentados na Tabela 4.

Tabela 4 – Estimativas dos parâmetros genéticos para a região controle do DNA mitocondrial de *B. filamentosum* e *B. capapretum*.

Parâmetros	<i>B. filamentosum</i>	<i>B. capapretum</i>	
n° de amostras	225	112	
n° de haplótipos	130	53	
n° de haplótipos únicos	96	40	
Diversidade haplotípica (Hd)	0,9871 ± 0,0028	0,9509 ± 0,0106	
Diversidade nucleotídica (π)	0,0118 ± 0,0060	0,0041 ± 0,0023	
n° total de sítios	914	913	
n ° de sítios polimórficos (S)	68	34	
Transições	63	27	
Transversões	06	03	
<i>Indels</i>	02	04	
Composição nucleotídica	A	32,72%	31,65%
	C	21,86%	20,72%
	G	13,75%	14,60%
	T	31,67%	33,02%

Os valores da diversidade haplotípica foram semelhantes para ambas as espécies. Por outro lado, os valores dos parâmetros genéticos (π e S) de *B. capapretum* demonstraram que essa possui um menor número de substituições na região controle do DNA mitocondrial, quando comparada com *B. filamentosum*. A taxa de substituição nucleotídica na sequência do DNA é uma função da taxa de mutação e sua probabilidade de fixação (Kimura, 1983). Segundo Kocher e Carleton (1997), a taxa de substituição nucleotídica no DNA mitocondrial de peixes resulta de uma delicada interação entre mutação, limitação seletiva na escala molecular e orgânica e eventos populacionais. Os teleósteos podem apresentar diferentes taxas de substituição da região controle do DNA mitocondrial entre espécies, que parecem estar relacionadas a diferenças limitadas a estrutura ou função dessa região (McMillan e Palumbi, 1997). A exposição aos danos oxidativos da cadeia respiratória e a falta de um mecanismo de reparo são os principais fatores que contribuem para as elevadas taxas de mutação observadas no DNA mitocondrial (Gray, 1989). As composições nucleotídicas de *B. filamentosum* e *B. capapretum* foram semelhantes às encontradas para a região controle de outros genomas mitocondriais, que demonstram possuir um maior número de bases A e T (Chiang *et al.*, 2006).

A comparação entre as sequências da região controle do DNA mitocondrial de duas espécies de peixe-pedra (gênero *Sebastes*) capturados no Japão, demonstrou que *Sebastes thompsoni* e *Sebastes inermis* possuíam altos valores de diversidade haplotípica ($H_d = 1,00$ e $0,93$ respectivamente), mas o valor de diversidade nucleotídica para *S. thompsoni* ($\pi = 0,034$) foi maior

do que para *S. inermis* ($\pi = 0,011$). Segundo Higuchi e Kato (2002), essa diferença ocorreu devido ao tamanho efetivo da população de *S. thompsoni* (responsável por 48% das capturas do gênero *Sebastes*) ser maior que de *S. inermis* (responsável por 2% das capturas). Em outro estudo, o sequenciamento da região controle do DNA mitocondrial de *Siganus spinus* e *Siganus guttatus* também revelou para ambas, altos valores de diversidade haplotípica ($Hd = 0,91$) e valores diferentes de diversidade nucleotídica (*S. spinus* $\pi = 0,0061$; *S. guttatus* $\pi = 0,0181$), e essa diferença foi creditada a uma maior velocidade de expansão do tamanho populacional para *S. spinus* (Iwamoto *et al.*, 2009). Assim, mesmo com o alto valor de diversidade haplotípica obtido para *B. capapretum*, o seu baixo valor da diversidade nucleotídica em relação a *B. filamentosum* pode indicar que a primeira possui um menor tamanho populacional, o que parece ser confirmado pelos valores de frequência média dos peixes comercializados.

O valor médio da diversidade nucleotídica ($\pi = 0,0120$) da região controle do DNA mitocondrial do tambaqui (*C. macropomum*) foi considerado alto para essa espécie, que sofre forte pressão por pesca (Santos *et al.*, 2007). Para a pescada amarela (*Cynoscion acoupa*), o valor médio da diversidade nucleotídica da região controle ($\pi = 0,0028$) foi considerado baixo, e provavelmente está associado à sobreexploração (Rodrigues *et al.*, 2008). Esses valores comparativos sugerem que a pesca intensa praticada sobre a piraíba, até o final da década de 1990 (Petrere *et al.*, 2004; Barthem Goulding, 2007), pode ter causado uma diminuição da diversidade nucleotídica de forma mais drástica apenas em *B. capapretum*. As diversidades nucleotídicas

observadas para a região controle da dourada e da piramutaba foram $\pi = 0,0095$ e $\pi = 0,0166$, respectivamente (Batista e Alves-Gomes, 2006; Formiga-Aquino, 2004). De acordo com a instrução normativa nº 5, de 21 de Maio de 2004, editada pelo Ministério do Meio Ambiente do Brasil, o tambaqui, a dourada e a piramutaba foram incluídos na lista de espécies de peixes sobreexplotadas ou ameaçadas de sobreexploração (MMA, 2004). Assim, o valor médio da diversidade nucleotídica de *B. filamentosum* sugere, do ponto de vista genético, que essa espécie também seja incluída na lista de espécies sobreexplotadas ou ameaçadas de sobreexploração. Para *B. capapretum*, que apresenta baixos valores de diversidade genética, além da sua inclusão na lista, será necessária a adoção de medidas urgentes de manejo pesqueiro. Segundo Agostinho *et al.* (2005), o manejo pesqueiro deve priorizar tanto a produção pesqueira quanto a manutenção da biodiversidade, além de manter ações que promovam a integridade de áreas importantes para o ciclo de vida das espécies, o monitoramento constante, e o envolvimento dos pescadores.

A interpretação proposta por Grant e Bowen (1998) para a relação entre valores de diversidades haplotípica e nucleotídica para o DNA mitocondrial de teleósteos marinhos, permite classificar *B. filamentosum* como uma espécie que possui uma grande população estável, com uma longa história evolutiva ou com contato secundário entre linhagens diferentes, e *B. capapretum* como uma espécie que sofreu um efeito de gargalo de garrafa seguido de um rápido crescimento populacional. Esses resultados nos levam a sugerir que *B. capapretum*, além de apresentar naturalmente um menor tamanho efetivo populacional, pode ter sofrido um efeito de gargalo de garrafa devido à

sobreexploração. Na Amazônia boliviana, Coronel *et al.* (2004) sugeriram por meio da técnica de RFLP do DNA mitocondrial, que *B. rouseauxii* pode ter sofrido o efeito de gargalo de garrafa devido à forte atividade pesqueira. Contudo, a dinâmica de contração-expansão das populações pode estar associada a eventos não relacionados à pesca, como as variações ambientais durante o pleistoceno (Atarhouch *et al.*, 2006, Hubert *et al.*, 2007). De acordo com Bouzat (2000), para não incorrer em erros interpretativos, as inferências sobre a relação entre diversidade genética e o tamanho efetivo da população devem ser acompanhadas de medidas de diversidade genética que sirvam como um controle temporal. Dessa maneira, os resultados dos parâmetros genéticos obtidos no presente trabalho poderão ser usados como uma marcação temporal para o monitoramento genético de *B. filamentosum* e *B. capapretum* no futuro.

Estimativa da divergência genética entre as espécies

O modelo de substituição nucleotídica TN93 (Tamura e Nei, 1993) é considerado um dos mais realistas e baseia-se numa frequência desigual entre as bases nucleotídicas, com as substituições apresentando duas classes de transições e uma classe de transversão (Simon *et al.* 2006). A aplicação desse modelo resultou na média (\pm e. p.) estimada das divergências genéticas par a par entre a região controle do DNA mitocondrial de *B. filamentosum* e *B. capapretum*, de $0,1018 \pm 0,0082$ (ou aproximadamente 10 %). As divergências par a par dentro de cada espécie foram $0,0107 \pm 0,0018$ para *B. filamentosum*, e $0,0038 \pm 0,0012$ para *B. capapretum*.

Entre *Pseudoplatystoma tigrinum* e *Pseudoplatystoma magdaleniatum*, Torrico *et al.* (2009), utilizando o mesmo marcador molecular e modelo de substituição nucleotídica, estimaram o valor médio da divergência genética em $0,0830 \pm 0,0060$, que se iniciou a aproximadamente 11,8 milhões de anos, com o isolamento da bacia do rio Magdalena. No mesmo estudo, para o gênero *Pseudoplatystoma* foi estimada uma taxa de substituição de 0,25% por sítio, a cada milhão de anos. Entre *B. filamentosum* e *B. capapretum* não foi possível estimar a época em que pode ter ocorrido o evento da especiação. A área geográfica em que as amostras foram coletadas não apresentou elementos suficientes para o reconhecimento de um possível evento vicariante indicativo de uma separação temporal entre as espécies, ou a existência de fósseis que permitissem a calibração do relógio molecular. Além disso, segundo Nei (1987b), populações que sofreram o efeito de gargalo de garrafa, como sugerido para *B. capapretum*, podem apresentar temporariamente um aumento da distância genética. Ainda assim, o valor de 10% de divergência entre as duas espécies está abaixo do limite máximo de 15%, necessário para uma boa resolução filogenética (Faber e Stepien, 1997). Considerando que *B. filamentosum* e *B. capapretum* são duas unidades taxonômicas distintas e descritas morfológicamente, o valor médio da divergência genética entre elas poderá ser usado como referência para a interpretação de possíveis valores de distâncias genéticas entre morfotipos ou outras espécies do gênero.

BIBLIOGRAFIA CITADA

- Agostinho, A.A.; Thomaz, S.M; Gomes, L.C. 2005. Conservação da biodiversidade em águas continentais do Brasil. *Megadiversidade*, 1(1):70-78.
- Agudelo-Córdoba, E.Y.; Salinas-Coy; C. L. Sánchez; Muñoz-Sosa, D. L.; Alonso-González, J. C.; Arteaga-Díaz, M. E. A; Rodríguez-Pietro, O. J. R.; Anzola-Potes, N. R.; Acosta-Muñoz, L. E.; Núñez-Avellaneda, M.; Valdés-Carrillo, H. 2000. *Bagres de la amazonía colombiana: Un Recurso sin Fronteras*. Instituto Amazónico de Investigaciones Científicas-SINCHI. Bogota. Colombia. 253 p.
- Alcântara Filho, P. 1988. Dinâmica de Populações. Parte 5. *In: FAO. Manual Sobre Manejo de Reservatórios Para a Produção de Peixes*. Documento de Campo 9. Documento Preparado Para o Projeto GCP/RLA/075/ITA Apoio as Atividades Regionais de Aqüicultura Para América Latina e o Caribe Programa Cooperativo Governamental. FAO - Itália.
- Araújo-Lima, C. A. R. M., Ruffino, M. L. 2003. Migratory Fishes of the Brazilian Amazon. *In: Carosfeld, J.; Harvey, B.; Baer, A.; Ross, C. (Eds.) Migratory Fishes of the South America: Biology, Social Importance and Conservation Status*, World Bank Technical Paper, Victoria, 380 p.
- Atarhouch, T.; Rüber L.; Gonzalez E. G.; Albert E. M.; Rami, M.; Dakkak, A.; Zardoya, R. 2006. Signature of an early genetic bottleneck in a population

- of Moroccan sardines (*Sardina pilchardus*). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 39: 373–383.
- Barthem, R. B., Goulding, M. 1997. *Os Bagres Balizadores: Ecologia, Migração e Conservação de Peixes Amazônicos*. Sociedade Civil Mamirauá; CNPq, Brasília. 140 p.
- Barthem, R. B., Goulding, M. 2007. *Um ecossistema inesperado: a Amazônia revelada pela pesca*. Amazon Conservation Association e Sociedade Civil Mamirauá, Lima. 241 p.
- 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 Resesarch*, 5(4): 723-740.
- Bouzat, J. L. 2000. The importance of control populations for the identification and management of genetic diversity. *Genetica*, 110: 109–115.
- Carvalho, A.R. ; Barros, J. F. 2008. Probability of emigration of amazonian catfish fishers: a management approach. *Boletim do Instituto de Pesca*, São Paulo, 34(3): 433 – 441.
- Chiang H.C.; Hsu, C.C.; Lin, H.D.; Ma, G.C.; Chiang, T.Y.; Yang, H.Y. 2006: Population structure of bigeye tuna (*Thunnus obesus*) in the South China Sea, Philippine Sea and western Pacific Ocean inferred from mitochondrial DNA. *Fisheries Research*, 79: 219-225.

- Coronel, J. S., Maes, G. E., Claus, S., Van Damme, P. A., Volckaert, F. A. M. 2004. Differential population history in the migratory catfishes *Brachyplatystoma flavicans* and *Pseudoplatystoma fasciatum* (Pimelodidae) from the Bolivian Amazon assessed with nuclear and mitochondrial DNA markers. *Journal of Fish Biology*, 65, 859 – 868.
- Excoffier, L.; Laval, G.; Schneider, S. 2005. Arlequin (version 3.0): An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online*:1, 47-50.
- Faber, J. E. ; Stepien, C. A. 1997. The utility of mitochondrial DNA control region sequence for analysing phylogenetic relationships among populations, species, and genera of the Percidae. *In*: Kocher, T. D.; Stepien, C. A. (Eds). *Molecular Systematics of Fishes*, San Diego, CA: Academic Press, pp. 129–143.
- FAO. 2000. *Informe del taller regional sobre manejo de lãs pesquerias de bagres migrat3rios del amazonas*. Informe de Campo F-5, FAO. Roma, 99 p.
- Ferreira, E.; Zuanon, J.; Fosberg, B.; Goulding, M.; Briglia-Ferreira, R.. 2007. *Rio Branco: Peixes, Ecolog3a e Conserva33o de Roraima*. Amazon Conservation Association, Instituto Nacional de Pesquisas da Amaz3nia, Sociedade Civil Mamirau3. Manaus, Brazil. 201 p.
- Formiga-Aquino, K. 2004. *Variabilidade gen3tica da piramutaba - Brachyplatystoma vaillantii (Valenciennes, 1840) (Siluriformes:Pimelodidae)*

- no sistema Estuário-Amazonas-Solimões. Dissertação de Mestrado. INPA/FUA. Manaus. 76 p.
- Fraga, E.; Schneider, H.; Nirchio, M. ; Santa-Brigida, E.; Rodrigues-Filho, L. F. e Sampaio, I. 2007. Molecular phylogenetic analyses of mullets (Mugilidae, Mugiliformes) based on two mitochondrial genes. *Journal of Applied Ichthyology*, 23: 598–604.
- Gil, L. A. 2007. PCR-based methods for fish and fishery products authentication. *Trends in Food Science & Technology*, 18: 558-566.
- Grant, W. S.; Bowen, B. W. 1998. Shallow Population Histories in Deep Evolutionary Lineages of Marine Fishes: Insights From Sardines and Anchovies and Lessons for Conservation. *The Journal of Heredity*, 89(5): 415-426.
- Gray, M. W.. 1989. Origin and evolution of mitochondrial DNA. *Annual Reviews in Cell Biology*, 5 : 25-50.
- Hall, T. A. 1999. Bio Edit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for windows 95/98/NT. *Nucleic Acid Symposium Series*, 41: 95 -98.
- Higuchi, M.; Kato, K. 2002. Sequence variability in the mitochondrial DNA control region of five *Sebastes* species. *Fisheries Science*, 68: 643-650.
- 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.
- Hubert, N.; Hanner, R.; Holm, E.; 3, Mandrak, N. E.; Taylor, E.; Burrige, M.; Watkinson, D.; Dumont, P.; Curry, A.; Bentzen, P.; Zhang, J.; April, J.; Bernatchez, L. 2008. Identifying Canadian Freshwater Fishes through DNA Barcodes. *PLoS ONE*, 3(6): 1 – 14.
- Iwamoto, K.; Takemura, A.; Yoshino, T.; Imai, H. 2009. Molecular Ecological Study of *Siganus spinus* and *S. guttatus* from Okinawan Waters Based on Mitochondrial DNA Control Region Sequences. *Journal of Oceanography*, 65: 103- 112.
- Kimura, M., 1983. *The Neutral Theory of Molecular Evolution*. Cambridge University Press, London.
- Kocher, T. D. e K. L. Carleton. 1997. Base substitution in fish mitochondrial DNA: Patterns and Rates. *In*: Kocher, T.D.; Stepien, C.A. (Eds). *Molecular Systematics of Fishes*. Academic Press, San Diego, 313 p.
- Lowe-McConnell, R.H. 1999. Estudos Ecológicos de Comunidades de Peixes Tropicais. São Paulo, USP, 535p.
- Lundberg, J. G., Akama, A. 2005. *Brachyplatystoma capapretum*: a New Species of Goliath Catfish from the Amazon Basin, with a reclassification of Allied Catfishes (Siluriformes: Pimelodidae). *Copeia*, 3: 492 – 516.

- McMillan, W. O.; Palumbi, S. R. 1997. Rapid Rate of Control-Region Evolution in Pacific Butterflyfishes (Chaetodontidae). *Journal of molecular evolution*. 45: 473–484.
- MMA. Ministério do Meio Ambiente. 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.
- Nei, M. 1987a. *Molecular Evolutionary Genetics Columbia*. University Press: New York, NY.
- Nei, M. 1987b. Genetic Distance and Molecular Phylogeny. In: Population Genetics & Fishery Management. eds. Ryman, N., Utter, F. University of Washington Press, Seattle. 193 - 223.
- Pappalardo, A. M.; Ferrito, V.; Messina, A.; Guarino, F.; Patarnello, T.; Pinto, V. Tigano, C. 2008. Genetic structure of the killifish *Aphanius fasciatus*, Nardo 1827 (Teleostei, Cyprinodontidae), results of mitochondrial DNA analysis. *Journal of Fish Biology* . 72: 1154–1173.
- Petrere, M., Barthem, R. B., Córdoba, E. A., Gómez, B. C. 2004. Review of the large catfish fisheries in the upper Amazon and stock depletion of Piraíba (*Brachyplatystoma filamentosum* Lichtenstein). *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 14: 403 – 414.

- Posada, D., and Crandall, K. A. 1998. MODELTEST: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics*, 14: 817–818.
- Rodrigues, R., Schneider, H., Santos, S., Vallinoto, M., Sain-Paul, U., Sampaio, I. 2008. Low levels of genetic diversity depicted from DNA sequences in a heavily exploited marine fish (*Cynoscion acoupa*, *Scianidae*) from the Northern of Brazil. *Genetics and Molecular Biology*, 31(2): 487 – 492.
- Ruffino, M. L. 2008. Sistema integrado de estatística pesqueira para a Amazônia. *Pan-American Journal of Aquatic Sciences* , 3(3): 193-204.
- Ruffino, M. L., Silva Junior, U. L., Soares, E.C., Silva, C. O., Barthem, R. B., Batista, V. S., Isaac, V. J., Fonseca, S. ; Pinto, W. 2006. *Estatística Pesqueira do Amazonas e Pará -2003*. IBAMA, Manaus, 76 p.
- Ruffino, M. L., Silva Junior, U. L., Soares, E.C., Silva, C. O., Barthem, R. B., Batista, V. S., Estupiñan, G, Isaac, V.J., Fonseca, S.; Pinto, W. 2005. *Estatística Pesqueira do Amazonas e Pará - 2002*. IBAMA, Manaus, 84 p.
- Ruffino, M. L., Silva Junior, U.L., Soares, E.C., Silva, C. O., Barthem, R. B., Batista, V.S., Isaac, V. J., Fonseca, S.; Pinto, W. 2006. *Estatística Pesqueira do Amazonas e Pará -2003*. IBAMA, Manaus, 76 p.
- Ruffino, M. L., Silva, C. O., Viana, J. P., Barthem, R. B., Batista, V. S.; Isaac, V. J. 2002. *Estatística Pesqueira do Amazonas e Pará - 2001*. IBAMA, Manaus, 76 p.

- Santos, G. M., Jegu, M. 2004. Piraíba, o peixe gigante. *Ciência Hoje*, 34: 69 - 71.
- Santos, G. M.; Ferreira, E. J. G. 1999. Peixes da Bacia Amazônica. *In: Lowe-McConnell, R.H (Eds). Estudos Ecológicos de Comunidades de Peixes tropicais*, São Paulo, EDUSP, pp. 345 – 373.
- Santos, G. M.; Santos, A. C. M. 2005. Sustentabilidade da pesca na Amazônia. *Estudos Avançados*, 19 (54): 2005.
- Santos, M. C. F.; Ruffino, M. L.; Farias I. P. 2007. High levels of genetic variability and panmixia of the tambaqui *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1816) in the main channel of the Amazon River. *Journal of Fish Biology*, 71 (Supplement A): 33–44.
- Simon, C.; Buckley, T. R.; Frati, F.; Stewart, J. B. e Beckenbach, A. T. 2006. Incorporating Molecular Evolution into Phylogenetic Analysis, and a New Compilation of Conserved Polymerase Chain Reaction Primers for Animal Mitochondrial DNA. *The Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 37: 545–79.
- Slavík, O.; Horky, P.; Bartos, L.; Kolarova, J.; Randa, T. 2007. Diurnal and seasonal behaviour of adult and juvenile European catfish as determined by radio-telemetry in the River Berounka, Czech Republic. *Journal of Fish Biology*, 71: 101–114.

- Tamura K., Dudley J., Nei M. ; Kumar S. 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*, 24: 1596-1599.
- Tamura, K.; Nei, M. 1993. Estimation of the Number of Nucleotide Substitutions in the Control Region of Mitochondrial DNA in Humans and Chimpanzees. *Molecular Biology and Evolution*, 10(3): 512-526.
- Technelisyum. 1998. Chromas 2.24. (www.technelisyum.com.au). Acesso: 14/07/2008.
- Thomé-Souza, M. J. F; Raseira, M. B, Ruffino, M. L., Silva, C. O., Batista, V. S., Barthem, R. B.; Amaral, E. S. R. 2007. *Estatística Pesqueira do Amazonas e Pará - 2004*. IBAMA, Manaus, 76 p.
- Torrice, J.P.; Hubert N.; Desmarais E.; Duponchelle F.; Nuñez Rodriguez, J.; Montoya-Burgos, J.; Garcia Davila, C.; Carvajal-Vallejos, F.M.; Grajales, A.A.; Bonhomme, F.; Renno, J.F. 2009. Molecular phylogeny of the genus *Pseudoplatystoma* (Bleeker, 1862): biogeographic and evolutionary implications. *Molecular phylogenetics and evolution*, 51(3): 88-94.
- Vrijenhoek, R. C.1998. Conservation genetics of freshwater fish. *Journal of Fish Biology*, 53 (Supplement A): 394–412.
- Ward, R. D. 2000. Genetics in fisheries management. *Hydrobiologia*, 420: 191 – 201.

CAPÍTULO II

Estrutura genética da piraíba branca (*Brachyplatystoma filamentosum*, Siluriformes: Pimelodidae) capturada comercialmente na Amazônia brasileira, inferida pela região controle do DNA mitocondrial.

RESUMO

A piraíba branca (*Brachyplatystoma filamentosum*, Siluriformes: Pimelodidae) é o maior bagre predador dos canais dos rios Amazônicos. Essa espécie ocorre em rios de águas brancas, claras e pretas, sendo capturada comercialmente em toda a bacia. Dados sobre a captura dessa espécie já demonstraram indícios de sobreexploração. O presente trabalho teve o objetivo de inferir sobre a estrutura genética de *B. filamentosum* na Amazônia brasileira, por meio do sequenciamento da região controle do DNA mitocondrial. Para isso foram analisadas 262 amostras de *B. filamentosum* oriundas da captura comercial em nove regiões caracterizadas por possuir rios de águas brancas, duas regiões com rios de águas claras e uma região com um rio de águas pretas. A SAMOVA resultou em um Fct de 0,62079 para k=3 grupos, nos quais as regiões amostradas se agruparam de acordo com o tipo de água. A análise filogenética indicou a existência de três clados que possuem uma forte relação com a distribuição geográfica dos três tipos de águas da bacia amazônica. Os clados relacionados às águas claras e pretas revelaram baixos valores de diversidade nucleotídica ($\pi= 0,0037$ e $0,0036$ respectivamente). Os resultados foram discutidos no contexto evolucionário da bacia amazônica e também revelaram a necessidade de ações de manejo com fins conservacionistas para *B. filamentosum*.

Palavras-chave: Bagre, peixe, genética, pimelodidae, pesca, água doce.

Genetic structure of white piraíba (Brachyplatystoma filamentosum, Siluriformes: Pimelodidae) caught commercially in the Brazilian Amazon, inferred by the control region of mitochondrial DNA.

ABSTRACT

The white piraíba (Brachyplatystoma filamentosum, Siluriformes: Pimelodidae) is the largest catfish predator of the river Amazon. This species occurs in white, clear and black water rivers, and it is caught commercially throughout the basin. Data on the capture of this species have shown signs of overfishing. This study aimed to infer the genetic structure of B. filamentosum in the Brazilian Amazon, based on the sequencing of the control region of mitochondrial DNA. Two hundred and sixty two (262) samples of B. filamentosum were analyzed from the commercial catch in nine regions characterized by having white-water rivers, two regions of rivers with clear waters and one region with a black water river. The SAMOVA resulted in $F_{ct} = 0.62079$, for $k = 3$ groups, where the regions sampled were grouped according to water type. Phylogenetic analysis indicated the existence of three clades that have a strong relationship with the geographical distribution of three types of waters in the Amazon basin. Clades related to the clear and dark waters showed low nucleotide diversity ($\pi = 0.0037$ and 0.0036 respectively). The evolutionary implications of these results were discussed for the Amazon basin and also revealed the need for management regulations for conservation purposes of B. filamentosum.

Key words: Catfish, finfish, genetics, pimelodidae, fishery, freshwater.

INTRODUÇÃO

A piraíba é o maior bagre predador que habita os canais dos rios amazônicos. Até 2005 era considerada apenas uma espécie (*Brachyplatystoma filamentosum*, Siluriformes: Pimelodidae), contudo, a partir de 2005 foi descrita uma nova espécie (*B. capapretum*) com base em características morfológicas (Lundberg e Akama, 2005). Há fortes indícios que os estoques de piraíba na bacia amazônica encontram-se em sobreexploração (Petrere *et al.*, 2004). Além disso, por se tratar de espécies migradoras (embora seu padrão de migração não seja totalmente conhecido) e com ciclo de vida intimamente associado aos canais principais dos rios (Santos e Ferreira, 1999), é provável que o movimento migratório seja extremamente susceptível a alterações no ambiente lótico, causadas por barragens (Barthem *et al.*, 1991) e outros tipos de ações antrópicas. No texto, nos referimos à “piraíba” quando consideramos as duas espécies em conjunto e à “piraíba branca” para *B. filamentosum*, e “piraíba negra” para *B. capapretum*.

As análises das sequências da região controle do DNA mitocondrial do capítulo 1 revelaram que, em média, *B. filamentosum* é mais abundante que *B. capapretum* nos rios de águas brancas da bacia amazônica. Além disso, as análises, de acordo com a interpretação proposta por (Grant e Bowen, 1998), indicaram que *B. filamentosum* provavelmente possui uma grande população estável com uma longa história evolutiva ou com contato secundário entre linhagens diferentes. Entretanto, essa espécie não possui uma distribuição

restrita a águas brancas, sendo também encontrada em águas claras e pretas (Barthem e Goulding, 1997).

Algumas hipóteses foram formuladas para explicar a elevada diversidade de peixes na Amazônia. Entre elas, os efeitos vicariantes oriundos da evolução geológica da bacia (Lundberg *et al.*, 1998), o isolamento de rios nos refúgios das terras emersas durante as transgressões marinhas do Mioceno (Hubert e Renno, 2006; Lovejoy *et al.*, 2006), as conexões entre drenagens (captura de cabeceiras) (Wilkinson *et al.*, 2006), as adaptações às diferenças da composição química das águas (Willis *et al.*, 2007), e a impossibilidade de pequenas espécies cruzarem os grandes canais. Contudo, os padrões biogeográficos dos peixes amazônicos ainda necessitam elucidação (Hubert e Renno, 2006). Devido à sua ampla distribuição geográfica e a sua alta capacidade natatória, existe a possibilidade de que a diversidade genética de *B. filamentosum* também fora submetida a influencias combinadas, dos três primeiros fatores. Essa espécie pode apresentar-se na forma de panmixia, ou do contrário, pode ser estruturada em várias populações. O conhecimento de qual padrão de estrutura genética esta estabelecido em *B. filamentosum* é crucial para a elaboração de planos de manejo pesqueiro (Waples, 1998), propostas para a conservação da espécie (Vrijenhoek, 1998) e o seu uso na aquacultura (Doupé e Lymbery, 2000; Godinho, 2007).

Na Amazônia, os habitats dos peixes são determinados pela descarga, gradiente e geologia das bacias hidrográficas (Junk *et al.*, 2007). Sioli (1984) classificou as águas dos rios amazônicos em três tipos: águas brancas, claras e pretas, relativos à coloração e transparência das águas, mas de acordo com

Furch (1984) e Tundisi e Tundisi (2008), as diferenças entre elas também ocorrem na composição química, como pH, elementos químicos e nutrientes. O objetivo do presente capítulo foi analisar a estrutura genética de *B. filamentosum* capturada comercialmente em rios de águas brancas, claras e pretas da Amazônia brasileira, por meio do seqüenciamento da região controle do DNA mitocondrial.

MATERIAL E MÉTODOS

Coleta das amostras e sequenciamento da região controle do DNA mitocondrial

O presente trabalho foi realizado no âmbito do projeto “Subsídios para manejo e conservação dos grandes bagres migradores na Amazônia pela identificação e caracterização genética dos estoques pesqueiros” (PROJETO PIRADA), realizado pelo Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA) entre 1998 e 2008. Foram coletadas amostras de tecido muscular ou nadadeiras de peixes comercializados sob o nome popular de “piraíba”, em dois entrepostos de pescado localizados nas regiões do alto rio Negro (n=17) e alto rio Tapajós (n=11) respectivamente. Foram realizadas 4 campanhas amostrais em intervalos temporais diversos, adequados ao esforço logístico necessário para a coleta das amostras na grande extensão geográfica da área estudada. Não foi possível determinar as datas exatas das capturas dos exemplares amostrados e quantificar o tempo do armazenamento dos peixes até a sua comercialização e coleta das amostras. Entretanto, para assegurar que as amostras eram oriundas do local amostrado, os pescadores e vendedores foram questionados acerca da área de pesca de origem das mesmas. A coleta das amostras foi autorizada pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA), por meio do processo nº 02005.001811/04-65. Também foram utilizadas amostras de sangue de piraíbas do rio Araguaia (n=9), coletadas e cedidas pelo Laboratório de Biologia e Genética de Peixes da Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita

Filho (Unesp). As amostras foram conservadas em álcool 90%, numeradas e depositadas no banco de tecidos do Laboratório Temático de Biologia Molecular do INPA.

A extração do DNA total, a amplificação e o seqüenciamento completo da região controle do DNA mitocondrial foram realizados seguindo os procedimentos e *primers* descritos por Batista e Alves Gomes (2006). As 37 sequências obtidas foram identificadas por comparação com as 225 sequências de *B. filamentosum* do Capítulo I, as quais foram adicionadas às análises. O alinhamento das sequências foi feito manualmente com o auxílio dos programas computacionais BioEdit 7.0.9.0 (Hall, 1999) e Chromas 2.24 (Technelisyum, 1998), resultando em uma matriz com 262 sequências de 914 sítios.

Os três novos locais amostrados somados aos 14 locais descritos no capítulo I foram agrupados em 12 regiões, caracterizadas pelas sub-bacias hidrográficas às quais estavam inseridas ou pela localização em relação ao eixo principal do rio Solimões/Amazonas (Figura 1). A bacia hidrográfica dos rios Tocantins/Araguaia também foi considerada como uma dessas sub-bacias (Tundisi, 1994). Cada local amostrado foi classificado por um dos três tipos de água que o caracterizava (águas brancas, águas claras e águas pretas), em função do proposto por Sioli (1984).

As regiões e seus respectivos locais de coleta, suas localizações político-geográficas, suas classificações por tipo de água e número de sequências da região controle do DNA mitocondrial de *Brachyplatystoma filamentosum*, são apresentadas na Tabela 1.

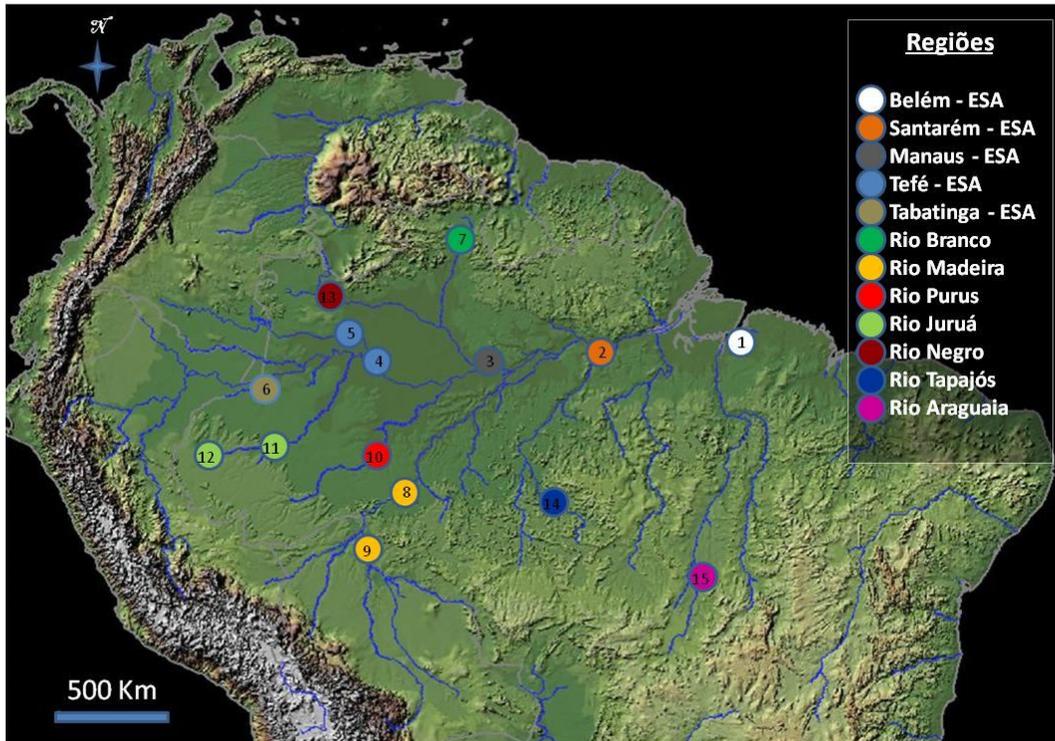


Figura 1 – A bacia hidrográfica amazônica e os locais amostrados: 1) Belém; 2) Santarém; 3) Manaus; 4) Tefé; 5) Japurá; 6) Tabatinga; 7) Boa Vista; 8) Porto Velho; 9) Guajará Mirim; 10) Lábrea; 11) Eirunepé; 12) Cruzeiro do Sul; 13) São Gabriel da Cachoeira; 14) Paranaíta e 15) São Miguel do Araguaia. Os agrupamentos por região são indicados na figura pelas cores dos marcadores, ESA=Eixo Solimões/Amazonas.

Tabela 1 – Regiões, seus respectivos locais de coleta, localizações político-geográficas, classificação por tipo de água e número de sequências de *Brachyplatystoma filamentosum* por local e região.

Região	Local	Estado	Latitude/Longitude	Tipo de água	NSL	NSR	Referência
Belém (ESA)	Belém	PA	01°27'18,04"S/48°30'08,90"W	Branca	31	31	Capítulo 1
Santarém (ESA)	Santarém	PA	02°26'25,58"S/54°41'54,70"W	Branca	25	25	Capítulo 1
Manaus (ESA)	Manaus	AM	03°05'39,60"S/60°01'33,63"W	Branca	06	06	Capítulo 1
Tefé (ESA)	Tefé	AM	03°18'22,60"S/64°45'33,50"W	Branca	12	56	Capítulo 1
	Japurá	AM	01°49'34,81"S/66°35'58,32"W	Branca	44		Capítulo 1
Tabatinga (ESA)	Tabatinga	AM	04°15'11,62"S/69°56'19,36"W	Branca	15	15	Capítulo 1
Rio Branco	Boa Vista	RR	02°50'23,75"N/60°39'43,61"W	Branca	18	18	Capítulo 1
Rio Madeira	Porto Velho	RO	08°45'42,85"S/63°54'06,77"W	Branca	43	47	Capítulo 1
	Guajará Mirim	RO	10°47'27,28"S/65°19'56,74"W	Branca	04		Capítulo 1
Rio Purus	Lábrea	AM	07°12'20,72"S/64°50'36,99"W	Branca	15	15	Capítulo 1
Rio Juruá	Cruzeiro do Sul	AC	07°38'10,54"S/72°40'02,86"W	Branca	05	12	Capítulo 1
	Eirunepé	AM	06°37'40,87"S/69°54'04,24"W	Branca	07		Capítulo 1
Rio Negro	São Gabriel da Cachoeira	AM	00°07'37,44"S/67°05'27,26"W	Preta	17	17	Presente capítulo
Rio Tapajós	Paranaíta	MT	09°27'12,18"S/56°29'35,33"W	Clara	11	11	Presente capítulo
Rio Araguaia	São Miguel do Araguaia	GO	13°12'45,73"S/50°34'21,84"W	Clara	09	09	Presente capítulo
					Total	262	

ESA=Eixo Solimões/Amazonas; NSL=Número de sequências por local; NSR=Número de sequências por região.

Distribuição de haplótipos e análise da estrutura genética

Foi realizada a distribuição da frequência de haplótipos por região, com auxílio do programa computacional Collapse 1.2. (Posada, 2004).

Para inferir a existência de relação entre regiões geograficamente homogêneas e possíveis grupos de regiões, geneticamente diferenciados, foi utilizado o programa computacional SAMOVA 1.0 (Análise de variância molecular espacial) (Dupanloup *et al.*, 2002). A análise foi realizada considerando os valores de $k=2$, $k=3$ e $k=4$, onde k foi o número de grupos simulados para as 12 regiões amostradas. O valor de F_{ct} representa a variância de cada grupo.

A segregação genética entre as regiões foi calculada por meio do programa computacional ARLEQUIN 3.11 (Excoffier *et al.*, 2005), o qual gerou índices de fixação par a par (Φ_{st}) (análogo ao F_{st}), com significância estatística ($p<0,05$) submetida a correção de Bonferroni (Rice, 1989) para comparações múltiplas.

A hipótese da não ocorrência de isolamento genético por distância foi testada por meio do teste de Mantel (1967) usando o programa computacional ARLEQUIN 3.11 (Excoffier *et al.*, 2005). Foi obtido o coeficiente de correlação entre a matriz dos valores de Φ_{st} par a par e uma matriz de distâncias geográficas (em Km do curso dos rios) entre as regiões, o qual teve sua significância estatística testada a partir de 10000 permutações. As distâncias entre as regiões (dados não mostrados) foram mensuradas por meio do *software ArcGis* (ESRI, 2006). Nas regiões com dois locais de coleta, foi

escolhido o ponto médio entre esses para mensurar a distância até as demais regiões.

Análise filogenética

As relações filogenéticas entre as sequências foram estimadas pela construção de um filograma com o método de aproximação dos vizinhos (NJ) (Saitou e Nei, 1987) por meio dos programas computacionais MEGA 4.0.2 (Tamura *et al.*, 2007) e DENDROSCOPE 2.2.2 (Huson *et al.*, 2007). Três sequências da região controle de *B. capapretum* foram usadas para enraizar o filograma, o qual teve os índices de sustentação dos clados calculados pelo procedimento de bootstrap com 1000 réplicas. Na construção do filograma foi utilizado o modelo de substituição nucleotídica TN93 (Tamura e Nei, 1993) e o valor da distribuição gamma $\Gamma=0,4298$, obtidos pelos HLRTs do programa computacional MODELTEST 3.7 (Posada e Crandall, 1998). Para verificar a relação entre o padrão filogenético e sua distribuição geográfica, foi feita uma distribuição de frequência das sequências pelos principais clados revelados pelo filograma, dentro de cada região.

Estimativa da diversidade genética dos clados

Foram estimados os seguintes parâmetros genéticos para os principais clados: o número de haplótipos, a diversidade haplotípica (Hd: probabilidade de duas sequências serem diferentes em uma população) (Nei, 1987a), a diversidade nucleotídica (π : número de diferenças nucleotídicas por sítio entre

as sequências) (Nei 1987a), o número de sítios polimórficos (S), o número de transições (TS), o número de transversões (TV), o número de *indels* e a composição nucleotídica. As estimativas foram obtidas por meio do programa computacional ARLEQUIN 3.11 (Excoffier *et al.*, 2005).

Estimativa da divergência genética dentro e entre os clados

Foram estimados os valores médios (\pm e. p.) das divergências genéticas par a par entre e dentro dos principais clados formados pelo filograma, por meio do programa computacional MEGA 4.0.2. (Tamura *et al.*, 2007). O erro padrão foi estimado pelo procedimento de *bootstrap* com 10000 réplicas. Com auxílio do programa computacional ARLEQUIN 3.11 (Excoffier *et al.*, 2005) foi estimado o fluxo gênico entre os principais clados formados, pela estimativa do número de fêmeas migrantes por geração: $N_{fm} = (1 - \Phi_{st}) / (2 \times \Phi_{st})$, onde N_{fm} é o número de fêmeas trocado entre os clados por geração, e Φ_{st} é o valor do índice de fixação entre os clados. Os cálculos das divergências genéticas e dos fluxos gênicos foram baseados no modelo de substituição nucleotídica TN93 (Tamura e Nei, 1993) com valor da distribuição gama $\Gamma=0,4298$.

Análises de contração-expansão populacional dos clados

As relações entre contração-expansão populacional para cada um dos principais clados foram inferidas por meio de dois métodos: 1) o teste da hipótese de neutralidade mutacional (F_s) de Fu (1997), com significância

estatística condicionada a 10000 permutações. Esse teste considera que não há vantagem seletiva entre os haplótipos, e a existência de um desequilíbrio mutacional significativo está associado à expansão populacional recente ou a um efeito de gargalo de garrafa; e 2) a análise de distribuição de frequência das diferenças genéticas par a par (*mismatch distribution*) (Rogers e Harpending, 1992), a qual é bimodal em populações estáveis e unimodal em populações que sofreram expansão. Os dois procedimentos foram realizados por meio do programa computacional ARLEQUIN 3.11 (Excoffier *et al.*, 2005).

RESULTADOS

Distribuição de haplótipos e análise da estrutura genética

Entre as 262 sequências da região controle do DNA mitocondrial analisadas, foram encontrados 154 haplótipos, dos quais 114 foram haplotipos únicos.

As nove regiões de águas brancas compartilharam 21 haplótipos entre si, e o haplótipo H130 (18 indivíduos) foi encontrado em oito, exceto na região do rio Purus. Nenhum haplótipo encontrado em águas brancas foi encontrado em águas claras e pretas.

Dos onze haplótipos encontrados na região do rio Negro, um haplótipo (H152, 4 indivíduos) foi compartilhado com os oito haplótipos encontrados na região do rio Tapajós (H152, 2 indivíduos). Essas duas regiões não compartilharam haplótipos com as demais.

Seis haplótipos foram encontrados exclusivamente na região do rio Araguaia, a qual não compartilhou haplótipos com outras regiões (Tabela 2).

Tabela 2 – Frequência dos haplótipos de *Brachyplatystoma filamentosum* nas regiões amostradas.

Haplótipo	Regiões											Total	
	ESA					BR	MD	PU	JU	NE	TJ		AR
	BE	SA	MA	TE	TA								
H1									1				1
H2									1				1
H3						1							1
H4						1							1
H5						2							2
H6											1		1

Tabela 2- Frequência dos haplótipos de *Brachyplatystoma filamentosum* nas regiões amostradas.

H7						1	1
H8						1	1
H9						1	1
H10						3	3
H11						1	1
H12						1	1
H13				1			1
H14				1			1
H15				1			1
H16						1	1
H17						1	1
H18		1					1
H19		1					1
H20		1					1
H21			1				1
H22			1				1
H23	1						1
H24				1			1
H25				1			1
H26				1			1
H27			1				1
H28			1				1
H29				1			1
H30				1			1
H31				1			1
H32						1	1
H33						1	1
H34						1	1
H35						1	1
H36						1	1
H37						1	1
H38						1	1
H39						1	1
H40						1	1
H41						1	1
H42						1	1
H43			1				1
H44			1				1
H45			1				1
H46			1				1
H47			1				1
H48			1				1
H49			3				3
H50			3				3
H51			1				1

Tabela 2- Frequência dos haplótipos de *Brachyplatystoma filamentosum* nas regiões amostradas.

H52			1				1	
H53			4	1		1	1	7
H54			2					2
H57			2					2
H58						1		1
H59						1		1
H60						1		1
H61						1		1
H62						3		3
H63			1			1		2
H64			2	1		1		4
H65						1		1
H66			1					1
H67		1	2					3
H68			4			1		5
H69			1					1
H70			1					1
H71			1					1
H72	1							1
H73	1							1
H74	1							1
H75	1							1
H76	1							1
H77	1							1
H78	2							2
H79	1							1
H80	1							1
H81	1							1
H82	1							1
H83	1							1
H84	1							1
H85	2							2
H86	1		2				2	5
H87	1						1	2
H88							1	1
H89							1	1
H90			1	1		1	1	4
H91		1					1	2
H92							1	1
H93	1							1
H94	1							1
H95	1							1
H96	1							1
H97	1							1
H98	1							1

Tabela 2- Frequência dos haplótipos de *Brachyplatystoma filamentosum* nas regiões amostradas.

H144	1	1
H145	1	1
H146	1	1
H147	1	1
H148	3	3
H149	1	1
H150	1	1
H151	1	1
H152	4	2
H153	1	1
H154	2	2
Total de sequências:		262

ESA= Eixo Solimões/Amazonas; BE = Belém; SA=Santarém; MA=Manaus; TE=Tefé; TA=Tabatinga; BR=rio Branco; MD= rio Madeira; PU=rio Purus; JU= rio Juruá; NE= rio Negro; TJ= rio Tapajós; AR= rio Araguaia.

Os padrões de compartilhamento de haplótipos indicaram uma tendência de segregação genética de *B. filamentosum* relacionada aos tipos de águas encontrados nos rios amazônicos. Embora *B. filamentosum* seja capturada junto com *B. capapretum* em águas brancas (capítulo 1), nenhum exemplar da segunda espécie foi identificado entre as amostras oriundas dos rios de águas claras e pretas.

O resultado da SAMOVA mostrou que o valor de F_{ct} (0,62079) foi maior para $k=3$ grupos de regiões. Para essa simulação, o programa separou as 12 regiões amostradas em três grupos, os quais estão relacionados aos diferentes tipos de águas (Tabela 3).

Tabela 3 – Análise de variância molecular espacial (SAMOVA) para *B. filamentosum* considerando k=2, k=3 e k=4 grupos de regiões.

k	Regiões	F_{ct}
2	Belém, rio Purus, Tabatinga, rio Juruá, rio Madeira, Santarém, Tefé, rio Branco, Manaus	0,58451
	rio Negro, rio Araguaia, rio Tapajós	
3	Belém, rio Purus, Tabatinga, rio Juruá, rio Madeira, Santarém, Tefé, rio Branco, Manaus	0,62079
	rio Negro	
	rio Araguaia, rio Tapajós	
4	Belém, rio Purus, Tabatinga, rio Juruá, rio Madeira, Santarém, Tefé, rio Branco, Manaus	0,61827
	rio Negro	
	rio Araguaia	
	rio Tapajós	

Valores de Φ_{st} par a par entre as nove regiões de águas brancas e entre as duas regiões de águas claras, não foram estatisticamente significativos. O maior e o menor valor de Φ_{st} par a par estatisticamente significativos foram observados entre as regiões dos rios Purus e Tapajós ($\Phi_{st} = 0,7300$) e as regiões do rio Negro e rio Araguaia ($\Phi_{st} = 0,5446$), respectivamente (Tabela 4).

O teste de Mantel resultou em um coeficiente de correlação que ficou acima do limiar da significância estatística ($r = 0,4076$; $p = 0,0530$), o que levou à aceitação da hipótese de que não ocorre isolamento genético por distância.

Tabela 4 – Valores de Φ_{st} par a par entre *Brachyplatystoma filamentosum* de 12 regiões da Amazônia brasileira.

	Belém (ESA)	Santarém (ESA)	Manaus (ESA)	Tefé (ESA)	Tabatinga (ESA)	Rio Branco	Rio Madeira	Rio Purus	Rio Juruá	Rio Negro	Rio Tapajós
Santarém (ESA)	0,0036										
Manaus (ESA)	- 0,0311	- 0,0164									
Tefé (ESA)	0,0210	0,0318	- 0,0318								
Tabatinga (ESA)	- 0,0084	0,0091	- 0,0437	- 0,0167							
Rio Branco	0,0236	0,0668	- 0,0128	0,0312	- 0,0215						
Rio Madeira	0,0062	0,0215	- 0,0067	- 0,0018	0,0020	0,0526					
Rio Purus	0,0712	0,0855	- 0,0087	0,1048	0,1243	0,1479	0,1028				
Rio Juruá	0,0236	0,0227	- 0,0487	0,0064	- 0,0264	- 0,0203	0,0250	0,1127			
Rio Negro	0,6297	0,6865	0,7016	0,6434	0,7019	0,6946	0,6472	0,7102	0,7142		
Rio Tapajós	0,6453	0,7048	0,7149	0,6712	0,7185	0,7187	0,6702	0,7300	0,6581	0,5543	
Rio Araguaia	0,5876	0,6522	0,6394	0,6193	0,6583	0,6581	0,6180	0,6757	0,6712	0,5446	0,0829

ESA=Eixo Solimões/Amazonas; valores em negrito significativos a 5% após a correção de Bonferroni.

Análise filogenética

O filograma obtido pelo método de aproximação dos vizinhos demonstrou que as sequências da região controle do DNA mitocondrial de *B. filamentosum* formaram dois clados (A e B) de origem monofilética (Figura 2).

O clado “A” foi formado por 225 sequências (130 haplótipos), das quais 99% oriundas das nove regiões caracterizadas pelas águas brancas, 0,5% de região com águas claras (rio Araguaia) e 0,5% de região com águas pretas (rio Negro). Esse clado foi suportado por um baixo valor de bootstrap (57%).

O clado B foi suportado por um alto valor de bootstrap (91%) e originou dois clados, B-I e B-II, suportados pelos valores de bootstrap de 53% e 84% respectivamente.

O clado “B-I” foi formado por 19 sequências (11 haplótipos), das quais 84,2% foram oriundas de região com águas pretas (rio Negro), 10,5% de região com águas claras (rio Tapajós) e 5,3% de região de águas brancas (rio Branco).

O clado “B-II” foi formado por 18 sequências (13 haplótipos), das quais 94% foram oriundas das regiões de águas claras (rios Tapajós e Araguaia), e 6% de região com águas brancas (Belém).

Na figura 3 são apresentadas as distribuições de frequência das sequências ou haplótipos pelos três principais clados, dentro de cada região.

Os sub-clados formados a partir do clado “A” não apresentaram uma relação com a posição geográfica das nove regiões de águas brancas.

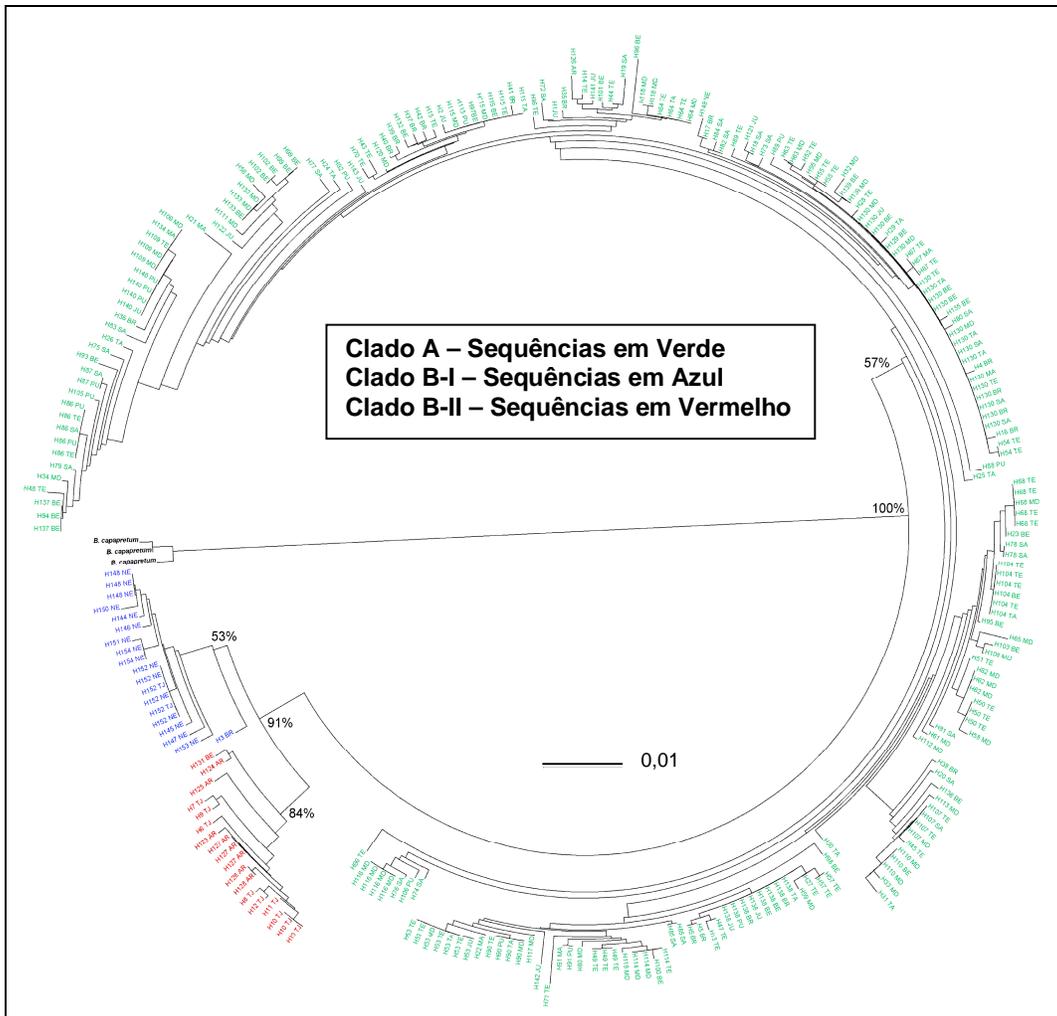


Figura 2 – Filograma com 262 sequências (154 haplótipos) da região controle do DNA mitocondrial de *Brachyplatystoma filamentosum*, estimado pelo método de aproximação dos vizinhos. As sequências são identificadas por seus respectivos números haplotípicos e siglas das regiões de amostragem, como descrito na tabela 2. As cores das sequências correspondem a três clados suportados por valores de *bootstrap* indicados na figura. A barra corresponde à escala de divergência genética.

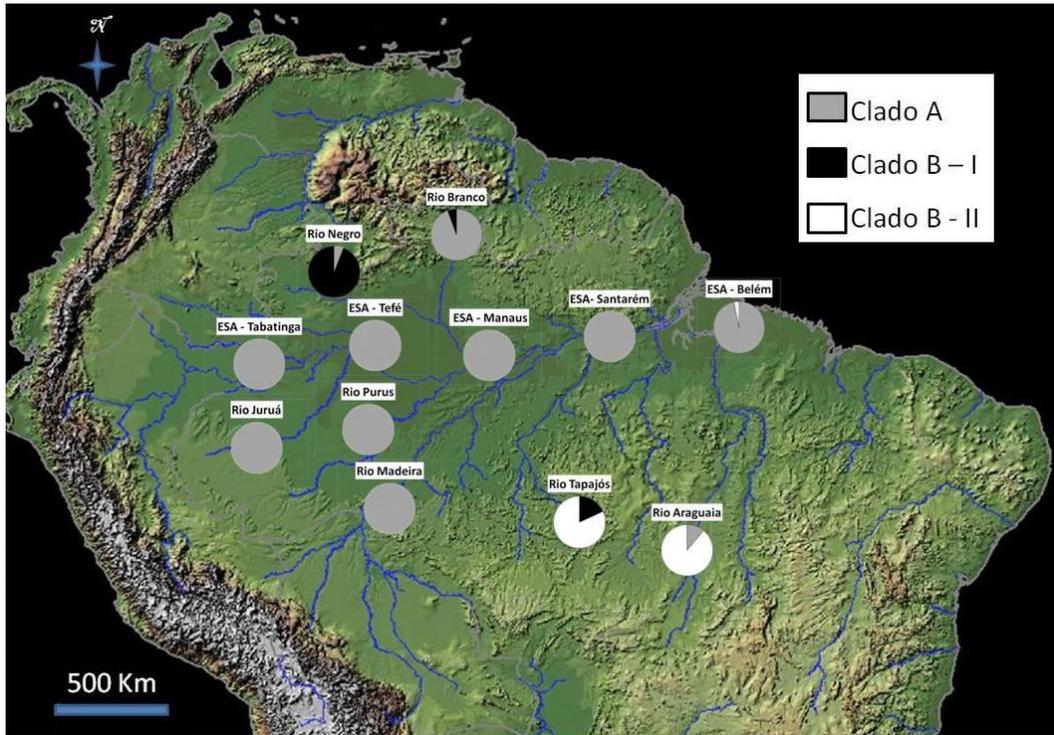


Figura 3 – Mapa indicando as distribuições de frequência dos haplótipos em cada clado, dentro de cada região.

Estimativa da diversidade genética dos clados

Os valores de diversidade haplotípica foram altos nos três clados. A diversidade nucleotídica foi alta no clado “A” e extremamente baixa nos clados B-I e B-II (Tabela 5).

Tabela 5 – Estimativas dos parâmetros genéticos da região controle do DNA mitocondrial de *Brachyplatystoma filamentosum* nos clados.

Clados	N° seq.	N° hap.	(Hd ± d.p.)	(π ± d.p.)	S	TS	TV	Indels	Composição nucleotídica (%)			
									A	C	G	T
Clado A	225	130	0,9871 ± 0,0028	0,01116 ± 0,0059	63	57	6	2	32,72	21,86	13,75	31,67
Clado B-I	19	11	0,8889 ± 0,0577	0,0036 ± 0,0021	14	13	1	0	32,65	21,82	13,58	31,95
Clado B-II	18	13	0,9542 ± 0,0335	0,0037 ± 0,0022	15	14	1	0	32,42	22,11	13,92	31,55

N° seq=número de sequências; N° hap. Número de haplótipos; Hd=Diversidade haplotípica; π=diversidade nucleotídica; S= número de sítios polimórficos; TS= número de transições; TV=número de transversões.

Estimativa da divergência genética dentro e entre os clados

O maior valor de divergência genética par a par não corrigida foi encontrado entre os clados A e B-II ($0,0294 \pm 0,0053$). Internamente, o clado "A" apresentou a maior divergência genética ($0,0105 \pm 0,0019$). Entre os três clados o fluxo gênico em número de fêmeas migrantes por geração foi restrito (<1) (Tabela 6).

Tabela 6 – Estimativas médias (\pm e.p.) das divergências genéticas par a par não corrigidas de *Brachyplatystoma filamentosum* entre (abaixo da diagonal) e dentro (diagonal) dos clados obtidos pelo método de aproximação de vizinhos. Acima da diagonal as estimativas do fluxo gênico entre os clados, em número de fêmeas migrantes por geração (Nm).

Clados	Clado A	Clado B - I	Clado B - II
Clado A	$0,0105 \pm 0,0019$	0,2614	0,2329
Clado B - I	$0,0268 \pm 0,0051$	$0,0036 \pm 0,0011$	0,1750
Clado B - II	$0,0294 \pm 0,0053$	$0,0140 \pm 0,0032$	$0,0036 \pm 0,0011$

Análise de contração-expansão populacional dos clados

Os resultados obtidos com o teste F_s (Fu, 1997) demonstraram que o desvio da neutralidade mutacional foi estatisticamente significativo para todos os clados. Esses resultados indicaram uma expansão populacional ou um efeito de gargalo de garrafa, aos quais os três clados foram submetidos em um passado recente. O formato da distribuição de frequência das diferenças genéticas par a par (*mismatch distribution*) foi unimodal para os três clados, corroborando a hipótese de expansão populacional (Figura 4).

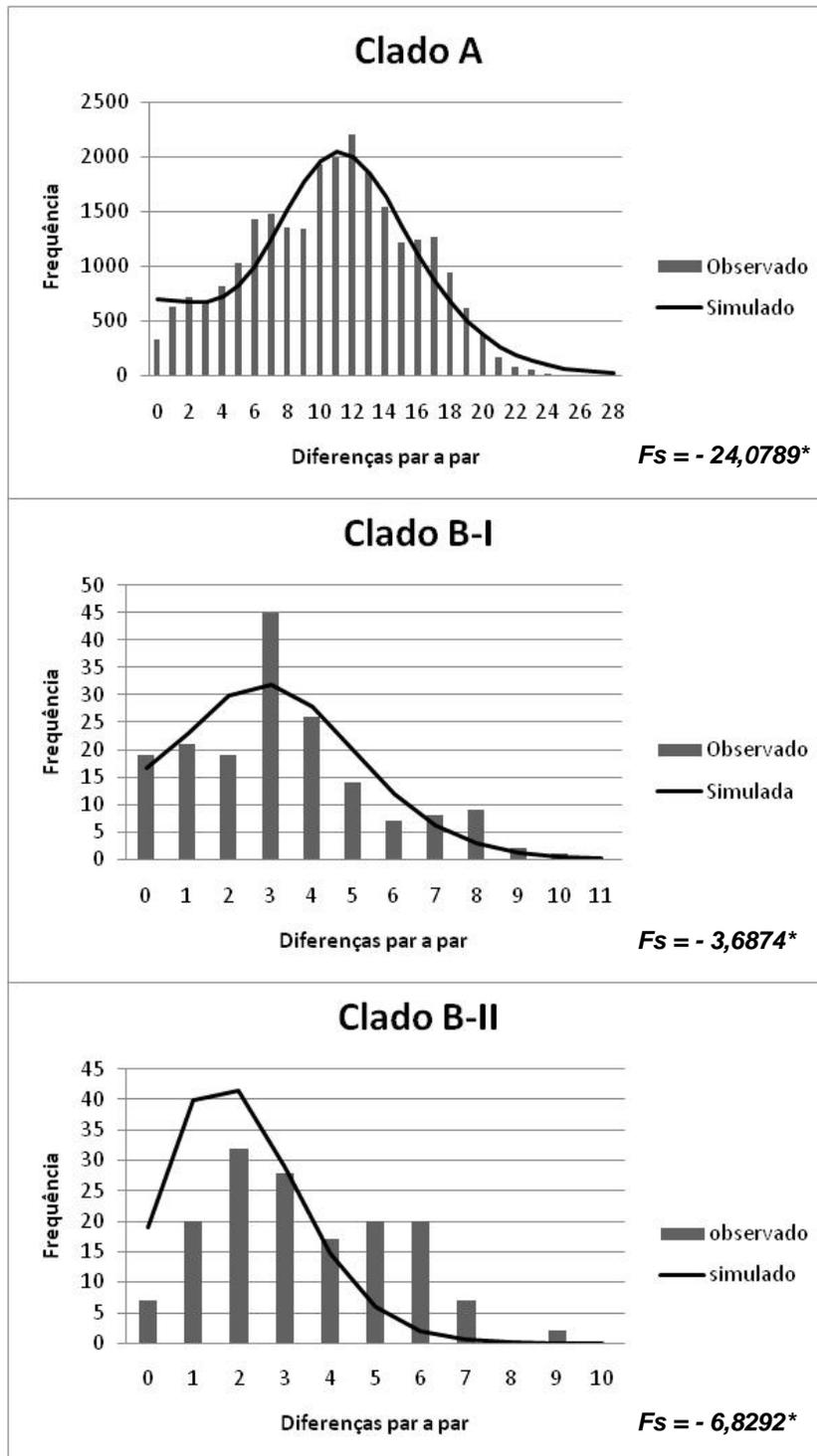


Figura 4 – Estimativas dos valores do teste de neutralidade mutacional F_s e histogramas de distribuição de frequência das diferenças genéticas par a par dos três clados, como os valores observados e simulados. * significativo a 5%.

DISCUSSÃO

A forte estruturação genética e a existência dos três clados de *B. filamentosum*, a primeira vista indica uma relação direta desses com os três diferentes tipos de águas encontrados nos rios da bacia, que, por sua vez, se originam em regiões geologicamente diferentes.

De acordo com Lundberg (2005) o gênero *Brachyplatystoma* já existia a oeste da bacia amazônica há cerca de 13 milhões de anos, portanto, um ancestral comum aos três clados de *B. filamentosum* provavelmente habitava a região oeste da bacia nessa época. O fraturamento do arco tectônico do Purus há oito milhões de anos permitiu a ligação das duas bacias que drenavam a Amazônia (uma fluía para leste e a outra para oeste), estabelecendo o fluxo no sentido atual, de oeste para leste (Lundberg *et al.*, 1998). Com esse novo padrão na drenagem, o ancestral comum aos clados pode ter ampliado sua distribuição, alcançando os rios dos escudos do Brasil e das Guianas.

Posteriormente, há cerca de cinco milhões de anos, ocorreu uma transgressão marinha de grande magnitude que isolou os rios que drenavam a cordilheira dos Andes e os escudos da Guiana e do Brasil, em três áreas que serviram como refúgios de terras emersas (Hubert e Renno, 2006). Essa transgressão marinha, que durou aproximadamente 800 mil anos, pode ter desencadeado um processo de especiação alopátrica ao qual foram submetidos os peixes que habitavam os rios desses refúgios, incluindo as populações de *B. filamentosum*, estabelecendo o clado “A” nos rios oriundos da drenagem Andina, o clado “B-I” nos rios do escudo das Guianas e o Clado “B-II” nos rios do escudo Brasileiro. Por meio do seqüenciamento do DNA

mitocondrial dos peixes da família Rivulidae, Hrbek e Larson (1999) encontraram uma associação entre os grupos filogeneticamente basais e a existência dos escudos do Brasil e Guianas. Contudo, a hipótese de alopatria não é suficientemente robusta para explicar o predomínio do clado “A” na região do rio Branco, que pertence ao escudo das Guianas.

Segundo Wilkinson *et al.* (2006), um mega fan-delta pode ter existido na região compreendida entre as bacias leste e oeste, nas quais a drenagem amazônica encontrava-se dividida há oito milhões de anos. Esse mega fan-delta possivelmente se conectava em períodos de tempo alternados com uma das duas bacias, favorecendo a dispersão da ictiofauna entre ambas. Essa condição também leva-nos a sugerir que o ancestral comum dos três clados de *B. filamentosum* pode ter conseguido se estabelecer nos rios que drenavam os escudos do Brasil e Guiana utilizando essas conexões, e a partir delas, tenha iniciado um processo de especiação peripátrica. Esse tipo de especiação é geralmente associado ao efeito fundador. Entretanto, segundo a interpretação de Grant e Bowen (1998), a alta diversidade haplotípica não sugere um efeito fundador para os clados B-I e B-II.

Os processos de diversificação alopátrico e peripátrico aqui propostos para explicar a relação entre filogenética e distribuição geográfica de *B. filamentosum*, não incorporam toda a complexidade de eventos geológicos que já atuaram na Amazônia ao longo do tempo, sendo essa ainda uma das regiões geologicamente menos conhecidas do globo (Tassinari e Macambira, 2004). Para exemplificar a problemática envolvida entre os processos de especiação nos ambientes aquáticos amazônicos e a história geológica da

bacia, consideramos a hipótese da formação do moderno sistema de drenagem amazônico proposta por Campbell Jr *et al.* (2006), a qual sugere que o fluxo do sistema amazônico no sentido oeste-leste só foi estabelecido a partir de 2,5 milhões de anos, e no período anterior a esse (Neogeno inferior), grande parte da bacia foi dominada por um grande lago (lago Amazonas) ou um complexo de grandes lagos pontuado por regiões pantanosas sujeitas a inundações periódicas. De que maneira esses ambientes podem ter influenciado o processo evolutivo da biota aquática da Amazônia? Os supostos lagos foram capazes de isolar reprodutivamente populações de espécies com ciclo de vida restrito a ambientes lóticos? Essas questões, somadas às hipóteses de especiação alopátrica ou peripátrica, levam a uma incerteza acerca do início da separação dos clados de *B. filamentosum*. Essa incerteza frustrou uma estimativa sobre a taxa de substituição nucleotídica da região controle ao longo do tempo. Nesse sentido, estudos futuros visando elucidar a história evolutiva de *B. filamentosum*, e a calibração do relógio molecular, deverão contemplar a análise das populações que habitam os rios Orinoco e Essequibo. As bacias, amazônica e do rio Orinoco ainda possuem uma conexão efetiva pelo canal do rio Cassiquiare. Nessa região há um gradiente químico entre as águas negras das cabeceiras do rio Negro e as águas claras das cabeceiras do rio Orinoco, que atua como um filtro para dispersão de espécies entre as duas bacias (Winemiller *et al.*, 2008). Contudo, não há informações sobre a possível migração de *B. filamentosum* entre as duas bacias por esse canal. O rio Branco foi ligado ao rio Essequibo e fluía para o norte (antigo sistema Proto-Berbice) até o final do Mioceno quando então foi capturado pela drenagem amazônica

via rio Negro (Ferreira *et al.*, 2007). Anualmente, as savanas de Rupununi, localizadas entre as drenagens do rio Branco e do rio Essequibo, são inundadas, o que permite a conexão entre as duas bacias e a dispersão de peixes adaptados às condições daquele ambiente efêmero (Lowe MacConell, 1999). No entanto, não é conhecida a presença de *B. filamentosum* nessa região durante as inundações. Nos gêneros *Cichla*, *Prochilodus* e *Semaprochilodus*, foram verificadas tendências a divergência genética pela existência de clados nos rios Orinoco e nas drenagens do Amazonas e Guianas (Willis *et al.*, 2007, Sivasundar *et al.*, 2001 e Castro e Vari, 2004). Em algumas áreas da Amazônia colombiana, as unidades geológicas e as diferenças nos parâmetros químicos dos corpos d'água delas derivadas, são considerados os fatores responsáveis pela diversidade e composição das comunidades de peixes de igarapés (Arbeláez *et al.*, 2008).

Outros aspectos importantes a serem considerados, são as prováveis adaptações fisiológicas de *B. filamentosum* aos diferentes tipos de águas, as quais também podem ter acentuado o isolamento genético dos clados. Nesse contexto, as diferenças na composição química das águas serviriam como uma barreira ao fluxo gênico mesmo quando da ausência de barreiras geográficas. Em águas pobres em íons e com baixo pH como as do rio Negro, os peixes necessitam de adaptações fisiológicas para manter a regulação iônica (González, 1996). Para a arraia de água doce *Potamotrygon cf. hystrix*, essa adaptação parece limitar sua distribuição geográfica nas águas do rio Negro acima da confluência com o rio Branco (Silva *et al.*, 2007). Diferenças na composição química dos rios amazônicos foram sugeridas como um dos

fatores responsáveis pelo padrão filogeográfico observado nos gêneros *Symphysodon* e *Cichla* (Willis *et al.*, 2007; Farias e Hbrek, 2008). A existência de afluentes com águas pretas na região do rio Tapajós, como o rio Cururu (Sioli, 1984), pode estar relacionada à presença do clado “B-I” nessa bacia. Contudo, as frações do clado “A” nas regiões dos rios Negro e Araguaia, do clado “B-I” nas regiões dos rios Branco e Tapajós, e do clado “B-II” na região de Belém, podem indicar que as adaptações fisiológicas aos diferentes tipos de águas sejam um fator de menor importância para o isolamento genético dos clados de *B. filamentosum*. Segundo Grant *et al.* (1999) algumas espécies de peixes apresentam uma reassociação geográfica de grupos geneticamente diferentes quando da remoção das barreiras físicas ao fluxo gênico, o que poderia estar ocorrendo com *B. filamentosum* atualmente.

Com base nas suposições aqui apresentadas, é provável que a existência dos três clados de *B. filamentosum* seja resultante de uma combinação de eventos, tanto hidrogeológicos, como do isolamento em refúgios durante a subida do nível do mar e das adaptações fisiológicas aos diferentes tipos de rios.

O clado “A” está distribuído nas águas brancas da Amazônia central e nos principais tributários que possuem esse tipo de água, incluindo a região do rio Branco. Os valores de Φ_{st} não significativos entre essa região e as demais regiões de águas brancas, indicam a existência de fluxo gênico entre elas. Entretanto, durante o deslocamento entre as regiões do rio Branco e Manaus, os peixes do clado “A” (possivelmente adaptados a composição química das águas brancas) deveriam percorrer uma distância mínima de 320 Km nas

águas pretas do rio Negro, com baixo pH e concentração de íons. Ainda são desconhecidos os fatores que levam esses peixes a entrarem nas águas pretas do rio Negro. A entrada pode ter caráter aleatório, com os peixes fazendo incursões esporádicas nas águas do rio Negro a partir da foz do rio Branco ou do rio Solimões. Por outro lado, a subida de *B. filamentosum* pelo rio Negro a partir de Manaus, pode ser induzida e orientada pela percepção da composição química da água do rio Branco pelos peixes, ou simplesmente por perseguição a presas, o que certamente compensaria o gasto energético da natação. Segundo Ferreira *et al.* (2006), os cátions não-metálicos e ânions no curso do rio Negro aumentam sua concentração a jusante da foz do rio Branco. Siluriformes são extremamente sensíveis à percepção de substâncias diluídas na água, como aminoácidos (Caprio, 1977). Nesse caso, *B. filamentosum* poderia apresentar um mecanismo de orientação e navegação semelhante ao observado para os salmonídeos durante a migração reprodutiva (*homing*), os quais reconhecem os odores da composição química das águas dos rios onde nasceram, e neles retornam para desovar (Keefer *et al.*, 2006). O uso do olfato para reconhecer áreas de desova também foi observado para peixes que habitam recifes de coral (Døving *et al.*, 2006). Para *B. filamentosum*, a percepção do tipo de água não estaria exclusivamente relacionada a um comportamento de *Homing*, mas também ao reconhecimento de ambientes que possuem a composição química das águas compatíveis com a faixa de conforto para os peixes (Leggett, 1977). O padrão migratório de *B. filamentosum* é desconhecido (Araújo-Lima e Ruffino, 2003; Barthem e Goulding, 2007) e para a espécie foi apenas observado o deslocamento

reofílico para fins reprodutivos (Agudelo-Córdoba *et al.*, 2000). Embora os resultados do presente capítulo não forneçam elementos suficientes que suportem a ocorrência do *homing* em *B. filamentosum*, sua possibilidade e a relação direta com as diferentes composições químicas das águas dos rios Amazônicos, não podem ser descartadas. O comportamento de *homing* foi sugerido por Batista e Alves Gomes (2006) como o responsável pela diminuição da variabilidade genética de *B. rousseauxii* entre as regiões de Belém e Tabatinga. Na bacia do rio Paraná, também foi sugerido o comportamento de *homing* para *Pseudoplatystoma corruscans* (outro pimelodideo migrador de grande porte), baseado em diferenças genéticas (Pereira *et al.*, 2008). A exemplo do fluxo gênico do clado “A” entre a região do rio Branco e as demais regiões de águas brancas, também são desconhecidos os fatores que determinam o intercâmbio dos peixes do clado “B-II”, entre as regiões dos rios Araguaia e Tapajós. Anteriormente à construção da hidrelétrica de Tucuruí no rio Tocantins os peixes precisavam deslocar-se aproximadamente 800 Km nas águas brancas do canal principal do rio Amazonas para manter o fluxo gênico entre essas duas regiões de águas claras (valor de Φ_{st} par a par não significativo). Após a construção da barragem, é provável que o fluxo gênico entre as duas regiões tenha sido interrompido.

A evolução dos padrões migratórios em peixes resulta do sucesso reprodutivo em certos locais, os quais tendem a maximizar a sobrevivência e o crescimento dos juvenis (Dodson, 1997). No caso de *B. filamentosum*, os peixes adaptados às características químicas de um tipo de água poderiam não obter sucesso reprodutivo ou diminuí-lo expressivamente em águas com outras

características químicas. Estudos sobre a larvicultura de *Rhamdia quelen* (Siluriformes: Heptapteridae) demonstraram que a sobrevivência das larvas foi influenciada por alterações controladas do pH e da dureza da água (Lopes *et al.*, 2001, Townsend *et al.*, 2003). Segundo Leite *et al.* (2007) os ovos e larvas dos grandes bagres migradores amazônicos parecem se desenvolver exclusivamente no canal dos rios. Esses fatores nos levam a concluir que em *B. filamentosum*, a migração e o ciclo de vida provavelmente estão restritos aos diferentes tipos de águas dos rios amazônicos.

As localidades tipo dos cinco holótipos de *B. filamentosum* (Lundberg e Littmann, 2003) e a facilidade de acesso à calha principal dos rios Solimões/Amazonas pelos primeiros naturalistas, sugere que os mesmos tenham sido coletados em rios de águas brancas. Assim, há grande probabilidade dos holótipos pertencerem ao clado “A”. Apesar do táxon *B. filamentosum* ser bem estabelecido, essa situação nos levou a questionar qual seria a definição taxonômica dos demais clados. Em outras palavras, os três clados de *B. filamentosum* podem ser classificados como espécies distintas ou populações da mesma espécie? O maior valor de divergência genética encontrado entre os clados de *B. filamentosum* (2,9% entre o clado A e B-II), está bem abaixo do valor (10%) encontrado entre as duas espécies de piraíba, *B. filamentosum* e *B. capapretum* (capítulo 1). Entretanto, dentro do gênero *Pseudoplatystoma*, o seqüenciamento da região controle do DNA mitocondrial revelou uma divergência mínima de 4,8% entre *P. tigrinum* e *P. reticulatum*, que foi suficiente para validar o *status* taxonômico dessas espécies (Torrico *et al.*, 2009). Dessa maneira, para a confirmação da existência ou não, de duas

novas espécies de *Brachyplatystoma* correspondentes aos clados B-I e B-II, será necessário o uso de outras ferramentas de estudo, como a morfologia (osteologia) e o seqüenciamento de genes nucleares (RAG).

Para suprir o lapso taxonômico, e abordar o contexto da conservação, consideramos que os clados de *B. filamentosum* correspondem apenas a “Recursos Genéticos Pesqueiros”, uma denominação geral recomendada pelo Grupo Consultivo Internacional de Pesquisa em Agricultura (CGIAR) para as diferentes categorias de recursos genéticos aquáticos (Pullin, 2000). Medidas visando o manejo para fins de conservação desses três recursos genéticos pesqueiros devem ser elaboradas e aplicadas separadamente para cada um (Waples, 1998). O primeiro passo nesse sentido foi a definição das “unidades de conservação” de *B. filamentosum*, e para qual utilizamos a classificação baseada no número de fêmeas migrantes por geração proposta por Wood e Holtby (1998) para o Salmão *sockeye* (*Oncorhynchus kitsch*). De acordo com essa classificação, o número de fêmeas migrantes por geração trocadas entre os três recursos genéticos pesqueiros (ou clados) de *B. filamentosum* os define como “populações fechadas”, as quais estão completamente isoladas, trocando menos que uma fêmea migrante por geração e altamente vulneráveis quando sua população é reduzida. Esse é o menor tipo de unidade de conservação considerado pela IUCN (*International Union for Conservation of Nature*) para inclusão no livro vermelho de espécies ameaçadas (Mace e Lande, 1991). Assim, por meio dessa classificação, estabelecemos que os três clados de *B. filamentosum* correspondem a três populações: população “A”, população “B-I” e população “B-II”, respectivamente.

As composições nucleotídicas da região controle nas três populações apresentaram maiores quantidades das bases A e T e menores quantidades das bases C e G. Esse padrão é o mais comum para a região controle dos genomas mitocondriais (Chiang *et al.*, 2006).

Devido à impossibilidade da calibração do relógio molecular, não foi possível estimar as épocas prováveis em que ocorreram as expansões populacionais súbitas das três populações, demonstradas pelos resultados das análises de contração-expansão. Entretanto, semelhante ao exposto no capítulo 1 para *B. filamentosum* e *B. capapretum*, de acordo com Grant e Bowen (1998), as relações entre diversidades haplotípicas e nucleotídicas sugerem que a população “A” é grande e estável, e possui uma longa história evolutiva ou contato secundário entre linhagens diferentes, e as populações “B-I” e “B-II” foram submetidas a um efeito de gargalo de garrafa, seguido de um rápido crescimento populacional.

A fragmentação de habitats é um fator que pode potencialmente diminuir a diversidade genética dos peixes (Templeton *et al.*, 2001). A fragmentação de habitats lóticos na Amazônia em decorrência da construção de barragens para fins de geração de energia elétrica interfere de forma negativa, principalmente no ciclo de vida de espécies migradoras, como *B. filamentosum* (Godinho e Kynard, 2008). Além disso, essa espécie, que demonstra possuir uma relação estreita com a composição química das águas, também está susceptível a mudanças nessas características, causadas pelo aumento da turbidez da água devido à erosão do solo causada pelo desflorestamento, e a poluição aquática (Junk *et al.*, 2007). Em *B. filamentosum* foram encontrados altos níveis de

contaminação por mercúrio em amostras oriundas dos rios Tapajós e Madeira (Uryu *et al.*, 2001; Bastos *et al.*, 2008).

O valor médio da diversidade nucleotídica da população “A” foi similar aos valores médios observados para a região controle de outras espécies de peixes migradores amazônicos, como a piramutaba *B. vaillanti* ($\pi = 0,0166$), a dourada ($\pi = 0,0095$) e o tambaqui *Colossoma macropomum* ($\pi = 0,0120$) (Formiga-Aquino, 2004; Batista e Alves-Gomes, 2006; Santos *et al.*, 2007). Essas três espécies foram incluídas na categoria de sobreexplotadas ou ameaçadas de sobreexplotação pelo Ministério do Meio Ambiente do Brasil (MMA, 2004). Embora observado o índice de sobreexplotação de *B. filamentosum* na região Tabatinga (Petrere *et al.*, 2004; Barthem e Goulding, 2007), a classificação dessa espécie em relação ao nível de exploração ainda não foi estabelecida pelo Ministério do Meio Ambiente. A presença da população “A” em águas brancas nos leva a sugerir que o índice de sobreexplotação de *B. filamentosum* é, na verdade, relativo a essa população. Além disso, os valores ainda mais baixos das diversidades nucleotídicas das populações “B-I” e “B-II” sugerem que, do ponto de vista genético, as três populações devem ser incluídas de forma urgente na lista de espécies de peixes sobreexplotados ou ameaçados de sobreexplotação do Ministério do Meio Ambiente do Brasil.

BIBLIOGRAFIA CITADA

Agudelo-Córdoba, E.; Y. Salinas-Coy; C. L. Sánchez; Muñoz-Sosa, D. L.; Alonso-González, J. C.; Arteaga-Díaz, M. E. A; Rodríguez-Pietro, O. J. R.; Anzola-Potes, N. R.; Acosta-Muñoz, L. E.; Núñez-Avellaneda, M.; Valdés-Carrillo, H. 2000. *Bagres de la amazonía colombiana: Un Recurso sin Fronteras*. Instituto Amazónico de Investigaciones Científicas-SINCHI. Bogota. Colombia. 253 p.

Araújo-Lima, C. A. R. M., Ruffino, M. L. 2003. Migratory Fishes of the Brazilian Amazon. *In: Carosfeld, J.; Harvey, B.; Baer, A.; Ross, C. (Eds.) Migratory Fishes of the South America: Biology, Social Importance and Conservation Status*, World Bank Technical Paper, Victoria, 380 p.

Arbeláez, F.; Duivenvoorden, J. F.; Maldonado-Ocampo, J. A. 2008. Geological differentiation explains diversity and composition of fish communities in upland streams in the southern Amazon of Colombia. *Journal of Tropical Ecology*, 24: 505-515.

Barthem, R. B., Goulding, M. 2007. *Um ecossistema inesperado: a Amazônia revelada pela pesca*. Amazon Conservation Association e Sociedade Civil Mamirauá, Lima. 241 p.

Barthem, R. B.; Goulding, M. 1997. *Os Bagres Balizadores: Ecologia, Migração e Conservação de Peixes Amazônicos*. Sociedade Civil Mamirauá; CNPq, Brasília. 140 p.

- Barthem, R. B.; Ribeiro, M. C. L. B.; Petrere, M. 1991. Life Strategies of some Long-Distance Migratory Catfish in Relation to Hydroelectric Dams in the Amazon Basin. *Biological Conservation*, 55: 339 – 345.
- Bastos, W. R.; Rebelo, M. F.; Fonseca, M. F.; Almeida, R. Malm, O. 2008. A description of Mercury in fishes from the Madeira River Basin, Amazon, Brazil. *Acta Amazonica*, 38: 431-437.
- 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 Resesarch*, 5(4): 723-740.
- Campbell Jr., K. E.; Frailey, C. D; Romero-Pittman, L. 2006. The Pan-Amazonian Ucayali Peneplain, late Neogene sedimentation in Amazonia, and the birth of the modern Amazon River system. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*, 239: 166–219.
- Caprio, J, 1977. Electrophysiological distinctions between the taste and smell of amino acids in catfish. *Nature*, 266: 850 – 851.
- Castro, R.M., Vari, R.P., 2004. Detritivores of the South American Fish family Prochilodontidae (Teleostei: Ostariophysi: Characiformes): a phylogenetic and revisionary study. *Smithsonian Contribution to Zoology*, 622: 1–189.
- Chiang H.C., Hsu, C.C.; Lin, H.D.; Ma, G.C.; Chiang, T.Y.; Yang, H.Y. 2006. Population structure of bigeye tuna (*Thunnus obesus*) in the South China

- Sea, Philippine Sea and western Pacific Ocean inferred from mitochondrial DNA. *Fisheries Research* 79: 219-225.
- Dodson, J.J., 1997. Fish migration: an evolutionary perspective. *In*: Godin, J.J. (Ed.), *Behavioural Ecology of Teleost Fishes*. Oxford University Press, Oxford p. 10-36..
- Doupé, R.G.; Lymbery, A.J. 2000. Workshop summary: managing translocations of aquatic species. *Aquaculture Research*, 31: 151-156.
- Døving, J.B., Stabell, O.B., Ostlund-Nilsson, S.; Fisher, R. 2006. Site fidelity and homing in tropical coral reef cardinalfish: are they using olfactory cues? *Chemical Senses*, 31: 265–272.
- Dupanloup, I.; Schneider, S.; Excoffier, L. 2002. A simulated annealing approach to define the genetic structure of populations. *Molecular Ecology*, 11, 2571-2581.
- ESRI. 2006 – *ArcGIS Professional GIS for the desktop, version 9.2*. Environmental Systems Research Institute, Inc. Software.
- Excoffier, L.; Laval, G.; Schneider, S. 2005. Arlequin (version 3.0): An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online*, 1: 47-50.
- Farias, I. P. ; Hrbek, T . Patterns of diversification in the discus fishes (*Symphysodon* spp. Cichlidae) of the Amazon basin. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 49: 32-43, 2008.

- Ferreira, E.; Zuanon, J.; Fosberg, B.; Goulding, M.; Briglia-Ferreira, R.. 2007. *Rio Branco: Peixes, Ecología e Conservação de Roraima*. Amazon Conservation Association, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Sociedade Civil Mamirauá. Manaus, Brazil. 201 p.
- Formiga-Aquino, K. 2004. *Variabilidade genética da piramutaba - Brachyplatystoma vaillantii (Valenciennes, 1840) (Siluriformes:Pimelodidae) no sistema Estuário-Amazonas-Solimões*. Dissertação de Mestrado. INPA/FUA. Manaus. 76 p.
- Fu, Y.X. 1997. Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics*, 147: 915–925.
- Furch, K, 1984. Water chemistry of the Amazon Basin: the distribution of chemical elements among freshwaters. In: Sioli, H. (ed.). *The Amazon Limnology and landscape ecology of a mighty tropical river and its basin*. Junk, Dordrecht: p.167-169.
- Godinho, H. P. 2007. Estratégias reprodutivas de peixes aplicadas à aquicultura: bases para o desenvolvimento de tecnologias de produção. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, 31 (3): 351-360.
- Godinho, A. L.; Kynard, B. 2008. Migratory fishes of Brazil: Life history and fish passage needs. *River Research and Applications*, 25: 702-712.

- González, R. J. 1996. Ion regulation in ion poor water of low pH. 111–122. *In*: Val, A.L.; Almeida-Val, V.M.; Randall, D.J. (Eds.). *Physiology and Biochemistry of the Fishes of the Amazon*. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, Brazil.
- Grant, W. S., J. L. Garcia-Marin, and F. M. Utter. 1999. Defining population boundaries for fishery management. *In* : Mustafa, S. (Ed) .*Genetics in Sustainable Fisheries Management*. Fishing News Books, Oxford, p. 27-71.
- Grant, W.S.; Bowen, B. W. 1998. Shallow Population Histories in Deep Evolutionary Lineages of Marine Fishes: Insights From Sardines and Anchovies and Lessons for Conservation. *The Journal of Heredity*, 89(5): 415-426.
- Hall, T.A. 1999. Bio Edit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for windows 95/98/NT. *Nucleic Acid Symposium Series*, 41: 95 -98.
- Harpending, H. 1994. Signature of ancient population growth in a low-resolution mitochondrial DNA mismatch distribution. *Human Biology*, 66: 591–600.
- Hrbek, T.; Larson, A. 1999. The evolution of diapause in the killifish family Rivulidae (Atherinomorpha, Cyprinodontiformes): a molecular phylogenetic and biogeographic perspective. *Evolution*, 53: 1200–1216.
- Hubert, N.; Renno, J.F. 2006. Historical biogeography of South American freshwater fishes. *Journal of Biogeography*, 33: 1414 – 1436.

- Huson, D.H.; Richter, D. C.; Rausch, C.; DeZulian, T.; Franz, M.; Rupp, R. 2007. Dendroscope- An interactive viewer for large phylogenetic trees, *BMC. Bioinformatics*, 8: 460.
- Junk, W. J.; Soares, M. G. M.; Bayley, P. B. 2007. Freshwater fishes of the Amazon River basin: their biodiversity, fisheries, and habitats. *Aquatic Ecosystem Health & Management*, 10 (2): 153-173.
- Keefer, M. L.; Caudill, C. C.; Peery, C. A.; Bjornn, T. C.. 2006. Route selection in a large river during the homing migration of Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Science*, 63: 1752-1762.
- Leggett, W. C. 1977. The ecology of fish migrations. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 8: 285-308
- Leite, R. G. ; Canas, C.;Forsberg, B.; Barthem, R.; Goulding, M.. 2007. *Larvas dos Grandes Bagres Migradores*. INPA/ACCA. Lima, Peru. 127 p.
- Lopes, J.M., Silva, L.V.F., Baldisserotto, B., 2001. Survival and growth of silver catfish larvae exposed to different water pH. *Aquaculture International*, 9(1): 73–80.
- Lovejoy, N.R.; Albert, J.S.; Crampton, W.G.R. 2006. Miocene marine incursions and marine/freshwater transitions: Evidence from neotropical fishes. *Journal of South American Earth Sciences*, 20: 14–27.

- Lowe-McConnell, R.H. 1999. *Estudos Ecológicos de Comunidades de Peixes Tropicais*. São Paulo, USP, 535p.
- Lundberg, J. G., Akama, A. 2005. *Brachyplatystoma capapretum*: a New Species of Goliath Catfish from the Amazon Basin, with a reclassification of Allied Catfishes (Siluriformes: Pimelodidae). *Copeia*, 3: 492 – 516.
- Lundberg, J. G. 2005. *Brachyplatystoma promagdalenae*, new species, a fossil goliath catfish (Siluriformes: Pimelodidae) from the Miocene of Colombia, South America. *Neotropical Ichthyology*, 3(4): 597-605.
- Lundberg, J. G., Littmann, M. W. 2003. Family Pimelodidae. *In*: Reis, R. E., Kullander, S. O. Ferraris, C.J. (Eds). *Check list of the freshwater fishes of South and Central America*. Porto Alegre, EDIPUCRS. pp. 432 – 435.
- 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, Brazil (Chapter 1).
- Mace, G. M. and Lande, R. 1991. Assessing extinction threats: toward a re-evaluation of IUCN threatened species categories. *Conservation Biology*, 5(2):148-157.
- Mantel, N. 1967. The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Research*, 27: 209–220.

- MMA. Ministério do Meio Ambiente. 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 sobreexploração, os invertebrados aquáticos e peixes, constantes dos Anexos a Instrução Normativa.
- Nei, M. 1987. *Molecular Evolutionary Genetics Columbia*. University Press: New York, NY.
- Pereira, L. H. G.; Foresti, F.; Oliveira, C. 2008. Genetic structure of the migratory catfish *Pseudoplatystoma corruscans* (Siluriformes: Pimelodidae) suggests homing behavior. *Ecology of Freshwater Fish*, 18(2): 215 – 225.
- Petrere, M., Barthem, R.B., Córdoba, E.A., Gómez, B.C. 2004. Review of the large catfish fisheries in the upper Amazon and stock depletion of Piraíba (*Brachyplatystoma filamentosum* Lichtenstein). *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 14: 403 – 414.
- Posada, D. 2004. Collapse ver. 1.2. *A tool for collapsing sequences to haplotypes*. (<http://darwin.uvigo.es>). Acesso: 12/07/2007.
- Posada, D.; and Crandall, K.A. 1998. MODELTEST: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics*, 14: 817–818.
- Pullin. R. S. V. 2000. Management of aquatic biodiversity an genetic resources. *Reviews in Fisheries Science*, 8(4):379-393.
- Rice, W. R. 1989. Analyzing tables of statistical tests. *Evolution*, 43: 223–225.

- Rogers, A. R.; Harpending, H. 1992. Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences. *Molecular Biology and Evolution*, 9: 552–569.
- Saitou, N.; Nei, M. 1987. The Neighbor-joining Method: A New Method for Reconstructing Phylogenetic Trees. *Molecular Biology and Evolution*, 4(4): 406-425.
- Santos, G.M.; Ferreira, E.J.G. 1999. Peixes da Bacia Amazônica. In: Lowe-McConnell, R.H (Eds). *Estudos Ecológicos de Comunidades de Peixes tropicais*, São Paulo, EDUSP, pp. 345 – 373.
- Santos, M. C. F.; Ruffino, M. L.; Farias I. P. 2007. High levels of genetic variability and panmixia of the tambaqui *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1816) in the main channel of the Amazon River. *Journal of Fish Biology*, 71 (Supplement A): 33–44.
- Silva, N.F.; Oliveira, A.T.; Gomes, A.P.; Melo, S.M.V.; Shibuya, A.; Araújo, M.L.G.; Costa, O.T.F.; Fernandes, M.N.; Duncan, W.P. 2007. Determinantes da distribuição geográfica da arraia amazônica, *Potamotrygon cf. hystrix* Muller & Henle 1834 (Potamotrygonidae: Chondrichthyes): evidências ecofisiológicas. *Anais do VIII Congresso de Ecologia do Brasil*, Caxambu – MG, p. 1-3.
- Sioli, H. 1984. The Amazon and its main affluents: Hydrography, morphology of the river sources, and river types. In: Sioli, H. (Eds). *The Amazon: Limnology and Landscape Ecology of a Mighty Tropical River and its Basin*.

- Monographiae Biologicae v. 56. Dr. W. Junk Publishers. The Netherlands, pp. 127-165.
- 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.
- Tamura, K., Dudley J., Nei M. ; Kumar, S. 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*, 24: 1596-1599.
- Tamura, K.; Nei, M. 1993. Estimation of the Number of Nucleotide Substitutions in the Control Region of Mitochondrial DNA in Humans and Chimpanzees. *Molecular Biology and Evolution*, 10(3): 512-526.
- Tassinari, C.G.C.; Macambira, M.J.B. 2004. A evolução tectônica do Cráton Amazônico. *In: Neto-Mantesso, V.; Bartorelli, A.; Carneiro, C.D.R.; Britoneves, B.B. (Org)., Geologia do continente sul-americano: evolução da obra de Fernando Flávio Marques de Almeida*, p. 471-486.
- Technelisyum. 1998. Chromas 2.24. (www.technelisyum.com.au). Acesso: 14/07/2008.
- Templeton, AR., Robertson, RJ., Brisson, J. and Strazburg, J., 2001. Disrupting evolutionary processes: the effect of habitat fragmentation on collared lizards in the Missouri Ozarks. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 98, no. 10, p. 5426-5432.

- Torrico, J.P.; Hubert N.; Desmarais E.; Duponchelle F.; Nuñez Rodriguez, J.; Montoya-Burgos, J.; Garcia Davila, C.; Carvajal-Vallejos, F.M.; Grajales, A.A.; Bonhomme, F.; Renno, J.F. 2009. Molecular phylogeny of the genus *Pseudoplatystoma* (Bleeker, 1862): biogeographic and evolutionary implications. *Molecular phylogenetics and evolution*, 51(3): 88-94.
- Townsend, C. R.; Silva L. V. F.; Baldisserotto, B.. 2003. Growth and survival of *Rhamdia quelen* (Siluriformes, Pimelodidae) larvae exposed to different water hardness levels. *Aquaculture*, 215: 103-108.
- Tundisi, J. G. 1994. Tropical South América: Present and Perspectives. *In*: Margalef, R. (Ed). *Limnology Now: A Paradigm of Planetary Problems*. Amsterdã: Elsevier Science. p. 353-424.
- Tundisi, J. G.; Tundisi, T. M. 2008. *Limnologia*. Oficina de Textos. 632 p.
- Uryu, Y.; Malm, O.; Thornton, I.; Payne, I.; Cleary, D. 2001. Mercury Contamination of Fish and Its Implications for other Wildlife of the Tapajós Basin, Brazilian Amazon. *Conservation Biology*, 2: 438-446.
- Vrijenhoek, R.C.1998. Conservation genetics of freshwater fish. *Journal of Fish Biology*, 53 (Supplement A): 394–412.
- Waples, R.S. 1998. Separating the wheat from the chaff: patterns of genetic differentiation in high gene flow species. *Journal Heredity*, 98: 438–450.

- Wilkinson, M.J.; Marshall, L.G.; Lundberg, J.G. 2006. River behavior on megafans and potential influences on diversification and distribution of aquatic organisms. *Journal of South American Earth Sciences*, 21: 151–172.
- Willis, S.C.; Nunes M.S.; 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: 291–307.
- Winemiller, K. O.; Lopez-Fernandez, H.; Taphorn, D. C.; Nico, L. G.; Duque, A. B. 2008. Fish assemblages of the Casiquiare River, a corridor and zoogeographical filter for dispersal between the Orinoco and Amazon basins. *Journal of Biogeography*, 35: 1551–1563.
- Wood, C.C.; Holtby, L.B. 1998. Defining conservation units for Pacific salmon using genetic survey data. *In*: Harvey, B.; Ross, C.; Greer, D.; Carolsfeld, J. (Eds). *Action Before Extinction: An International Conference on Conservation of Fish Genetic Diversity*. World Fisheries Trust, Victoria, Canada, p. 233-250.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O fato de que apenas em 2005 para o recurso pesqueiro chamado “piraíba” foi reconhecida a existência de duas espécies, e agora com a possibilidade de existirem ainda mais duas espécies, mostra-se como um exemplo da necessidade crescente do conhecimento sobre os recursos aquáticos amazônicos, para subsidiar o seu manejo e conservação adequados.

À exemplo de *B. capapretum*, um táxon recém descrito, e com importância econômica, que já demonstra baixos valores de variabilidade genética, também encontram-se na mesma situação as populações B-I e B-II. Essas espécies e populações podem ainda possuir mais “subdivisões” genéticas, que só poderão ser acessadas com o uso de marcadores moleculares com maior poder de resolução, como os microssatélites. Resultados preliminares da estrutura genética de *B. capapretum* baseados na região controle (dados não mostrados aqui) revelaram que provavelmente a espécie compõe-se de uma única população panmítica ao longo dos rios de águas brancas da Amazônia brasileira. Entretanto, sua distribuição também ocorre em águas pretas, e para uma inferência confiável da estrutura genética dessa espécie, amostras desses ambientes devem também ser analisadas.

B. filamentosum e *B. capapretum* são duas espécies capturadas e comercializadas sem distinção, e nesse caso, sugerimos que a primeira ação dos órgãos públicos que regulamentam a atividade pesqueira na bacia amazônica, deva ser enfocada na implantação de medidas legais que monitorem a comercialização das piraíbas com a cabeça, assim como o treinamento dos agentes responsáveis pela coleta de dados da estatística

pesqueira para identificar morfológicamente as espécies durante o desembarque e a comercialização, a fim de incluir *B. capapretum* nos registros estatísticos. A identificação correta dessas espécies também será necessária para a realização de futuros estudos sobre os seus ciclos de vida e as dinâmicas populacionais. Além disso, a adoção de medidas de manejo e conservação para esses dois recursos terá maior possibilidade de êxito quando os setores pesqueiro e governamental incorporarem em sua rotina o fato de que as piraibas capturadas nas águas brancas da Amazônia brasileira, na verdade, correspondem a duas espécies.