



Universidade Federal do Amazonas
Instituto de Ciências Biológicas
Programa Multi-Institucional de Pós-Graduação em Biotecnologia

Estimativa da variabilidade genética da piraíba negra
Brachyplatystoma capapretum (Siluriformes: Pimelodidae), por meio
de marcadores mitocondriais e microssatélites.

Adriel Lira Cordeiro

Manaus

2013



Universidade Federal do Amazonas
Instituto de Ciências Biológicas
Programa Multi-Institucional de Pós-Graduação em Biotecnologia

Adriel Lira Cordeiro

Estimativa da variabilidade genética da piraíba negra
Brachyplatystoma capapretum (Siluriformes: Pimelodidae), por meio
de marcadores mitocondriais e microssatélites.

Dissertação apresentada ao Programa Multi-Institucional de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas para a obtenção do título de Mestre em Biotecnologia, área de concentração Conservação e Uso dos Recursos Genéticos Animais da Amazônia.

Orientador: José Antônio Alves-Gomes, Ph.D

Co-orientador: Jacqueline da Silva Batista, Dra

Manaus

2013

*À minha família que pacientemente soube
compreender meus momentos de omissão.*

*“O que você sabe não tem valor; o valor está no que
você faz com o que sabe”.*

Lee Jun Fan

Agradecimentos

Muitas pessoas participaram diretamente ou indiretamente na concretização desta dissertação, logo peço desculpas as que não são citadas por culpa de minha fálca memória.

Ao Deus todo poderoso, fonte de eterno amor e poço de incondicional paciência, fonte de minhas forças na dedicação deste trabalho.

À minha família a quem dedico essa dissertação, aos duros momentos de omissão familiar.

À PPG-BIOTEC (Programa Multi-Institucional de Biotecnologia) pela minha formação e acesso ao título de mestre na respectiva área, agradeço desde já.

Ao Instituto Nacional de Pesquisas na Amazônia (INPA), pelos recursos cedidos, aparo laboratorial, infraestrutura e logística no término do mestrado.

Ao CNPq (Conselho Nacional de Pesquisa e Tecnologia) pelos auxílios cedidos na forma da bolsa de estudo concedida a minha pessoa.

Aos meus orientadores Dr. José Antônio Alves-Gomes e Dr. Jacqueline da Silva Batista, pelo conhecimento cedido de forma espontânea, sugestões, discussões, orientações e verdadeiros conselhos amigáveis nos momentos mais apertados no “caminho das pedras”...um especial *Thanks!*

À Kyara Formiga pelas orientações e norteamentos realizados no processo desde a primeira iniciação Científica pelo Pibic-INPA.

À nação do Laboratório Temático de Biologia Molecular (LTBM-INPA) e grandes amigos que souberam entender meu temperamento auto-destrutivo na bancada por cinco anos dourados: Giselle Moura (Considerada), Iamili Aguiar (Minha Mana), Andrea Batista, Rosa Jaqueline, Lucicleide Araújo, Larissa Melo, Naiara Vogt, Carolina Maia, Renata Schmitt, Antônio Saulo (B.O), Júlia do Carmo, Gilson Azevedo, Glauco Kohler, Luciana Monteiro, Graciela Lima, Denise Benzaken, Lucijane Carvalho (Botinha), Maysa Matos, João Capurucho, Cris Marks (sumida), Kerolaine Dantas, Karen Dantas, Henrique Lima, Rute Gomes (minha orientanda), .

Um agradecimento especial aos amigos dentro e fora da bancada, Elisama Franco, Francis Paola, Paula Figliuolo e ao casal Jacqueline Fortuna e Andrew Whittaker pelos concelhos amigos sobre o árduo caminho da pesquisa, frustrações, raivas e alegrias.

Ao superamigo Santiago Ramos pela companhia em algumas madrugadas no LTBM para completar as etapas de genotipagem.

Ao colega de sala e aluno de doutorado José Gregório da PPG-BIOTEC pela força extrema nos cálculos populacionais de microssatélites, aceitando auxiliar sem pestanejar, meu muito obrigado!

Ao eterno amigo Leonardo Portes, sempre apoiando minhas posições durante a elaboração da dissertação.

Ao aluno visitante da URI-RS Moisés Dutra que acompanhou e auxiliou efetivamente parte das etapas de bancada envolvendo genotipagens e sequenciamentos.

À aluna de doutorado do PPG-GCBEV Isaura Francini, responsável pelos auxílios na tradução do *primer notes* respectivo ao capítulo I deste trabalho.

À professora Adna Souza, da Universidade Federal da Paraíba (UFPB), co-autora neste trabalho e grande esclarecedora das análises realizadas.

OBRIGADO!!!

Resumo

A larga comercialização dos grandes bagres migradores amazônicos iniciou-se em meados década de 70 com o aumento dos incentivos fiscais na abertura de novos portos de desembarque pesqueiro e frigoríficos locais. A piraíba preta (*Brachyplatystoma capapretum*) compõe uma das espécies de bagres amazônicas largamente comercializadas, compartilhando sua captura com a piraíba (*Brachyplatystoma filamentosum*), devido a difícil discriminação dos seus caracteres morfológicos. Esta dissertação divide-se em dois capítulos no formato de artigos científicos. No capítulo I foram desenvolvidos 24 locos microssatélites por bibliotecas genômicas enriquecidas e testado sua amplificação nas demais espécies do gênero *Brachyplatystoma*. Apenas três locos foram monomórficos nas amplificações em 26-38 indivíduos de *B.capapretum*. O número de alelos por loco variou de 1 à 12 e valores na heterozigosidade observada e esperada variaram de 0.02 à 0.93, e 0.08 à 0.81, respectivamente. Três locos apresentaram desvio de HWE e foi sugerida a presença de alelos nulos em outros seis locos microssatélites. Na amplificação heteróloga, locos monomórficos espécie-específicos (BC04 e BC06) apresentaram polimorfismo nas demais espécies. Estes locos desenvolvidos podem servir de ferramentas para posteriores estudos de genética de populações nas demais espécies do gênero *Brachyplatystoma*. No capítulo II foram discriminados geneticamente 194 indivíduos de *Brachyplatystoma* pertencentes a cinco espécies de bagres comerciais (*B.filamentosum*, *B.capapretum*, *B.rousseauxii*, *B.vaillantii* e *B.platynemum*). A análise da estrutura populacional foi inferida por marcadores mitocondriais (região controle) com base em 186 exemplares de *B.capapretum* provenientes de nove localidades amazônicas. Foram sequenciados 914 pb da região controle do DNAm onde se observou 75 haplótipos e 58 haplótipos únicos. A média da diversidade haplotípica (**HD**) foi de 0,939 e diversidade nucleotídica (π) de 0,0034. Posteriormente, 164 indivíduos de *B.capapretum* foram genotipados com base em oito locos microssatélites, selecionados de acordo com sua eficiência de amplificação e conteúdo de polimorfismo. Agrupamentos significantes para as localidades do rio Purus e Rio Madeira foram evidenciados pela AMOVA dos dados mitocondriais, onde 12,03% da variação genética estavam contidas nesses tributários, quando comparados às demais localidades. Outros agrupamentos também foram revelados através dos oitos locos microssatélites, onde o Rio Branco apresentou valores significativos de F_{ST} e baixos números de migrantes. Contudo, as análises Bayesianas para estrutura populacional em ambos os marcadores não descartam a hipótese de panmixia nas populações de *B.capapretum*, sendo observadas fortes tendências ao fluxo gênico entre as localidades. Os resultados obtidos foram contextualizados nas principais mudanças geológicas ocorridas na bacia Amazônica e enfocando medidas conservacionistas para *B.capapretum*.

Palavras-chave: *Brachyplatystoma capapretum*, gênero *Brachyplatystoma*, Siluriformes, genética da conservação, piraíba capa preta.

Abstract

The widespread marketing of large Amazonian migratory catfish began in the mid 70's with increased tax incentives for opening new fishing ports and landing sites. The black piraíba (*Brachyplatystoma capapretum*) consists one of the Amazonian catfish species widely marketed, sharing its catch with piraíba (*Brachyplatystoma filamentosum*) due to lack on identification of morphological characters. This thesis is divided into two chapters in the form of scientific article. In Chapter I we developed 24 microsatellite loci by genomic libraries enriched and tested for cross-amplification in other species of the *Brachyplatystoma* genus. Only three loci were monomorphic in amplifications based on 26-38 screened individuals of *B.capapretum*. The number of alleles per locus ranged from 1 to 12 and values in the observed and expected heterozygosity ranged from 0.02 to 0.93 and 0.08 to 0.81 respectively. Three loci showed deviation from HWE and was suggested the presence of null alleles in other six microsatellite loci. In cross-amplification monomorphic species-specific loci (BC04 and BC06) showed levels of polymorphism in other species. These developed loci can serve as a tool for further genetic studies of populations in other species of the *Brachyplatystoma* genus. In chapter II 194 individuals of *Brachyplatystoma* were discriminated genetically belonging to five species of commercial catfish (*B.filamentosum*, *B.capapretum*, *B.rousseauuxii*, *B.vaillantii* and *B.platynemum*). The analysis of population structure was inferred from mitochondrial markers (control region) based on 186 specimens of *B.capapretum* from nine Amazonian localities. We sequenced 914 bp of the mtDNA control region and 75 haplotypes and 58 private haplotypes was observed. The average haplotype diversity (**HD**) was 0.939 and nucleotide diversity (π) of 0.0034. Subsequently, 164 individuals of *B.capapretum* were genotyped based on eight microsatellite loci, selected according to their amplification efficiency and polymorphism content. Significant clusters for the localities of Purus and Madeira River were detected by AMOVA on mitochondrial data, where 12.03% of the genetic variation was contained in these tributaries when compared to other locations. Other clusters were also revealed through the eight microsatellite loci, where the Branco River showed significant F_{ST} and low numbers of migrants. However, Bayesian analyzes for population structure in both markers do not discard the hypothesis of panmixia in *B.capapretum* populations being observed strong tendencies to gene flow between locations. These results were contextualized under major geological changes occurring in the Amazon basin and focused conservation measures for *B.capapretum* populations.

Keywords: *Brachyplatystoma capapretum*, *Brachyplatystoma* genus, Siluriforms, conservation genetics, black piraíba.

Lista de Tabelas

Introdução Geral

Tabela 1 - Tabela comparativa de preço de venda do pescador de São Paulo de Olivença, diretamente para Letícia, Colômbia e para frigoríficos locais.	3
---	---

Capítulo I

Tabela I. Caracterização de vinte quatro locos microssatélites de <i>Brachyplatystoma capapretum</i> da Amazônia brasileira	26
Tabela II. Amplificação heteróloga de vinte e quatro locos microssatélites para <i>Brachyplatystoma capapretum</i> nas espécies correlatas do gênero <i>Brachyplatystoma</i> (n= 4).	28

Capítulo II

Tabela I – Pontos de coleta de amostras de tecido de <i>Brachyplatystoma capapretum</i> segundo zonas amostradas, coordenadas geográficas e número de amostras.	36
Tabela II - Locos microsateclites selecionados para análise da estrutura populacional de <i>Brachyplatystoma capapretum</i>	40
Tabela III – Índices de diversidade molecular para região controle de <i>Brachyplatystoma capapretum</i> em nove pontos de coleta da Amazônia Brasileira (n=186).	45
Tabela IV – Análise da variância molecular de <i>B.capapretum</i> em nove localidades da Amazônia Brasileira.	46
Tabela V – Análise da variância molecular de <i>Brachyplatystoma capapretum</i> para agrupamentos das localidades da calha (BE,SA,MA,TE,TA) e tributários amazônicos (MD,PU,JÁ,BR).	47
Tabela VI – Análise da variância molecular de <i>B.capapretum</i> para agrupamentos das localidades do Rio Madeira e demais localidades.	48
Tabela VII – Valores Φ_{st} par a par (valores inferiores) e número de migrantes (valores superiores) para populações de <i>Brachyplatystoma capapretum</i> provenientes de nove localidades da Amazônia Brasileira.	49
Tabela VIII – Valores de diversidade genética para os locos microsateclites utilizados na inferência da variabilidade de <i>Brachyplatystoma capapretum</i> . Com número de alelos (A), Heterozigosidade observada (H_O), Heterozigosidade esperada (H_E), Conteúdo de Polimorfismo Informativo (PIC) e Coeficiente de endogamia (F_{IS}).	53

Tabela IX – Frequência de alelos exclusivos (em parênteses) de locos microsateélites observados em <i>Brachyplatystoma capapretum</i> , oriundos de nove localidades da Bacia Amazônica Brasileira.	55
Tabela X - Índices de diversidade genética de <i>Brachyplatystoma capapretum</i> para nove localidades da Amazônia Brasileira segundo; número amostral (N), número de alelos (A), Riqueza alélica (A_R), heterozigosidade observada (H_O), heterozigosidade esperada (H_E), índice de endogamia (F_{IS}), teste do equilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE) e frequência dos alelos nulos (R).	56
Tabela XI – Análise Global da Variância Molecular de <i>B.capapretum</i> para agrupamentos das localidades Amazônicas.	59
Tabela XII – Análise da Variância Molecular de <i>B.capapretum</i> para agrupamentos entre a localidade do Rio Branco e os demais sítios amostrados (<i>Amazônia</i>).	60
Tabela XIII – Valores Φ_{st} par a par (valores inferiores) e número de migrantes (valores superiores) para populações de <i>Brachyplatystoma capapretum</i> provenientes de nove localidades da Amazônia Brasileira.	62
Tabela XIV – Lista de peixes mundialmente comercializados segundo grau de significância e parâmetros de diversidade genética da região controle do DNAm. N- número amostral, H- número de haplótipos, HD- diversidade haplotípica, HU- haplótipos únicos, S- sítios polimórficos e PI (π)- diversidade nucleotídica.	78
Tabela XV – Lista de peixes mundialmente comercializados segundo grau de significância e parâmetros de diversidade genética em locos microsateélites. N- número amostral, A_R -riqueza alélica, H_O - Heterozigosidade observada, H_E - Heteroziosidade esperada.	79

Lista de Figuras

Introdução Geral

Figura 1- filhote capa preta (<i>Brachyplatystoma capapretum</i>) (Fonte: Lira-Cordeiro, 2011).	4
Figura 2- Produção pesqueira da piraíba na região fronteira de Letícia (Colômbia) e Tabatinga (Brasil) entre os anos de 1977 a 2001 (Petrere Jr <i>et al</i> , 2004).	6
Figura 3- Produção pesqueira das três principais espécies de peixe liso no Brasil, entre os anos de 2000 e 2010. (MMA, 2000; Id., 2001; Id., 2002; Id., 2003; Id., 2004; Id., 2005; Id., 2006; Id., 2007; MPA, 2008; MPA, 2010)	6
Figura 4- Classes de marcadores moleculares desenvolvidas durante a década de 1960 a 2003. Fonte: Schlotterer, 2004.	8
Figura 5 – Representação do DNA mitocondrial de vertebrados com 36 regiões constituintes. Detalhe da Região controladora em vermelho (Pereira, 2000).	11

Capítulo II

Figura 1 – Localidades Amazônicas amostradas para análise populacional de <i>B.capapretum</i> particionada em regiões (pontos coloridos). 1- Belém, 2- Santarém, 3- Manaus, 4- Tefé, 5 – Tabatinga, 6- Boa Vista (Rio Branco), 7- Maraã (Rio Japurá), 8- Manicoré (Rio Madeira), 9- Porto Velho (Rio Madeira), 10- Lábrea (Rio Purus), 11- Boca do Acre (Rio Purus).	36
Figura 2 - Filograma confeccionado por agrupamento de vizinhos (NJ) para identificação molecular <i>a posteriori</i> de 162 indivíduos de <i>Brachyplatystoma.sp</i> baseados em 350 pb da região controle do DNA mitocondrial. Vermelho – <i>Brachyplatystoma filamentosum</i> , Azul- <i>Brachyplatystoma capapretum</i> , Amarelo- <i>Brachyplatystoma vaillantii</i> , Roxo- <i>Brachyplatystoma platynemum</i> , Marrom- <i>Brachyplatystoma rousseauxii</i>	43
Figura 3 – Distância genética <i>versus</i> substituições nucleotídicas evidenciando baixa saturação entre os sítios da região controle de <i>Brachyplatystoma capapretum</i>	44
Figura 4 – Rede de haplótipos de <i>Brachyplatystoma capapretum</i> , com base em 186 sequências nucleotídica da região controle do DNAm.	50
Figura 5 Estrutura populacional de <i>Brachyplatystoma capapretum</i> : gráfico de barras gerado pelo programa BAPS 5.3 onde três <i>clusters</i> são definidos (verde, vermelho e azul) e distribuídos em todos os sítios de coleta.	50

Figura 6 – <i>Mismatch Distribution</i> para populações de <i>Brachyplatystoma capapretum</i> : Amazônia (todas as localidades), Madeira e Purus.	52
Figura 7 – Análise Bayesiana para estimativa de número de populações de <i>Brachyplatystoma capapretum</i> : gráfico de barras gerado pelo programa STRUCTURE.	63
Figura 8 – Probabilidade estatística (ΔK) determinante para número de populações existente (K) com base no programa HAVESTER STRUCTURE.....	63

Sumário

1.0-Introdução Geral	1
1.1-Importância comercial da pesca de bagres amazônicos (Siluriformes: Pimelodidae)	1
1.2-Aspectos biológicos e importância comercial da piraíba negra (<i>Brachyplatystoma capapretum</i>).	4
1.3-Marcadores Moleculares	7
1.4-Estrutura e taxas mutacionais do DNA mitocondrial (DNAMt)	9
1.5-Estrutura e taxas mutacionais da Região Controle do DNA mitocondrial	10
1.6-O uso do DNAMt em espécies de peixes amazônicos	11
1.7-O uso do DNAMt em Siluriformes	12
1.8-Marcadores moleculares microssatélites	14
1.9-Modelos Mutacionais para Microssatélites	16
1.10-O uso do DNA microssatélite em espécies de peixes amazônicos	18
2.0-Objetivos Gerais	20
2.1-Objetivos Específicos	20
Capítulo I – Locos microssatélites para o bagre amazônico de valor comercial <i>Brachyplatystoma capapretum</i> (Siluriformes: Pimelodidae): Isolamento, caracterização e amplificação heteróloga no gênero <i>Brachyplatystoma</i>	21
Capítulo II – Estrutura populacional do bagre <i>Brachyplatystoma capapretum</i> (Siluriformes: Pimelodidae) na Amazônia Brasileira: Variabilidade genética revelada pelo uso do DNAMt (região controle) e locos microssatélites.	29
Conclusões gerais	80
Referências Bibliográficas	81
Apêndice A.....	105

1.0-Introdução Geral

A diversidade da ictiofauna na região neotropical pode extrapolar 8.000 espécies (Vari e Malabarba, 1998). Os peixes representam o grupo de vertebrados mais diversificados e o grupo taxonômico mais bem estudado na bacia Amazônica, contudo pouco conhecimento sobre aspectos ecológicos foram estabelecidos (Barletta *et al*, 2010). Estipula-se que a bacia amazônica pode comportar mais de 1.800 espécies (Roberts, 1972; Bohlke *et al*,1978). A composição da ictiofauna amazônica é representada majoritariamente pela superordem Ostariophysi (85%), em que 43% são representadas pela Ordem Caraciformes, 39% pela ordem dos Siluriformes e 3% Gymnotiformes (Lowe-McConnel, 1987). A maioria das espécies de maior valor comercial capturadas, e que se agregam nos canais principais do rio Amazonas, são os Siluriformes migradores da família Pimelodidae (Barthem e Goulding, 2007). Essa família possui 31 gêneros de bagres e 90 espécies. Os bagres desta família caracterizam-se por apresentarem corpo sem escamas, barbilhões tácteis, compondo parte do sistema sensorial do organismo, e aberturas branquiais amplas (Nelson, 2006).

1.1-Importância comercial da pesca de bagres amazônicos (Siluriformes: Pimelodidae)

A pesca de muitas espécies de bagres amazônicos representa um rentável recurso para o comércio amazônico local. Muitos portos de desembarque pesqueiro se estabeleceram em diversas cidades no Eixo Solimões-Amazonas, geralmente ligados à atividade de frigoríficos (Barthem e Goulding, 1997). A pesca comercial em larga escala para consumo de bagres é oriunda dos anos 70, consequência do aumento de incentivos fiscais na captura desses peixes (Fabr e e Barthem, 2005). Boa parte da captura desses peixes   realizada entre pa ses

Amazônicos (Brasil, Peru, Bolívia, Venezuela e Colômbia), contudo uma grande parcela da pesca é observada no Estuário Amazônico, no estado do Pará, onde se situa uma relevante porção dos maiores centros de comércio de pescado (Barros e Ribeiro, 2005). Em Manaus foram identificados 22 espécies de bagres de alto valor comercial, pertencentes a 16 gêneros (Santos *et al*, 2006).

A excessiva exploração desses recursos fez com que espécies migradoras, como a piramutaba (*Brachyplatystoma vaillantii*) e o surubim (*Pseudoplatystoma fasciatum*) tivessem seus cardumes expressivamente reduzidos, em decorrência da sobrepesca de crescimento. Os primeiros indícios da sobreexploração são as quedas drásticas de indivíduos capturados e um aumento do número de juvenis capturados (Ruffino, 2001; Barthem e Fabré, 2003). Cerca de 87% da captura comercial amazônica é representada por espécies migradoras (Barthem e Goulding, 2007). Segundo Parente *et al* (2005), grande parte desses peixes capturados e comercializados por frigoríficos é destinada à exportação. Em 2002 aproximadamente US\$ 10 milhões foram arrecadados de forma direta do produto de exportação desses bagres oriundos do Estado do Pará. Entretanto, entre 2002 e 2003 a renda bruta de bagres capturados na Amazônia foi de R\$ 121,9 milhões.

No rio Madeira, maior afluente do rio Amazonas (3.352 km), o consumo de Siluriformes representa cerca de 17% da pesca local. A dourada (*Brachyplatystoma rousseauxii*) e o filhote (*Brachyplatystoma filamentosum*) são os bagres com maior valor de renda agregado, se comparados aos caracídeos amazônicos, com valores de R\$ 4.00 e R\$ 9.00 por quilograma respectivamente (Doria *et al*, 2012). Esses valores comerciais flutuam de acordo com o transporte adotado na captura desses peixes. Em embarcações com necessidades

de câmaras frigoríficas, os valores arrecadados pelos pescadores podem ser repassados com até 100% de lucro em cima do pescado (Tabela 1) (Moraes *et al*, 2010).

Tabela 1 - Tabela comparativa de preço de venda do pescador de São Paulo de Olivença, diretamente para Letícia, Colômbia e para frigoríficos locais.

Tabela de Preço do Peixe Liso			
Nome popular	Espécie	Preço de compra (Letícia)	Preço de compra (frigoríficos locais)
Dourada	<i>Brachyplatystoma rousseauxii</i>	R\$ 7,00	R\$ 4,90
Surubim	<i>Pseudoplatystoma fasciatum</i>	R\$ 6,00	R\$ 2,90
Filhote	Acima de 20 kg	R\$ 7,00	R\$ 4,90
	Abaixo de 20 kg	R\$ 5,50	R\$ 3,00
Pacamum/ Jaú	<i>Zungaro jahu</i>	R\$ 4,00	R\$ 2,50
Pirarara	<i>Phractocephalus hemioliopus</i>	R\$ 2,00	R\$ 1,90
Piramutaba	<i>Brachyplatystoma vaillantii</i>	R\$ 1,50	R\$ 1,00
Bocão (mandubé)	<i>Ageneiosus brevifilis</i>	R\$ 1,50	R\$ 0,80

Adaptado de Moraes *et al*, 2010

Não há regulamentação específica no Brasil para a captura de bagres amazônicos, com exceção para a piramutaba (*Brachyplatystoma vaillantii*) em áreas estuarinas, com a implementação do sistema de “defeso” (período de proibição do comércio de espécies vulneráveis pela pesca em época de reprodução). Países amazônicos como a Colômbia e o Peru determinam apenas os tamanhos mínimos de captura para maioria das espécies de valor comercial e legislações específicas para proteção de alevinos para fins ornamentais (Vieira, 2005). Grande parte desses bagres, especificamente os que compõem o gênero *Brachyplatystoma*, é citada nos livros vermelhos de espécies ameaçadas entre países amazônicos (Mojica, 2012; Aguirre, 2009; Rodriguez e Rojas-Suárez, 2008, Machado *et al*,

2008). Assim como a exploração desses recursos pesqueiros por frotas superdimensionadas representam expressiva depleção dos cardumes migradores, fatores como a diminuição das coberturas vegetais de áreas de várzea são sentidos de forma tão negativa quanto à própria pesca em si, afetando a cadeia trófica como um todo (Angelini *et al*, 2006).

1.2-Aspectos biológicos e importância comercial da piraíba negra (*Brachyplatystoma capapretum*).

Dentre os bagres de importância comercial, destaca-se a piraíba negra (*Brachyplatystoma capapretum*) ou “filhote capa preta” (Figura 1). Esta espécie de Pimelodídeo foi diferenciada de outra espécie de bagre amazônico, a piraíba ou “filhote” (*Brachyplatystoma filamentosum*) (indivíduos menores que 60 cm), com base em características morfológicas e osteológicas das duas espécies (Lundberg e Akama, 2005). A piraíba negra apresenta dentição finamente granulada, presença nos juvenis de manchas acima da linha lateral mais larga que os olhos, dorso abruptamente escurecido e nadadeira caudal larga e furcada.

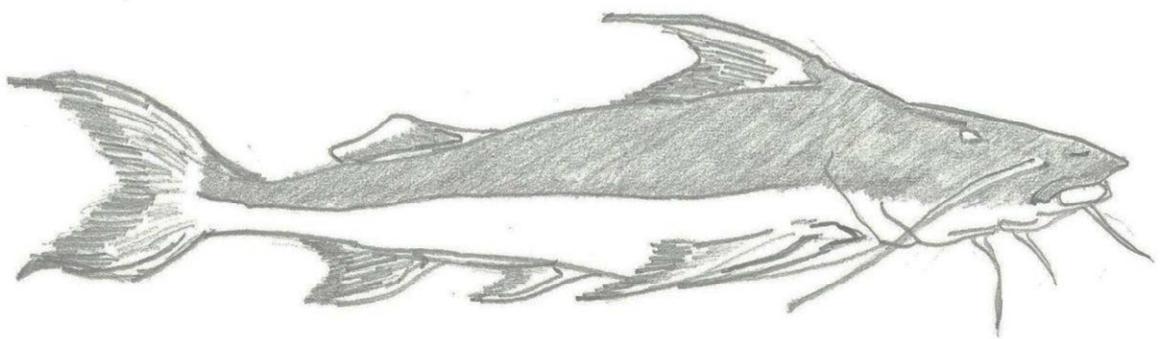


Figura 1- filhote capa preta (*Brachyplatystoma capapretum*) (Fonte: Lira-Cordeiro, 2011).

Os padrões de migração do “filhote capa preta” (*B. capapretum*) ainda são desconhecidos. Possivelmente migram menores distâncias seguindo os cardumes de piramutaba (*B. vaillantii*), uma das espécies de sua dieta alimentar. Seu ciclo de vida ocorreria, portanto não apenas para fins reprodutivos, mas para fins tróficos (Barthem e Goulding, 2007). Essas espécies usam áreas alagadas para desova, ao fim do período de inundação, e o canal principal dos rios amazônicos para alimentação. O “filhote” (*B. filamentosum*) possui hábitos noturnos e forrageia perto ao fundo (Petreire Jr *et al*, 2004). Sua ampla distribuição abrange principalmente canais de rios de água branca sendo também comumente encontrada nas bacias Amazônica, bacia do Tocantins-Araguaia e bacia do Orinoco (Mojica, 2012). Contudo, a maioria dos dados de captura de pesca provavelmente inclui as duas espécies, dada a difícil diferenciação morfológica entre as duas espécies (Santos *et al*, 2006). Outros fatores que implicam na difícil identificação dessa espécie é o fato de muitos exemplares de bagres capturados chegarem descabeçados nos portos de desembarque pesqueiros. Neste contexto é utilizado o nome de “filhote” ou “piraíba” para ambas as espécies.

Estima-se que 50 a 100% da captura de “filhote” são feita nas regiões entre Brasil, Bolívia, Colômbia e Peru. Petreire Jr *et al* (2004) em levantamento de dados de desembarque pesqueiro na Amazônia indicam a sobrepesca por recrutamento do filhote com base nos dados de produção anual da cidade colombiana de Letícia (Colômbia), cidade fronteiriça com Tabatinga, onde a captura desse bagre declinou de 4000 toneladas em 1983 para valores insignificantes até 2001 (Figura 2). Outra hipótese que explicaria o súbito declínio dos estoques do filhote na região oeste da Amazônia pode estar associada à diminuição de suas presas principais (Fabr e e Barthem, 2003). Contudo, em função da difícil diferenciação fenotípica das duas “piraibas”, não se sabe afinal se uma delas ou se as duas espécies encontram-se em sobrepesca na região do alto Solimões. Os levantamentos pesqueiros

mostrando o panorama da produção nacional, produzidos pelo Ministério da Pesca e Aquicultura (MPA) e Ministério de Meio Ambiente (MMA), revelam o cenário da captura de “filhote” nos últimos 10 anos no país (Figura 3).

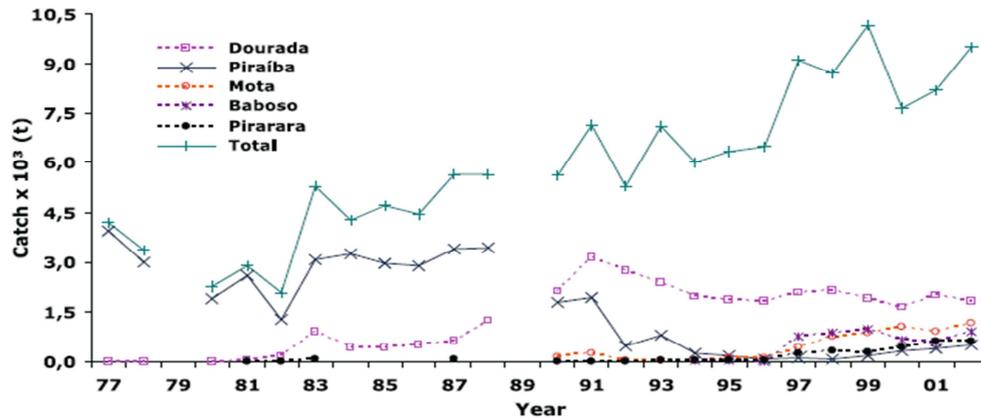


Figura 2- Produção pesqueira da piraíba na região fronteiriça de Letícia (Colômbia) e Tabatinga (Brasil) entre os anos de 1977 a 2001 (Petrere Jr *et al*, 2004).

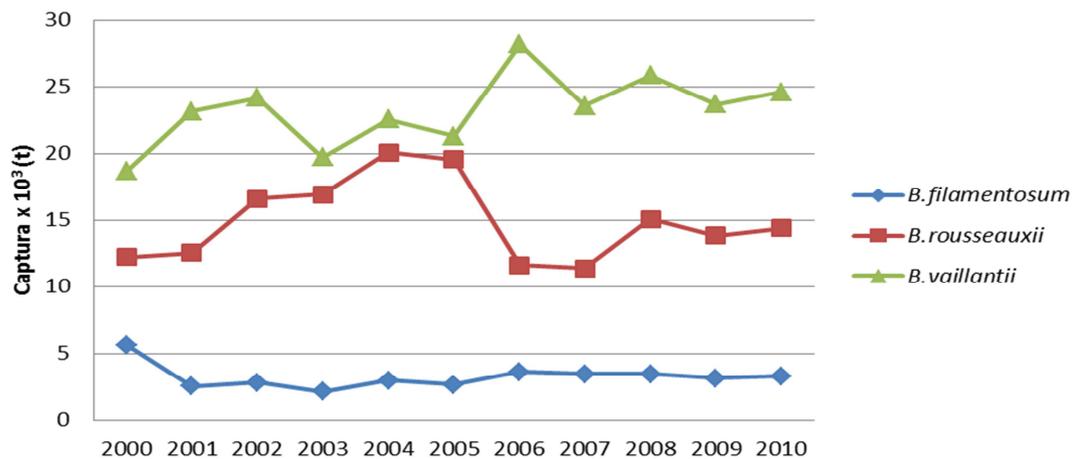


Figura 3- Produção pesqueira das três principais espécies de peixe liso no Brasil, entre os anos de 2000 e 2010. (MMA, 2000; Id., 2001; Id., 2002; Id., 2003; Id., 2004; Id., 2005; Id., 2006; Id., 2007; MPA, 2008; MPA, 2010)

1.3-Marcadores Moleculares

Com os avanços nas técnicas de análises moleculares, o uso de novas abordagens no estudo dos organismos torna-se mais acessível. As aplicações de marcadores moleculares são mais vantajosas perante o uso de marcadores morfológicos, devido ao alto nível de polimorfismo, terem relativa neutralidade aos efeitos fenotípicos e por serem acessados em qualquer nível de desenvolvimento do organismo (Ferreira e Grattapaglia, 1998). São caracterizados por possuírem caracteres hereditários com múltiplos estados, detectáveis através das técnicas de biologia molecular (Liu e Cordes, 2004; Sunnucks, 2000).

Os marcadores moleculares baseados no polimorfismo do DNA destacam-se entre os demais, por promoverem o acesso às diversas mutações contidas em diferentes regiões analisadas do genoma (Figura 4). Sua popularização iniciou-se em meados da década de 80, sendo extremamente difundidos desde o desenvolvimento da técnica de PCR (*Polimerase Chain Reaction*) (Schlotterer, 2004; Maheswaran, 2004). A resolução obtida através de várias gerações de marcadores moleculares auxilia tanto para a elucidação de questões evolutivas, quanto na identificação de populações próximas geograficamente, relações filogenéticas, especiação, incertezas taxonômicas, detecção de hibridização, auxílio nos programas de melhoramento e identificação de unidades de conservação (Marques, 2002; Liu e Cordes, 2004).

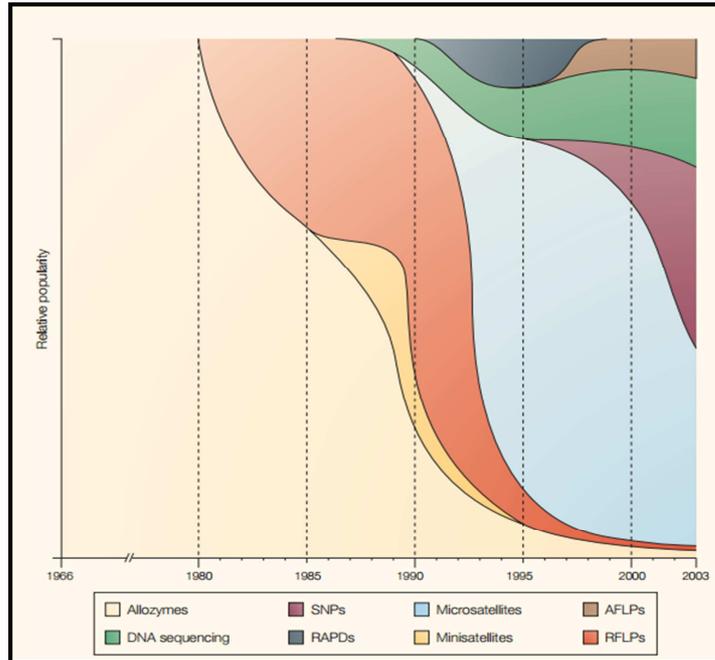


Figura 4- Classes de marcadores moleculares desenvolvidas durante a década de 1960 a 2003. Fonte: Schlotterer, 2004.

Em genética da conservação, populações isoladas podem apresentar reduzida variação genética, ocorrendo estruturação populacional mesmo em espécies migradoras de longa distância (Piorski, 2008). As inferências na variação genética, inerente às populações naturais, podem ser realizadas por marcadores *unilocus* ou *multilocus* (Sunnucks, 2000). O potencial informativo e viabilidade dos marcadores a serem empregados depende das perguntas biológicas a serem respondidas e comumente são inferidos pelo - PIC (*Polymorphism Information Content*) (Botstein *et al*, 1980; Liu e Cordes, 2004). Normalmente marcadores unilocos, como os baseados no DNA repetitivo e o DNA mitocondrial, são amplamente empregados em estudos populacionais e filogeográficos de espécies ameaçadas (Frankham, 2008).

1.4-Estrutura e taxas mutacionais do DNA mitocondrial (DNAMt)

Dentre os marcadores moleculares existentes, a utilização do DNA mitocondrial é largamente empregada em análises de relações filogenéticas, genética populacional e para acesso a variabilidade genética dos organismos. Sendo uma única molécula e altamente helicoidizada, o genoma mitocondrial possui ausência de recombinação, herança quase exclusivamente materna, taxas evolutivas elevadas, se comparadas ao genoma nuclear (5 a 10 vezes mais variável), e por conter muitas cópias por célula (Avise 1986; Brown *et al*, 1979). Seu tamanho em vertebrados varia entre 16 à 18 kb de tamanho e pode ser isolado como moléculas circulares fechadas (Gray, 1989; Shadel e Clayton, 1991, Boore, 1999). A estrutura do DNA mitocondrial de vertebrados consiste em: uma região controle de replicação não expressa (região controle), 13 genes codificadores de proteínas, dois RNA ribossomais e 22 RNA transportadores (RNAt) (Figura 5) (Avise 1986; Meyer, 1993; Pereira, 2000).

As taxas mutacionais em diversas regiões desse pequeno genoma permitem diversas aplicabilidades para os variados genes ali contidos. Por exemplo, o gene Citocromo *b* (Cyt-*b*) é largamente usado para inferência de análises filogenéticas em táxons acima do nível de espécies (Esposti *et al*, 1993; Zardoya e Meyer, 1996; Johns e Avise, 1998; Castresana, 2001), assim como o gene Citocromo *c* Oxidase Subunidade I (COI) é utilizado como identificador universal de espécies (Hebert *et al*, 2003; Moritz e Cicero, 2004, Bhargava e Sharma, 2013). No entanto, os sinais filogenéticos tendem a ser reduzidos devido a altas taxas de saturação observadas nesses trechos de nucleotídeos. Sítios que sofreram mutações há muito tempo tendem a acumular novas mutações que revertem seu estado ancestral (Meyer, 1993; Johnson e Clayton, 2000). Outro cenário problemático no uso do DNAMt pode ser

evidenciado pelas mutações paralelas nos mesmos sítios entre linhagens completamente distintas, os “*hot spots*” mutacionais, em que sítios de uma mesma região do DNAm apresentam velocidades de mutações diferentes (Matioli, 2004; Liu e Cordes, 2004) e heteroplasmias (Brown *et al*, 1992).

1.5-Estrutura e taxas mutacionais da Região Controle do DNA mitocondrial

A região controle é frequentemente usada em estudos populacionais devido aos altos níveis de substituições nas sequências nucleotídicas. Suas taxas mutacionais variam de 4 a 5 vezes mais altas que qualquer outra região do genoma mitocondrial (Upholt e Dawid, 1977; Tarbelet, 1996). Dentre as demais regiões do DNAm, esta não expressa um produto funcional, sendo suas elevadas taxas mutacionais decorrentes da baixa pressão seletiva. Sua função está associada ao início da replicação e transcrição do genoma mitocondrial (Saccone *et al*, 1999). A variação no tamanho observada nos genomas mitocondriais é decorrente das mutações acumuladas nesta região, que está localizada entre o RNAt da prolina e o RNAt da fenilalanina (Taberlet, 1996). No grupo de peixes, essa região apresenta aproximadamente 1.100 pares de bases (pb) e é composta por 3 sítios: um domínio central conservado (CCD), um bloco de sequências conservadas (CSD), contendo as origens de replicação da fita pesada e promotores de transcrição do genoma, e extremidades 5'-3' variáveis ricas em Adenina e Timina (ETAS). A maioria desses elementos regulatórios da replicação do DNAm encontra-se em uma grande região denominada alça-D (*D-loop region*), contida na região controle, que forma esta estrutura na fita H parental (Meyer, 1993; Sbisá *et al*, 1997).

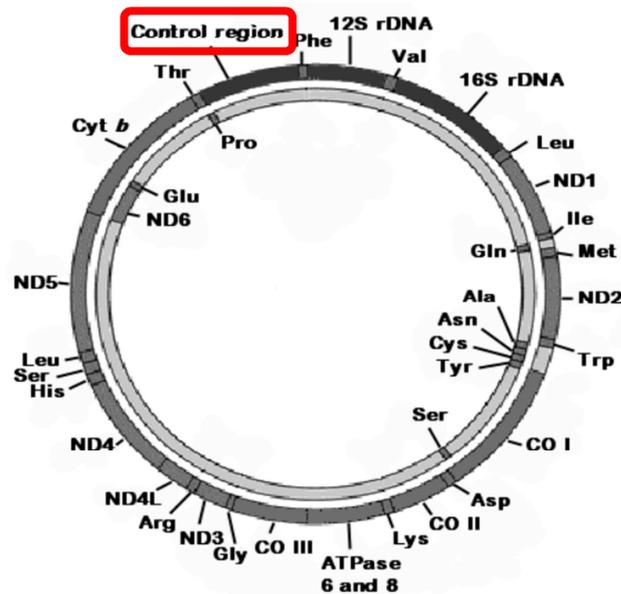


Figura 5 – Representação do DNA mitocondrial de vertebrados com 36 regiões constituintes. Detalhe da Região controladora em vermelho (Pereira, 2000).

1.6-O uso do DNAm_t em espécies de peixes amazônicos

Os trabalhos disponíveis com o uso do DNA mitocondrial, incluindo a região controle, em espécies amazônicas de peixes de importância econômica visam à estimativa da variabilidade genética ao longo da distribuição geográfica da espécie, no intuito de verificar a existência de algum nível de estrutura populacional ou inferir relações filogenéticas. Farias *et al* (1999; 2000 e 2001) compilou dados morfológicos com moleculares para maior resolução em peixes da família *Ciclidae* com uso de DNA nuclear e DNA mitocondrial. Sivasundar *et al* (2001) caracterizaram geneticamente populações de curimatã (*Prochilodus lineatus*) nas bacias do Paraná, Orinoco, Amazonas e Magdalena não observando correlações entre estrutura genética e geográfica. Hrbek *et al* (2005, 2007) e Hrbek e Farias (2008) propõem estratégias de conservação para o pirarucu (*Arapaima gigas*) com base na estrutura populacional contínua e com grande fluxo gênico entre as localidades amostradas, revelada

pelo estudo de regiões do DNA mitocondrial (NADH1, ATPase 6/8, 16S rRNA, COII, tRNA de Lisina e tRNA de Leucina) e locos microssatélites.

Outras espécies de peixes amazônicos também são foco de estudos populacionais e identificação molecular pelo uso do DNA mitocondrial, como para o peixe ornamental *Carnegiella strigata* (Schneider *et al.*, 2012), o peixe-lápis - (*Nannostomus eques*) (Terencio *et al.*, 2012), a pescada branca - (*Plagioscion squamosissimus*) (Galletti, 2009), o sarapó - *Hypopygus lepturus* (Schmitt, 2005), o tambaqui - *Colossoma macropomum* (Santos *et al.*, 2007; Farias *et al.*, 2010), o acará disco - *Symphysodon spp.* (Farias e Hrbek, 2008), o curimatã *Prochilodus nigricans* (Machado, 2009) o jaraqui-escama-grossa - *Semaprochilodus insignis* (Batalha, 2009), o gênero *Microsternarchus* (Maia, 2011) e o gênero *Hyphessobrycon* – (Castro Paz, 2012).

1.7-O uso do DNAm em Siluriformes

Para estudos de diversidade em Siluriformes (peixes lisos) amazônicos usando sequências do DNA mitocondrial, Coronel (2004) por meio de marcadores isoenzimáticos e marcadores mitocondriais (ND5/6, Citocromo *b* e região controle) estimaram a variabilidade genética da dourada (*Brachyplatystoma rousseauxii*) e do surubim (*Pseudoplatystoma fasciatum*) provenientes dos rios bolivianos *Ichilo* e *Beni*, sugerindo uma redução populacional para o surubim. Formiga-Aquino (2004) analisou sequências da região controle do DNA mitocondrial de piramutaba (*Brachyplatystoma vaillantii*) coletada nos desembarques pesqueiros de Manaus, Belém, Santarém, Tefé e Tabatinga, não observando

uma correlação genética com a distância geografia, corroborando a hipótese desta espécie compor um único estoque pesqueiro na bacia amazônica brasileira. Batista e Alves Gomes (2006), utilizando sequências da região controle de 45 indivíduos de *B. rousseauxii* de três localidades do eixo Solimões-Amazonas (Belém, Manaus e Tabatinga), mostraram que não houve segregação genética da dourada no eixo estuário-amazonas-Solimões, sugerindo possível comportamento filopátrico para essa espécie (*homing*). A queda da diversidade na porção oeste da Amazônia (cabeceiras) encontrada seria explicada pela seleção não aleatória de alguns tributários para desova dessa espécie. Duas espécies de Jaú (*Zungaro zungaro* e *Zungaro jahu*) provenientes da bacia Amazônica e bacia Paraná-Paraguai foram geneticamente discriminadas com base na região controle do DNAm e o gene ATPas 6 (Boni, 2008). Rodrigues (2009) utilizando sequências da região controle e uso de marcadores microsatélites estimou a variabilidade genética de piramutaba (*B. vaillantii*) no sentido Norte-Sul, proveniente de quatro localidades da bacia amazônica (Vila Bittencourt/rio Japurá, Manaus, Tefé e Porto Velho/rio Madeira), sugerindo que a piramutaba é composta por um único estoque geneticamente homogêneo, corroborando dados de Formiga-Aquino (2004).

Ortiz (2010) validou a eficácia da metodologia do DNA *barcode* usando o gene mitocondrial COI em quatro espécies do gênero *Pseudoplatystoma* oriundas de 11 localidades da bacia amazônica, observando alta resolução na identificação dos exemplares. Batista (2010) utilizou a região controle e marcadores microsatélites para definir a estrutura genética da dourada (*Brachyplatystoma rousseauxii*) proveniente de 33 localidades distribuída em 15 macrorregiões da Amazônia Brasileira e Peruana, e melhor testar a hipótese de comportamento filopátrico proposto por Batista e Alves-Gomes (2006). O estudo aponta que a espécie está composta por um grande estoque panmítico de ampla distribuição e com os dados obtidos não foi confirmado a filopatria na espécie. Orrego (2012) inferiu a filogeografia

e estrutura populacional do babão (*Brachyplatystoma platynemum*) com base na Região Controle do DNAm, o gene *Cit-b* e marcadores microssatélites em sete localidades da Amazônia Brasileira, observando estrutura populacional entre os indivíduos da localidade do rio Madeira e os demais pontos de coleta.

Muitos exemplares de “filhote” (*Brachyplatysoma filamentosum* e *Brachyplatystoma capapretum*) apresentam o dorso escurecido, o que tornou necessário também à diferenciação genética das espécies. Huergo *et al* (2011) realizou o trabalho de diferenciação genética das duas espécies de filhote (*B.filamentosum* e *B.capapretum*) comercializadas como uma única espécie, com base no sequenciamento da região controle do DNA mitocondrial de 337 exemplares provenientes de 12 localidades da bacia Amazônica, assim como estipulou a frequência média de captura da espécie pela pesca comercial, verificando que 33,19% correspondentes a 670 toneladas de *B.capapretum* podem ter sido capturadas como *B.filamentosum* nos anos de 2001 e 2004.

1.8-Marcadores moleculares microssatélites

Outra versátil classe de marcadores moleculares surgida na década de 80 são os marcadores moleculares microssatélites ou *SSR* (*Simple Sequences Repeats*). Três grupos de autores descrevem essas regiões do genoma para desenvolvimento de uma nova classe hipervariável de marcador molecular; Tautz (1989), Litt e Luty (1989), Weber e May (1989). Estes marcadores se baseiam na amplificação de segmentos de DNA por PCR (*Polymerase Chain Reaction*) e compõe a classe de marcadores mais utilizada para estudos populacionais.

São caracterizados pelo alto polimorfismo em virtude da diferença do número de repetições em sua composição, tendo taxas mutacionais variando entre 10^{-2} e 10^{-6} (Ferreira e Grattapaglia, 1998; Brodani *et al* 2007, Selkoe e Toonen, 2006).

As regiões com microssatélites podem ser caracterizadas por seus motivos de repetições (Mono, Di, Tetra, Penta ou Hexanucleotídico) e pela composição nucleotídica (Perfeito, Imperfeito, Composto e Interrompido). Além de serem hipervariáveis, os locos microssatélites são densamente distribuídos nos genomas de procariotos e eucariotos (Katti *et al*, 2001). Contudo, dentro destes genomas suas concentrações diferem entre regiões codificadoras e não codificadoras (Tóth *et al*, 2000).

Para aplicações ecológicas e populacionais, estabeleceu-se o consenso dos *SSR* serem seletivamente neutros, contudo uma variedade de trabalhos os relata dentro de regiões gênicas, envoltos em processos de metabolismo da replicação do DNA, organização da cromatina cromossômica e regulação da expressão gênica (Csink e Henikoff, 1998; Katti *et al*, 2001; Toth *et al*, 2002; Li *et al*, 2002; Li *et al*, 2004;). Microssatélites com motivos de repetição dinucleotídica são os mais comuns nos Metazoários, porém esses motivos chegam a ser cinco vezes menores em plantas do que em mamíferos (Lagercrantz *et al*, 1993). Com esses marcadores é possível obter uma alta diversidade alélica em locos *SSR*, tornando-os altamente informativos. Outra característica que os torna úteis na discriminação de populações geneticamente distintas é a sua característica codominante, em que os dois alelos de um loco *SSR* podem ser visualizados e analisados (Moxon e Wills, 1999; Maheswaran, 2004; Schlötterer, 2004).

Sua origem evolutiva está associada principalmente aos processos de mutação por escorregamento da fita de DNA durante a replicação (*Polymerase Slippage*) (Schotterrer e Tautz, 1992; Jefreys *et al*,1994; Zhu *et.al*, 2000) e *Crossing over* desigual (Levison e Gutman, 1987). Algumas vertentes de pesquisa da variabilidade desse marcador acreditam que as taxas evolutivas em que esses fenômenos ocorrem não são suficientes para criar a extensa variação existente dentro de diversos táxons. Csink e Henikoff (1998) acreditam que as regiões *SSR* que estão associadas à heterocromatina tem alta afinidade com proteínas envolvidas na divisão celular, limitando o número de repetições nos microsatélites e atribuindo a estes uma alta pressão seletiva. Arcot *et al* (1995) propõe a variação dos microsatélites existentes em primatas oriunda da inserção aleatória do transposon *Alu* em regiões repetitivas, acarretando em diferenças nas unidades de repetições após a transcrição reversa deste elemento.

1.9-Modelos Mutacionais para Microsatélites

Assumindo a neutralidade dos microsatélites, alguns modelos mutacionais foram desenvolvidos: *IAM (Infinite Allele Model)* ou Modelo de Alelos Infinitos assume que cada mutação nas regiões de repetição dos microsatélites, resulta na perda ou ganho de uma unidade de repetição, gerando um novo alelo de forma aleatória. Nesse caso, não há relação dos números de repetição à proximidade genética (Kimura e Crow, 1964). *SMM (Stepwise Mutation Model)* ou Modelo Mutacional Passo-à-passo adota que cada mutação, com ganho ou perda de uma unidade repetitiva ocorre de cada vez, havendo uma correlação entre números de repetição e proximidade genética (Kimura e Ohta, 1978). *TPM (Two Phase Model)* ou Modelo de Dois Passos assume diferentes processos mutacionais (*IAM* e *SMM*)

para explicar as diferenças nas unidades de repetição dos microssatélites, onde a adição de uma ou mais unidades de repetição pode ocorrer (Di Rienzo *et al*, 1994). O modelo ainda pouco citado na literatura, o modelo **KAM** (*K-allele model*) adota K possibilidades nos estados dos alelos e cada alelo tem a constante possibilidade de mutação em relação a outro estado alélico K-1 (Crow e Kimura, 1970). Este modelo é considerado mais realista que o *IAM* (Karhu, 2001).

Alguns vieses podem ser apontados pelo uso de microssatélites em análises populacionais, tais como: Marcadores codominantes podem apresentar indetectáveis homoplasias, decorrentes de suas altas taxas mutacionais. Alelos iguais podem apresentar histórias evolutivas diferentes. Logo, a similaridade em estado desses alelos não assegura a similaridade por descendência. A homoplasia pode reduzir o poder discriminante entre populações distintas e é esperada em todos os modelos citados acima, com a exceção do *IAM*. Geralmente, seus efeitos são solubilizados pela alta variedade nos alelos e pela utilização de muitos locos nos estudos de populações (Estoup *et al*, 2002).

A presença de alelos nulos em muitos locos microssatélites é relatada na literatura. Alelos nulos são decorrentes de mutações nas regiões que flanqueiam os microssatélites e comumente ocasionam a queda de heterozigotos observados no conjunto de amostras analisadas. Este problema implica na falsa estimativa no grau de diferenciação de populações correlatas (F_{ST}) e podem ser críticos na análise de unidades biológicas com baixos níveis de fluxo gênico (Wagner *et al*, 2006). Darkin e Avise (2004) sugerem que a inclusão dos locos em que há indícios da presença de alelos nulos não inviabiliza as análises de parentesco por

meio desde marcador, em vista que poucos locos espécie-específicos são disponíveis na literatura.

Outro viés presente no uso de microssatélites envolve artefatos de amplificação durante a PCR, como alelos “*dropouts*” e bandas/picos de “ruídos” (*stutters*), gerando dificuldades na detecção de indivíduos heterozigotos (Wattier *et al*, 1998). Esse *déficit* de heterozigose também pode ser contornado por uma maior cobertura na amostragem do banco de dados (Selkoe e Toonen, 2006).

1.10-O uso do DNA microssatélite em espécies de peixes amazônicos

Locos microssatélites já foram isolados e caracterizados para várias espécies de peixes amazônicos que repercutem interesse econômico incluindo: o pirarucu (*Arapaima gigas*) (Farias *et al*, 2003; *Molecular Ecology Resources Primer Development Consortium et al*, 2011), o peixe borboleta (*Carnegiella marthae*) (Beheregaray *et al*, 2006), a pescada amarela (*Cynoscion acoupa*) (Farias *et al*, 2006) ; o acará-disco (*Symphysodon discus*) (Amado *et al*, 2008), o aruanã (*Osteoglossum bicirrhosum*) (Silva *et al*, 2009), o tambaqui (*Colossoma macropomum*) (Santos *et al*, 2009; Hamoy *et al*, 2011; Santana *et al*, 2012), o acara-açu (*Astronotus crassipinis*) (Sousa *et al*, 2009), o tucunaré (*Cichla piquiti*) (Carvalho *et al*, 2009) e (*Cichla monoculus*) (Lima *et al*, 2010), o jaraqui (*Semaprochilodus insignis*) (Passos *et al*, 2010); a piranha (*Pygocentrus nattereri*) (Nascimento *et al*, 2012) e o matrinxã (*Brycon amazonicus*) (*Molecular Ecology Resources Primer Development Consortium et al*, 2012).

Marcadores microssatélites também já foram desenvolvidos para algumas espécies de peixes da Ordem Siluriformes: o pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*) (Revaldaves *et al*, 2005), *Pimelodella chagresi* (Moeser e Bermingham, 2005), o bagre do Mekong (*Pangasianodon gigas*) (Ngamsiri *et al*, 2006), o Jau (*Zungaro jahu*) (Carrillo-Avila *et al*, 2009), a piramutaba (*Brachyplatystoma vaillantii*) (Rodrigues *et al*, 2009), a dourada (*Brachyplatystoma rousseauxii*) (Batista, 2010) e o surubim (Saulo-Machado *et al*, 2010).

Para a pesca da piraíba negra na Amazônia, definir um plano de manejo agrega uma complexidade maior, não só pela espécie compartilhar a captura com a piraíba (*B. filamentosum*), mas também por ser um recurso compartilhado com outros países amazônicos. Outros fatores que implicam na difícil identificação dessa espécie é o fato de muitos exemplares de bagres capturados chegarem sem cabeça nos portos de desembarque pesqueiros. O estudo do DNA mitocondrial e de marcadores microssatélites pode auxiliar na elucidação da estrutura populacional das populações de piraíba negra. Assim como Huergo (2009) analisou *B. filamentosum*, utilizando a região controle do DNA mitocondrial, o presente trabalho propõe-se a estimar a variabilidade da piraíba negra (*B. capapretum*) pelo uso de sequências da região controle do DNA mitocondrial e marcadores moleculares microssatélites desenvolvidos neste trabalho, formulando as seguintes hipóteses:

H₀: *Brachyplatystoma capapretum* está composta por uma única população panmítica formando um único estoque panmítico;

H₁: *Brachyplatystoma capapretum* apresenta estrutura populacional, podendo compor mais de que um estoque geneticamente diferenciado.

2.0-Objetivos Gerais

Estimar a variabilidade genética da piraíba negra (*Brachyplatystoma capapretum*) na Amazônia Brasileira a fim de verificar se a espécie compõe um único estoque geneticamente homogêneos e de ampla distribuição, por meio de marcadores nucleares (microsatélites) e mitocondriais (região controle).

2.1-Objetivos Específicos

- ✓ Isolar e caracterizar marcadores microsatélites para piraíba negra ou filhote capa preta;
- ✓ Verificar o alcance da amplificação heteróloga dos marcadores microsatélites isolados em seis espécies do gênero *Brachyplatystoma*;
- ✓ Estimar a variabilidade da piraíba negra amostrada em nove localidades utilizando seqüências da região controle do DNA mitocondrial e os marcadores microsatélites desenvolvidos;
- ✓ Verificar se existe alguma segregação na diversidade molecular de *B. capapretum* que possa indicar a existência de estoques pesqueiros distintos relacionados ou não à distribuição geográfica;
- ✓ Comparar a diversidade observada em *B. capapretum* com os demais bagres Pimelodídeos (*B.filamentosum*, *B.rousseauxii* e *B.vaillantii*).

CAPÍTULO I

Locos microssatélites para o bagre amazônico de valor comercial *Brachyplatystoma capapretum* (Siluriformes: Pimelodidae): Isolamento, caracterização e amplificação heteróloga no gênero *Brachyplatystoma*.

Os resultados presentes neste capítulo foram submetidos a publicação na revista *Journal of Fish Biology*, seguindo normas de formatação da referida revista.

A. Lira-Cordeiro, K. M. Formiga, J. Alves-Gomes, A. C. B. Sousa, J. S. Batista. 2013. *Microsatellite loci for the Amazon commercial freshwater catfish Brachyplatystoma capapretum (Siluriformes: Pimelodidae): Isolation, characterization and cross-amplification in Brachyplatystoma genus*. *Journal of Fish Biology*.

Resumo

Vinte e quatro locos microssatélites foram isolados e caracterizados para *Brachyplatystoma capapretum*, um bagre amazônico de grande porte. O número de alelos por loco variou de 1 a 12, com média de 4,8. Valores na heterozigosidade observada e esperada variaram de 0,02 à 0,93, e 0,08 à 0,81, respectivamente. Estes locos microssatélites irão contribuir na caracterização de populações naturais de *B.capapretum* e estarão disponíveis para outras espécies do gênero *Brachyplatystoma*.

Palavras-Chave: Piraíba preta, bagres migradores, conservação de recursos genéticos.

O *Brachyplatystoma capapretum*, conhecida popularmente como “piraíba” é um dos bagres amazônicos de grande porte (Lundberg e Akama 2005). Esta espécie é amplamente distribuída nos rios da Amazônia, abrangendo diversas áreas, como o estuário amazônico até as cabeceiras dos rios Amazônicos (Barthem e Goulding 2007). Ao longo desta trajetória *B. capapretum* é amplamente capturado como *B. filamentosum* por populações locais, devido aos poucos caracteres de diferenciação morfológicos entre estas. A baixa variabilidade genética de *B. capapretum* foi relatada com base em 14 populações naturais oriundas de diferentes localidades amazônicas, de acordo com dados genéticos da região controle do DNAm (Huerco *et al.*, 2011). Neste estudo, foram desenvolvidos 24 locos microssatélites *B. capapretum*, que são adequados para investigar a diversidade genética e estrutura populacional desta espécie. Além disso, foi testada a amplificação heteróloga nas seis demais espécies do gênero *Brachyplatystoma*.

O DNA genômico de 13 indivíduos de *Brachyplatystoma capapretum* foi extraído seguindo o método CTAB descrito por Doyle e Doyle (1990). Os microssatélites foram desenvolvidos através de bibliotecas genômicas enriquecidas seguindo o protocolo proposto por Billotte *et al.*, (1999). O DNA total foi digerido com a enzima de restrição *RsaI* (10 u/ul) e ligado aos adaptadores *Rsa21* (10u/μl) (CTCTTCGTTACGCGTGGACTA3' 5') e *Rsa25* (10u/μl) (5' TAGTCCACGCGTAAGCAAGAGCACA3'). Fragmentos enriquecidos com sondas (CT)₈ e (GT)₈ foram amplificados pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), ligados a uma vetor de clonagem pGEM-T *Easy Vector* (Promega) e depois transformado em células competentes *Escherichia coli XLI-Blue*. Os clones positivos foram selecionados utilizando o gene da β -galactosidase e cultivadas durante a noite em meio HM/FM com ampicilina. O DNA de plasmídeo foi purificado e foram sequenciados 96 clones positivos utilizando os iniciadores de T7 e SP6, bem como o *Big Dye Terminator v3.1* kit (Life technologies) com um sequenciador de DNA *ABI 3130* automatizado (Life technologies).

Um total de 24 pares de iniciadores foram desenvolvidos utilizando o programa WEBSAT (Martins *et al*, 2009). A sequência nucleotídica da cauda M13 foi adicionado no final da extremidade 5 'de cada iniciador *forward*, a fim de permitir uma marcação fluorescente, seguindo o protocolo econômica sugerido por Schuelke (2000).

Os locos microssatélites foram caracterizados em 26-38 indivíduos de *B. capapretum* coletados em sete pontos diferentes da Amazônia brasileira: Belém-PA (N = 3), Manaus-AM (N = 6), Porto Velho-RO (N = 7), Lábrea-AM (N = 3), Santarém-PA (n = 7), Tefé-AM (N = 5) e Tabatinga-AM (N = 7). Os parâmetros e ciclos de PCR foram seguidos de acordo com Batista (2010). Os produtos de amplificação foram visualizados por eletroforese em gel de agarose a 1,5% e corado com *GelRed* (Biotium). Os produtos não amplificados foram submetidos a gradientes de temperatura durante a PCR. Os produtos foram genotipados no sequenciador *ABI 3130* (Life technologies) e o tamanho dos alelos foram determinados por meio de um marcador de bandas conhecidas *ET-550 Rox* (GE HealthCare). Os produtos de genotipagem foram analisadas no programa computacional GeneMarker vs 1.97 (Soft Genetics LLC).

As heterozigosidades observadas (H_O), esperadas (H_E) e o Conteúdo de Polimorfismo Informativo (PIC) foram estimados usando o programa computacional Arlequin v3.11 (Excoffier, 2005). O desequilíbrio de ligação (LD) foi analisado através do programa Fstat v 2.9.3.2 (Goudet, 2002). O teste do equilíbrio de Hardy–Weinberg Equilibrium (HWE) foi estimado usando o programa GenePop v4 (Raymond e Rousset, 1995) e para checagem da presença de anéis nulos foi utilizado o programa Micro-checker ver. 2.2.3 (Van Oosterhout *et al*, 2004).

Dos 24 locos microssatélites desenvolvidos para *B. capapretum*, vinte e um locos foram polimórficos e três locos monomórficos (Tabela I). O número de alelos por locos variou de 1 a 13, com média de 4,76. As heterozigosidade observadas e esperadas variaram de

0,02 a 0,93 (média de 0,39) e 0,08 a 0,81 (média de 0,37), respectivamente. Não foram observados valores estatisticamente significativos para o teste de desequilíbrio de ligação (LD). Três locos (BC06, BC09, e BC15) mostraram significativos desvios no equilíbrio de HWE após correção de Bonferroni (Rice, 1989). Os locos BC05, BC06, BC09, BC14, BC15 e BC23 foram estatisticamente significantes quanto à presença de alelos nulos em seus genótipos.

Todos os locos polimórficos e monomórficos para *B.capapretum* foram testados na amplificação heteróloga no gênero *Brachyplatystoma* (Tabela II). Vinte e dois locos tiveram amplificações positivas em pelo menos duas espécies. Nove locos (BC14, BC16, BC18, BC28, BC30, BC31, BC33, BC34 e BC36) amplificaram em todas as espécies. *B. filamentosum* amplificou um maior número de locos (22 locos) enquanto o menor número (12 locos) foi observado em *B.tigrinum*. Quanto à diversidade alélica dos locos caracterizados, foram observados um grande número de alelos em *B.juruense*, com 81 alelos isolados, seguido de *B.vaillantii*, com 73 alelos isolados. Um menor número de alelos foi observado em *B.tigrinum* (17 alelos). Inesperadamente, locos monomórficos para *B.capapretum* exibiram algum nível de variabilidade nas cinco espécies (*B. juruense*, *B. platynemum*, *B.rousseauixii*, *B. filamentosum*, *B. vaillantii*). Estes marcadores microssatélites serão importantes ferramentas para acessar a variabilidade genética e auxiliar na elaboração de planos de manejo das populações de *B.capapretum*, assim como as espécies correlatas no gênero *Brachyplatystoma*.

Tabela I. Caracterização de vinte quatro locos microssatélites de *Brachyplatystoma capapretum* da Amazônia brasileira

Locos	número acesso GenBank	Motivo de Repetição	Sequência dos primers (5'-3')	T_a/T_{ext} (°C)	N	A	Tamanho (bp)	H_o	H_E	PIC	P-HWE
BC01	JQ716414	(AG) ₁₈	F: ^{FAM} TGAGCTTCTTTTCAGCCAGGT R:CTGATCGACCTCTCACACTCC	65°/72°	35	4	137-143	0.65	0.55	0.49	0.9802
BC03	JQ716415	(TG) ₂₀	F: ^{NED} CTGGACTGAAATAAACTGTGAATG R: GGAAACATCAGAAGAACTGAGC	65°/68°	36	8	161-187	0.83	0.73	0.68	0.0734
BC04	JQ716416	(TG) ₂₀	F: ^{HEX} GGACATGGACAAGTGATGGAC R:CAGATGGAGAGTGATGAGTTGG	66°/72°	28	7	273-307	1.00	0.61	0.51	1.0000
BC05♦	JQ716417	(TG) ₇ TA (TG) ₁₃	F: ^{FAM} ATATTCCTACTCTACCCACCCC R:CATCTTGAAAGCCGCCATAAC	60°/72°	28	3	194-198	0.03	0.1	0.10	0.0183
BC06♦	JQ716418	(TG) ₁₈ (AG) ₂₀	F: ^{NED} TGTATGTGTGAGGTTAGGACCG R:GCGGGACTTACTGAAGGTTGTA	64°/68°	32	12	230-332	0.56	0.81	0.78	0.0000*
BC08	JQ716419	(GT) ₁₂	F: ^{HEX} GGATTA AACACAGCCCAGGA R:GAGGAAGAACGTGGTGAACG	60°/68°	36	4	111-123	0.25	0.27	0.24	0.4259
BC09♦	JQ716420	(TG) ₁₁	F: ^{FAM} AAAAGGGAGGTGTTCAAGCC R:AGCGAGCAGATGTTCTCTCAC	63°/68°	37	5	159-213	0.13	0.22	0.21	0.0008*
BC14♦	JQ716421	(GT) ₈	F: ^{NED} CGTGATTGTCCCCTAGTGTTT R:GCCCCACTGCTGCCTAAATAA	60°/68°	38	4	158-164	0.05	0.10	0.10	0.0171
BC15♦	JQ716422	(CT) ₉	F: ^{HEX} GTGCCTTCTGTGGGAGTGTTA R:CGTTAGCATTAGCGGTGTGTC	60°/68°	28	7	242-380	0.14	0.45	0.42	0.0000*
BC16	JQ716423	(AG) ₂₄	F: ^{FAM} CGCTTATGGAGAGCACTGAAA R:AAACAGGATGAGCTGCGGTAT	63°/72°	30	7	120-138	0.93	0.72	0.67	0.2053
BC17•	JQ716424	(GT) ₈	F: ^{NED} CGCTCAGACACACTGAAAA R:TCTGCTGGTATGGAGGAGTTG	60°/68°	26	1	260-260	-	-	-	-
BC18	JQ716425	(GT) ₂₁	F: ^{HEX} ATATGCCTTCAGCACCAGGA R:ACTGATCCACACAGGGTCAAG	60°/68°	31	7	145-163	0.54	0.61	0.57	0.1477
BC21	JQ716426	(CA) ₁₁	F: ^{FAM} CACTGACACTTTACCAGAGGCA R:GATCCAAGCCAACTACTGCAC	60°/72°	34	4	314-326	0.05	0.08	0.08	0.0423

Tabela I. Continuação

Locos	Número de acesso GenBank	Motivo de repetição	Sequência dos <i>primers</i> (5'-3')	T_a/T_{ext} (°C)	<i>N</i>	<i>A</i>	Tamanho (bp)	H_o	H_E	<i>PIC</i>	<i>P-HWE</i>
<i>BC22</i>	JQ716427	(TG) ₁₅	F: ^{NED} GGGGACGTTTTCTTCCT R:CTGTCGATCAAGTTCCTG	63°/72°	37	7	132-148	0.73	0.69	0.63	0.7588
<i>BC23</i> ♦	JQ716428	(CA) ₈	F: ^{HEX} TGCACTCCAGTCGAAACA R:CTGCCTGCACATCAGCC	60°/68°	34	3	247-261	0.02	0.08	0.08	0.0156
<i>BC26</i>	JQ716429	(CA) ₂₃	F: ^{FAM} GCTGTAGAAGCAGCAAATCA R:CTGAAATGCACCCAAGAGG	65°/68°	37	9	190-220	0.62	0.63	0.58	0.0367
<i>BC28</i>	JQ716430	(GT) ₁₁	F: ^{NED} CTGGATAGACAACCCCACCAT R:ACCTGTAGGGAGGGAGAACAG	60°/68°	38	4	137-161	0.76	0.60	0.52	0.9230
<i>BC30</i>	JQ716431	(AC) ₁₈	F: ^{HEX} CACGGAAACCTCTAAACCAG R:CCTTCCAGCTATGACAGAAG	61°/72°	37	4	233-241	0.48	0.49	0.41	0.4007
<i>BC31</i> •	JQ716432	(GT) ₆	F: ^{FAM} AAGGCCCATTTACAGCAG R:GCACACTTTCACCCACATGA	61°/68°	32	1	273-273	-	-	-	-
<i>BC32</i>	JQ716433	(TG) ₇	F: ^{NED} GTGACCTCATCACATCCAAGC R:CAGAACTAGAGCCATCAGCCA	65°/72°	36	5	126-138	0.66	0.49	0.40	0.9973
<i>BC33</i>	JQ716434	(TG) ₇	F: ^{HEX} GGTGCAAGACAACAGGAAGTG R:GAACACACACCTCGTCACTCA	63°/68°	34	4	144-146	0.08	0.11	0.11	0.0870
<i>BC34</i> •	JQ716435	(TG) ₇	F: ^{FAM} GATACCGCAGAACACCTTCAG R:TGCTGAGGACCAAACATGAC	60°/68°	26	1	235-235	-	-	-	-
<i>BC35</i>	JQ716436	(CA) ₇	F: ^{NED} ACTTCAGTCATCACCCACAC R:ACACTTTCACCTCTCCCCACAG	60°/72°	27	2	273-275	0.14	0.14	0.12	1.0000
<i>BC36</i>	JQ716437	(AC) ₈	F: ^{HEX} CACAGAGGAATGTGATGTCTGC R:CTCCGGGCAAGTGTGTTTC	62°/72°	33	3	105-117	0.93	0.53	0.41	0.3450

♦ presença de alelos nulos; • loco monomórfico; T_a/T_{ext} - temperatura específica de anelamento/extensão dos *primers*, *N* – número amostral, *A* – número de alelos, H_o – heterozigidade observada, H_E – heterozigidade esperada, *PIC* – Conteúdo Informativo de Polimorfismo, * *P-HWE* – Correção de Bonferroni ($P < 0,05$).

Tabela II. Amplificação heteróloga de vinte e quatro locos microssatélites para *Brachyplatystoma capapretum* nas espécies correlatas do gênero *Brachyplatystoma* (n= 4).

Loci	Na	<i>B.juruense</i>	Na	<i>B.platynemum</i>	Na	<i>B.rousseauii</i>	Na	<i>B.tigrinum</i>	Na	<i>B.filamentosum</i>	Na	<i>B.vaillantii</i>
BC01	3	107-117	2	107-111	3	115-121	-	5	117-127	2	107-111	
BC03		-		-	1	196-196	-	1	200-200		-	
BC04		-		-		-	-		-		-	
BC05	7	166-206	4	178-196	5	174-182	2	190-196	3	190-210	4	182-210
BC06		-		-		-	-		-		-	
BC08	4	108-122	2	118-122	2	118-122	-	3	108-122	2	118-122	
BC09	2	196-200	2	148-158	1	198-198	-	2	198-200	1	198-198	
BC14	2	150-162	2	150-162	2	150-162	1	162-162	2	150-162	2	150-162
BC15	4	329-351	2	345-347	4	341-359	-	4	333-343	5	325-339	
BC16	5	114-130	4	118-132	2	126-130	2	114-128	4	130-146	5	124-146
BC17♦	6	233-272	4	260-282	2	239-257	-	2	268-274	3	273-303	
BC18	3	140-164	5	148-160	7	198-254	1	160-160	5	192-214	2	174-188
BC21	6	234-306	3	260-282	5	228-252	-	4	238-258	6	263-303	
BC22	4	282-306		-	3	264-284	1	272-272	3	252-272	3	262-290
BC23	4	329-351	2	346-348		-	-	4	338-344		-	
BC26		-		-	2	263-265	-	3	252-272	2	261-281	
BC28	5	151-175	3	161-177	4	139-155	1	161-161	2	155-157	7	157-205
BC30	3	243-257	1	237-237	4	251-259	1	235-241	1	257-257	1	125-125
BC31♦	7	282-336	7	302-344	4	264-286	1	270-270	2	252-272	6	262-298
BC32	2	121-131	4	122-134	4	126-138	2	136-150	2	123-133	5	121-137
BC33	2	150-164	1	122-122	2	113-115	2	112-116	2	104-122	6	112-172
BC34♦	5	238-272	2	236-238	2	236-254	1	236-236	2	242-246	4	234-250
BC35	4	224-240	2	208-224	4	258-280	-	3	250-270	5	252-294	
BC36	3	99-113	3	99-109	1	113-113	2	111-115	1	103-103	2	103-111

- Amplificação negativa, Na número de alelos, ♦ loco monomórfico para *Brachyplatystoma capapretum*

CAPÍTULO II

Estrutura populacional do bagre *Brachyplatystoma capapretum* (Siluriformes: Pimelodidae) na Amazônia Brasileira: Variabilidade genética revelada pelo uso do DNAm (região controle) e locos microssatélites.

Resumo

A piraíba negra (*Brachyplatystoma capapretum*) é um dos bagres predadores amazônicos de grande importância comercial. O presente trabalho teve o objetivo de inferir a variabilidade genética e estrutura populacional da piraíba negra em nove localidades da Amazônia Brasileira. Foram discriminados geneticamente 194 indivíduos de *Brachyplatystoma sp* pertencentes a cinco espécies de bagres comerciais (*B.filamentosum*, *B.capapretum*, *B.rousseauxii*, *B.vaillantii* e *B.platynemum*). A análise da estrutura populacional foi inferida por marcadores mitocondriais (região controle) com base em 76 exemplares de *B.capapretum* e 110 sequências nucleotídicas previamente depositadas no *GenBank*, provenientes de nove localidades amazônicas. Foram sequenciados 914 pb da região controle do DNAm onde se observou 75 haplótipos e 58 haplótipos únicos. A média da diversidade haplotípica (**HD**) foi de 0,939 e diversidade nucleotídica (π) de 0,0034. Posteriormente, 164 indivíduos de *B.capapretum* foram genotipados com base em oito locos microssatélites, selecionados de acordo com sua eficiência de amplificação e conteúdo de polimorfismo. Agrupamentos significantes para as localidades do rio Purus e Rio Madeira foram evidenciados pela AMOVA dos dados mitocondriais, onde 12,03% da variação genética estavam contidas nesses tributários, quando comparados às demais localidades. Outros agrupamentos também foram revelados através dos oito locos microssatélites, onde o Rio Branco apresentou valores significativos de F_{ST} e baixos números de migrantes. Contudo, as análises Bayesianas para estrutura populacional em ambos os marcadores não descartam a hipótese de panmixia nas populações de *B.capapretum*, sendo observadas fortes tendências ao fluxo gênico entre as localidades. Os resultados obtidos foram contextualizados nas principais mudanças geológicas ocorridas na bacia Amazônica e enfocando medidas conservacionistas para *B.capapretum*.

Palavras-chave: *Brachyplatystoma capapretum*, panmixia, Siluriformes, genética da conservação, piraíba preta.

Abstract

The black piraíba (*Brachyplatystoma capapretum*) is one of Amazon predator catfishes with high commercial importance. This study aimed to infer the genetic variability and population structure of black piraíba in nine localities in the Brazilian Amazon. Here were discriminated genetically 194 individuals of *Brachyplatystoma sp* belonging to five species of commercial catfish (*B.filamentosum*, *B.capapretum*, *B.rousseauxii*, *B.vaillantii* and *B.platynemum*). The analysis of population structure was inferred from mitochondrial markers (control region) based on 76 specimens of *B.capapretum* and 110 nucleotide sequences previously deposited on GenBank, derived from nine Amazonian localities. We sequenced 914 bp of the mtDNA control region which was observed 75 haplotypes and 58 private haplotypes. The average haplotype diversity (**HD**) was 0.939 and nucleotide diversity (**π**) of 0.0034. Subsequently, 164 individuals of *B.capapretum* were genotyped based on eight microsatellite loci, selected according to their amplification efficiency and polymorphism content. Significant clusters for the localities of Purus River and Madeira River were detected by AMOVA on mitochondrial data, where 12.03% of the genetic variation was contained in these tributaries when compared to other locations. Other clusters were also revealed through the eight microsatellite loci, where the Branco River showed significant F_{ST} and low numbers of migrants. However, Bayesian analyzes for population structure in both markers do not discard the hypothesis of panmixia in *B.capapretum* populations being observed strong tendencies to gene flow between locations. These results were contextualized in major geological changes occurring in the Amazon basin and focused conservation measures for *B.capapretum* populations.

Keywords: *Brachyplatystoma capapretum*, panmixia, Siluriforms, conservation genetics, black piraíba.

Introdução

A piraíba negra, conhecida popularmente como filhote capapreta (*Brachyplatystoma capapretum*), compõe parte dos recursos pesqueiros amazônicos extensamente explorados, porém ainda pouco conhecidos. Desde a sua descrição, pouco se conhece sobre sua distribuição nos rios da Amazônia e seus padrões de migração (Lundberg e Akama, 2005). Como os demais bagres amazônicos da ordem Siluriformes, a piraíba negra (*B.capapretum*) parece migrar pequenas distâncias, caracterizadas pelos seus períodos reprodutivos e movimento de cardumes de bagres menores, nos meses de cheia dos rios. Todos os padrões ecológicos de *B.capapretum* ainda são espelhados pelos descritos para seu grupo irmão na escala filogenética, *Brachyplatystoma filamentosum* (Santos *et al*, 2006).

Apesar de seu grupo irmão exibir exemplares maiores que 2,80 metros e podendo alcançar mais de 100 kg (Barthem e Goulding, 1997), os maiores indivíduos de piraíba negra descritos na literatura não passam de 1,30 metros (Lundberg e Akama, 2005). Os órgãos públicos reguladores da pesca comercial na região ainda não atentam para as revisões que discriminam as duas espécies de piraíba, tornando dificultosa a implementação de iniciativas conservacionistas para a referida espécie. A primeira discriminação de *B.capapretum* e *B.filamentosum* foi baseada em caracteres como: padrão de coloração, dentição, formato da nadadeira caudal e caracteres osteológicos (Lundberg e Akama, 2005). Grande parcela dos peixes que chegam aos portos de desembarque, imediatamente é decaptada pelos pescadores locais, tornando mais difícil a identificação *in situ*. Neste cenário, a primeira identificação molecular entre a piraíba (*B.filamentosum*) e a piraíba negra (*B.capapretum*) foi realizada por Huergo *et al* (2011). As estimativas de captura em rios de água branca indicam que a cada três *B.filamentosum* capturadas, um exemplar é *B.capapretum*.

Os marcadores moleculares tornaram-se importantes ferramentas para elucidar questões biológicas referentes a espécies de alto risco e sobreexploração (Frankham, 2008). O DNA mitocondrial representa uma indispensável ferramenta nos estudos de identificação de fragmentação de populações naturais e análises filogenéticas (Pereira, 2000). Este genoma independente é caracterizado por suas altas taxas mutacionais, ausência de recombinação, herança uni parental e por conter várias cópias por célula (Brown, 1979). Sua estrutura consiste em 13 genes codificadores de proteínas, dois RNAs ribossomais, 22 RNAs transportadores e uma importante região controladora da replicação do genoma mitocondrial, comumente denominada na literatura como região controle, incluindo também a alça-D (*D-loop region*). A variação no genoma mitocondrial é intimamente acompanhada nas mutações acumulada nesta região (Taberlet, 1996). A sensibilidade observada na identificação de populações distintas geneticamente, pelo sequenciamento nucleotídico da região controle, ocorre pelas taxas mutacionais que variam de 4 a 5 vezes a mais de que qualquer outro gene mitocondrial (Upholt e Dawid, 1977).

No grupo de Siluriformes Amazônicos, diversos trabalhos de genética populacional já foram realizados com o uso dessa região nucleotídica como marcador molecular, tais como: a piramutaba (*Brachyplatystoma vaillantii*) (Formiga-Aquino, 2004; Rodrigues, 2009), a dourada (*Brachyplatystoma rousseauxii*) (Batista e Alves Gomes, 2006; Batista, 2010), a piraíba (*Brachyplatystoma filamentosum*) (Huerdo *et al*, 2011), o surubim (*Pseudoplatystoma.sp*) (Ortiz, 2010) e o babão (*Brachyplatystoma platynemum*) (Orrego, 2012).

Limitações inerentes ao uso de marcadores haploides oriundos de organelas como a região controle podem comprometer a resolução da fragmentação das populações amostradas. Homoplasia (Brown *et al*, 1992), heteroplasmias (Meyer, 1993) e “*hot spots*” mutacionais (Liu e Cordes, 2004) podem informar falsos resultados de fragmentação ou solubilizar as informações de fragmentação em populações geneticamente homogêneas. Abordagens com múltiplos marcadores podem aumentar a robustez das análises populacionais (Sunnucks, 2000).

Marcadores microssatélites (SSR - *Simple Sequence Repeats*) exibem alta variabilidade, em decorrência das diferenças em sua composição nucleotídica, são densamente povoados no genoma de diversos organismos (Oliveira *et al*, 2006) e são codominantes, podendo ser identificados todos os alelos existentes em cada loco gênico (Schlötterer, 2004). Locos microssatélites são largamente empregados na identificação de unidades de manejo de alto valor comercial, sendo também desenvolvidos para algumas espécies de peixes da Ordem Siluriformes. Alguns desses são: *Clarias gariepinus* (Galbusera *et al*, 1996), *Pangasius hypophthalmus* (Volckaert *et al*, 1999), *Clarias macrocephalus* (Nakorn *et al*, 1999), o pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*) (Revaldaves *et al*, 2005), *Pimelodella chagresi* (Moeser e Bermingham, 2005), o bagre do Mekong (*Pangasianodon gigas*) (Ngamsiri *et al*, 2006), o Jaú (*Zungaro jahu*) (Carrillo-Avila *et al*, 2009) a piramutaba (*Brachyplatystoma vaillantii*) (Rodrigues, 2009), a dourada (*Brachyplatystoma rousseauxii*) (Batista, 2010) e o surubim (Saulo-Machado *et al*, 2010).

Neste contexto, o presente trabalho propõe inferir a variabilidade da piraíba negra (*Brachyplatystom capapretum*) na Amazônia, amostrando os principais afluentes dos rios de

água branca e revelando a atual caracterização genético-populacional desta espécie por meio de marcadores mitocondriais (Região Controle) marcadores nucleares (SSR).

Material e Métodos

Aquisição do Material Biológico.

Foram amostrados 194 indivíduos de “piraíba” (sem distinção entre espécies) junto ao mercado de pesca artesanal em desembarques pesqueiros de nove pontos de coleta na Amazônia Brasileira entre os anos de 1998 e 2010: Belém (PA) Santarém (PA), Manaus (AM), Tefé (AM), Tabatinga (AM), Porto Velho (RO), Boca do Acre (AM), Município de Maraã (AM) e Boa Vista (RR) (Figura 1). O número de indivíduos coletados e coordenadas geográficas por localidade encontra-se na Tabela I. Em adição, foram obtidos 111 sequências nucleotídicas de *B.capapretum* do *GenBank* referentes ao levantamento de captura entre as duas espécies abordado por Huergo *et al* (2011) (**GU903349** à **GU903459**) totalizando 308 indivíduos. Uma pequena porção de tecido muscular e de nadadeira foram coletados e acondicionados em etanol 96%. O DNA total foi extraído seguindo o protocolo utilizando Fenol-Clorofórmio segundo Sambrook *et al.* (1989) com modificações. As concentrações de DNA foram estimadas a partir de fotodocumentação em gel de agarose 0,8%, após eletroforese por 50 minutos em corrente de 80V e comparadas à marcadores de concentração conhecida (DNA fago λ).

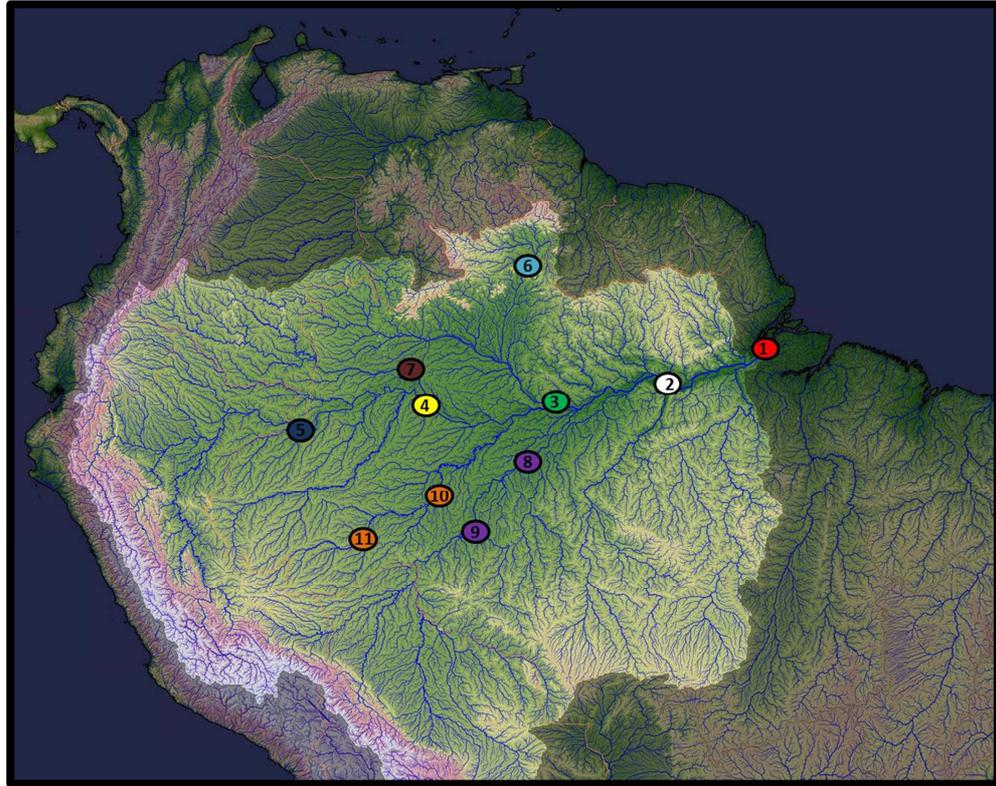


Figura 1 – Localidades Amazônicas amostradas para análise populacional de *B.capapretum* particionada em regiões (pontos coloridos). 1- Belém, 2- Santarém, 3- Manaus, 4- Tefé, 5 – Tabatinga, 6- Boa Vista (Rio Branco), 7- Maraã (Rio Japurá), 8- Manicoré (Rio Madeira), 9- Porto Velho (Rio Madeira), 10- Lábrea (Rio Purus), 11- Boca do Acre (Rio Purus).

Tabela I – Pontos de coleta de amostras de tecido de *Brachyplatystoma capapretum* segundo zonas amostradas, coordenadas geográficas e número de amostras.

Zonas	Local	Longitude/Latitude	Número Amostras
*ESA - Belém (PA)	Belém	01°27'18,04"S/48°30'08,90"W	14
*ESA - Santarém (PA)	Santarém	02°26'25,58"S/54°41'54,70"W	20
*ESA - Manaus (AM)	Manaus	03°05'39,60"S/60°01'33,63"W	24
*ESA - Tefé (AM)	Tefé	03°18'22,60"S/64°45'33,50"W	39
*ESA - Tabatinga (AM)	Tabatinga	04°15'11,62"S/69°56'19,36"W	16
Rio Branco (RR)	Boa Vista	02°50'23,75"N/60°39'43,61"W	13
Rio Madeira (RO)	Porto Velho	08°45'42,85"S/63°54'06,77"W	10
	Manicoré	05°48'33,77"S/61°18'01,77"W	3
Rio Purus (AM)	Lábrea	07°12'20,72"S/64°50'36,99"W	20
	Boca do Acre	08°43'45,81"S/67°24'29,67"W	3
Rio Japurá (AM)	Maraã	03°34'11,0"S /64°7'1718" 1"W	24
Total			186

* Eixo Solimões-Amazonas

Amplificação e sequenciamento da região controle.

Após a quantificação do DNA total (genômico e mitocondrial), a amplificação da região controle foi realizada utilizando o iniciador de PCR FTTP (Batista, 2010) e F12R (Sivasundar *et al*, 2001). O protocolo para a reação de PCR foi realizado segundo proposto por Batista e Alves-Gomes (2006) utilizando-se: 1 µl do DNA genômico (15 ng/µl), 2,5 µl de Tampão 10X (10 mM Tris-HCl, 50 mM KCL, 1mM EDTA), 3 µl de dNTP (0,25 mM de cada base), 1µl de MgCl₂ (50mM), 1µl de cada *primer* (5 µM), 1µl de *Taq DNA Polimerase* (1U/µl) e 11µl de água ultra-pura, totalizando 25µl de volume final. O perfil de ciclagem das temperaturas foi seguido por 30 ciclos de temperatura com: 94°C por 2 minutos, 53°C por 1 minuto, 72°C por 2 minutos e 72°C por 5 minutos, de extensão final. O produto amplificado foi purificado com PEG 20% (*Polyethylene Glycol* 8000), sendo então ressuspenso em 20µl de água ultra-pura.

O sequenciamento nucleotídico da região controle das amostras de “pirafba” foi realizado seguindo o protocolo do kit de sequenciamento para ABI 3130xl conforme recomendações do fabricante. Foram realizadas duas reações de sequenciamento de DNA por amostra nos sentidos 5´- 3` em ambas as fitas L e H. Após a reação, as amostras passaram por uma precipitação com EDTA e etanol conforme recomendações do fabricante, para eliminação de produtos não incorporados, e posteriormente eletro injetado em seqüenciador automático ABI 3130xl. O alinhamento das sequências foi feito nos programas BIOEDIT 7.0.9.0 (Hall, 1999) e CHROMAS 2.24 (Technelisyum Pty Ltd), sendo agrupadas em uma matriz de dados.

Identificação molecular dos indivíduos de *Brachyplatystoma capapretum*.

A identificação *a priori* dos indivíduos selecionados foi realizada mediante alinhamento dos primeiros 350 pb da região controle do DNA mitocondrial. Foram checados os sítios discriminantes descritos por Huergo *et al* (2011) e identificados geneticamente os grupos específicos pelo método de agrupamento de vizinhos (*Neighbour-joining*) (Saito e Nei, 1987). A árvore de identificação dos grupos foi confeccionada no programa MEGA 5.0.1 (Tamura *et al*, 2007) e corrigida pelo modelo evolutivo K2P (Kimura, 1980).

Distribuição dos haplótipos de *B.capapretum* e diversidade genética da região controle.

Para checar a presença de saturações nos sítios da região controle, foi usado o programa DAMBE 5 (Xia, 2013). Para a distribuição espacial das sequências nucleotídicas, foi elaborado uma árvore de haplótipos com base no princípio da parcimônia no programa NETWORK 4.6.1.1 (Fluxus Technology Ltd). O modelo de substituição nucleotídica proposto para as posteriores análises entre os haplótipos foi selecionado através do programa computacional JModelTest 2.1.3 (Darriba *et al*, 2012) através do modelo de critério AIC (*Akaike Information Criterion*). Foram calculados o número de haplótipos, número de haplótipos únicos, diversidade haplotípica (HD) (Nei, 1987), diversidade nucleotídica (π), número de sítios e número de sítios polimórficos (S), número de transições (TS) e transversões (TV), o número de *indels* (Inserções e deleções) e composição nucleotídica, estimados com o auxílio do programa Arlequin 3.11 (Excoffier *et al*, 2007). Para confecção das árvores de relações filogenéticas entre as sequências por filogramas baseados em agrupamentos dos vizinhos (NJ) (Saito e Nei, 1987), foi usado o programa MEGA 5.0.1 (Tamura *et.al.*, 2007).

Estrutura genética de populações de *B.capapretum* e fluxo gênico.

Para estimar a hipótese de panmixia ou estruturação de *B.capapretum* entre as localidades amostradas, foi realizada a análise hierárquica da variância molecular (AMOVA). Nessa análise é calculado o índice de fixação par a par (Φ_{st}) para avaliar os níveis de diferenciação entre as populações amostradas e com o qual será utilizado também no Teste de Mantel (Mantel 1967), com o intuito de correlacionar a distância genética com a geográfica. As análises foram realizadas aplicando 10.000 permutações e correção de Bonferroni de comparações múltiplas, com significância de $p < 0,05$. Também foram realizados os testes de neutralidade seletiva D de Tajima (Tajima, 1989) e expansão populacional F_s de Fu (Fu, 1997). Os valores positivos para este teste indicam subdivisão, gargalo ou seleção balanceadora. Foi gerado também o gráfico *mismatch distribution* para checar a existência de recente expansão populacional no programa DnaSP 5.0 (Librado e Rosas, 2009). As estimativas de fluxo gênico foram calculadas a partir do número de migrantes por geração (Nm). Essas estimativas foram realizadas com o auxílio do programa Arlequin 3.11 (Excoffier *et al*, 2007). O software BAPS5 (Corander *et al*, 2008) foi usado para inferir os possíveis números de clusters (k) em que as populações se subdividem. Foi utilizado o modelo de mistura (admixture model) através de 200 iterações e 20 iterações por indivíduos.

Amplificação e genotipagem dos locos microsatélites (SSR)

Para o estudo populacional foram selecionados dez marcadores microsatélites previamente desenvolvidos (Capítulo I), baseados na presença de alelos nulos, perfil dos alelos genotipados e eficácia nas amplificações (Tabela II). Para a amplificação por PCR foi utilizado protocolo proposto por Batista (2010). O produto de amplificação foi visualizado e

comparado com marcador *Ladder 1kb Plus* (*Fermentas*) de tamanho de bandas conhecido, em gel de agarose 1,5%, após eletroforese por 90 minutos com corrente 80V. Os produtos de PCR foram genotipados em analisador automático de DNA *ABI 3130xl* (*Applied Biosystems*) utilizando 1 µL de produto de PCR, 7,8 µL de *Tween 0,01%* e 0,2 µL de *ET-ROX 400 size standard* (*GE Healthcare*). Foi montado um sistema *multiplex* de genotipagem, marcando cada *primer* com fluoróforos diferentes (Schuelke, 2000) e com análise simultânea de três locos marcados com fluorescências distintas (FAM, HEX ou NED). As análises foram feitas no programa *GENEMARKER vs 1.97* (*Soft Genetics LLC*). A conversão dos arquivos gerados para diferentes *input files* dos demais programas a serem utilizados aqui, foi realizado através do programa *GENEALEX 6.1* (Peakall e Smouse, 2006).

Tabela II - Locus microssatélites selecionados para análise da estrutura populacional de *Brachyplatystoma capapretum*.

Locos	Fluorescência	Motivo de Repetição	Tamanho (pb)	Sequência dos <i>primers</i>	Anel/Ext(°C)
BC03	FAM	(TG) ₂₀	161	F: CTGGACTGAAATAAACTGTGAATG R: GGAAACATCAGAAGAAGACTGAGC	65°/68°
BC06	HEX	(TG) ₁₈ (AG) ₂₀	230	F:TGTATGTGTGAGGTTAGGACCG R:GCGGGACTTACTGAAGGTTGTA	64°/68°
BC15	NED	(CT) ₉	242	F:GTGCCTTCTGTGGGAGTGTTA R:CGTTAGCATTAGCGGTGTGTC	60°/68°
BC16	FAM	(AG) ₂₄	120	F:CGCTTATGGAGAGCACTGAAA R:AAACAGGATGAGCTGCGGTAT	63°/72°
BC18	HEX	(GT) ₂₁	145	F:ATATGCCTTCAGCACCAGGA R:ACTGATCCACACAGGGTCAAG	60°/68°
BC28	NED	(GT) ₁₁	137	F:CTGGATAGACAACCCACCAT R:ACCTGTAGGGAGGGAGAACAG	60°/68°
BC30	FAM	(AC) ₁₈	233	F:CACGGAAACCTCTAAACCAG R:CCTTCCAGCTATGACAGAAG	61°/72°
BC32	HEX	(TG) ₇	126	F:GTGACCTCATCACATCCAAGC R:CAGAACTAGAGCCATCAGCCA	65°/72°

Anel/Ext (°C) – Temperaturas de anelamento e extensão usadas na PCR dos locos respectivamente.

Estimativas dos parâmetros genéticos para regiões microssatélites (SSR).

A presença de alelos nulos do banco de dados foi verificada com o auxílio do programa MicroChecker 2.2.3 (Van Oosterhout, 2004). O programa MSTOOLS (Park, 2001) foi utilizado para inferir parâmetros populacionais entre as nove localidades amostradas, tais como a Heterozigosidade (H_e) observada (H_o) e esperada, Conteúdo Informativo de Polimorfismo (PIC), estipular a presença de redundâncias nas amostragens e checar a diferença nos tamanhos dos alelos. O teste do equilíbrio de Hardy-Weinberg para os locos amplificados nas populações de *B.capapretum* foi inferido pelo programa computacional GENEPOP 4.0 (Raymond e Rousset, 1995). No programa FSTAT 2.9.3.2 (Goudet, 2002) foi verificada a presença de desequilíbrio gênico entre os locos.

Estrutura genética de populações de *B.capapretum* e fluxo gênico com o uso de microssatélites.

As estatísticas de F de Wright (Wright, 1951) e a Análise de Variância Molecular (AMOVA) foram realizadas entre as populações com auxílio do programa ARLEQUIN 3.11 (Excoffier *et al*, 2007), com o intuito de verificar a existência e o grau de diferenciação genética entre as localidades. O teste de Mantel (Mantel, 1967), gerado pelo mesmo programa, foi usado para inferir se existem correlações entre a distância genética e a distância geográfica, adotando uma confiabilidade do uso de 10.000 permutações.

Para verificar o possível número de populações (k) e a existência de estruturação, foi utilizado o programa STRUCTURE 2.2 (Pritchard *et al*, 2000). Este programa faz análises de agrupamentos baseadas em inferências Bayesianas, adotando um número K (*Clusters*) de

agrupamentos, equilíbrio de Hardy-Weimberg e ausência de desequilíbrio de ligação entre os locos. Foi adotado o modelo de mistura (*mixture model*) para inferir populações sub-estruturadas, onde se adota que cada indivíduo poderia possuir ancestrais oriundos de mais de uma população (Falush *et al*, 2003). Esse modelo permite uma melhor resolução das separações das populações de acordo com os valores K. Cada corrida para testar o número de K existentes consistiu em 10 réplicas independentes, com valores de corte de 100.000 permutações (*burnin*) e 500.000 MCMC (simulação de Cadeias de Monte Carlo). O número de populações estatisticamente mais verossímil foi selecionada a partir dos modelos propostos por *log-likelihood* (Falush *et al*, 2003) e pelo método estatístico de Evanno *et al* (2005) através do programa STRUCTURE HARVESTER (Earl e VonHoldt, 2012) (<http://taylor0.biology.ucla.edu/structureHarvester/>).

Resultados

Identificação molecular de indivíduos de *Brachyplatystoma capapretum* por meio do sequenciamento da região controle do DNA mitocondrial.

Um total de 194 amostras de “piraíba” (*Brachyplatystoma* sp.) foram identificadas através do sequenciamento de 500 pb da região controle do DNA mitocondrial. Todas as amostras foram alinhadas e agrupadas em um filograma confeccionado com base no agrupamento de vizinhos (NJ) (Figura 2). O uso de *primers* alternativos fez-se necessário na ocorrência de problemas durante as reações de sequenciamento (Dados não amostrados).

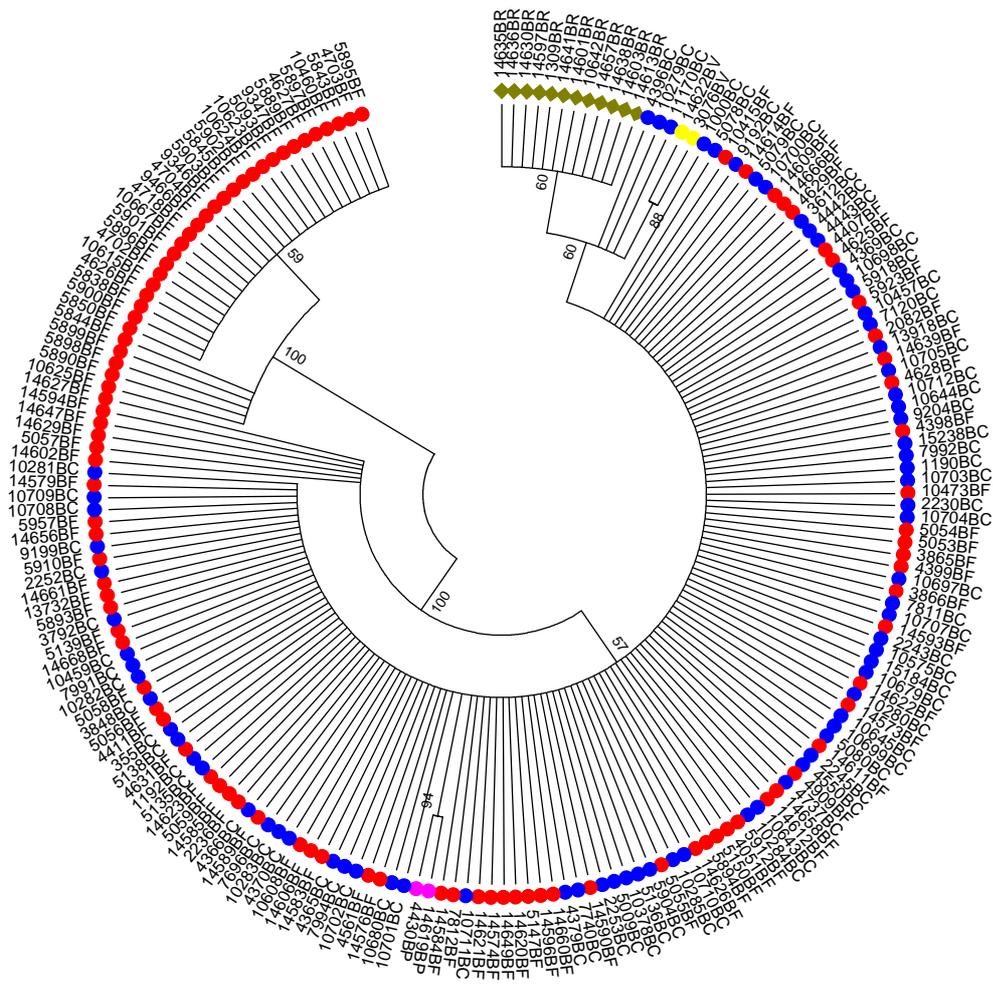


Figura 2 - Filograma confeccionado por agrupamento de vizinhos (NJ) para identificação molecular *a posteriori* de 194 indivíduos de *Brachyplatystoma.sp* baseados em 500 pb da região controle do DNA mitocondrial. Vermelho – *Brachyplatystoma filamentosum*, Azul- *Brachyplatystoma capapretum*, Amarelo- *Brachyplatystoma vaillantii*, Roxo- *Brachyplatystoma platynemum*, Marrom- *Brachyplatystoma rousseauxii*.

No total, foram identificados 102 indivíduos de piraíba (*Brachyplatystoma filamentosum*), dois indivíduos de piramutaba (*Brachyplatystoma vaillantii*), dois indivíduos de babão (*Brachyplatystoma platynemum*), 12 indivíduos de dourada (*Brachyplatystoma rousseauxii*) e 76 indivíduos piraíba negra (*Brachyplatystoma capapretum*). As amostras de *B.capapretum* foram sequenciadas na íntegra e adicionadas a uma matriz de alinhamento, juntamente com 110 sequências da região controle de *B.capapretum* discriminadas por Huergo *et al* (2011) (GU903349 à GU903459), totalizando 186 indivíduos.

Índices de diversidade molecular e frequência dos haplótipos.

Foram obtidos 914 pb da região controle de *B.capapretum* provenientes de 186 exemplares oriundos de nove localidades da Amazônia Brasileira. As médias das composições nucleotídicas foram 20,72% para citosinas, 33,02% para timinas, 31,66% para adeninas e 14,60% para guaninas. Foi observado um total de 45 sítios polimórficos e 22 sítios informativos para a aplicação do método de parcimônia. Não foi observada saturação dos sítios da região controle com base no gráfico de substituições nucleotídicas versus distância genética, assumindo-se o modelo mutacional TN93 previamente sugerido pelo programa JMODELTEST (Figura 3).

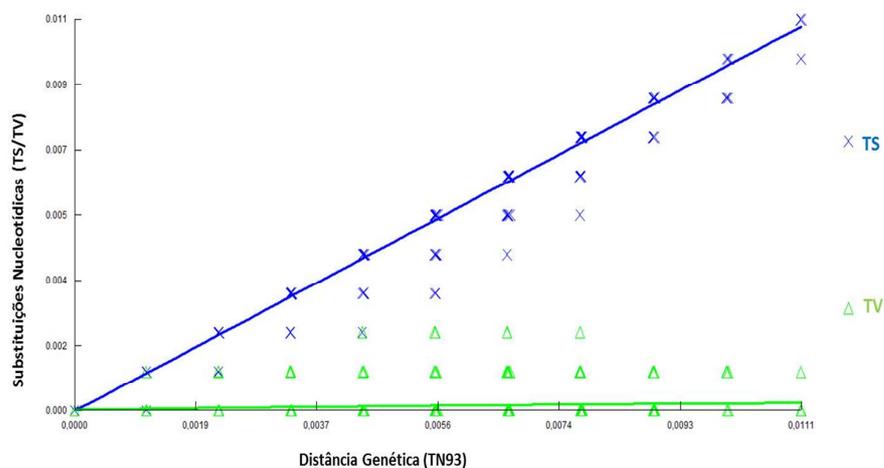


Figura 3 – Distância genética *versus* substituições nucleotídicas evidenciando baixa saturação entre os sítios da região controle de *Brachyplatystoma capapretum*.

A região controle conteve 75 haplótipos e 58 haplótipos únicos com uma diversidade haplotípica (**HD**) de $0,9397 \pm 0,011$ e diversidade nucleotídica (π) de $0,00362 \pm 0,00013$. A frequência dos haplótipos variou de 1 (dentro dos 58 haplótipos únicos) à 33 (HBC10).

A frequência dos haplótipos por localidade encontra-se no Apêndice A. O haplótipo HBC10 com a maior frequência (33), foi observado com maior representatividade em Tefé (N=10) e menor em Tabatinga e na região do Rio Madeira (N=1), ocorrendo em todas as localidades. O haplótipo HBC13 obteve a segunda maior frequência dentre as localidades (N=25), obtendo maior frequência em Tefé (N=5) e menor frequência em Santarém e no rio Madeira (N=2). As localidades de Japurá (N=20) e Tefé (N=18) obtiveram os maiores números de haplótipos, provavelmente em decorrência também da ampla amostragem nestas localidades. Uma maior concentração de haplótipos únicos (**HU**) foi observada nas localidades de Tefé (N=11) e Japurá (N=10), não sendo observado nenhum haplótipo exclusivo na localidade no Rio Branco. Todas as localidades apresentaram alta diversidade haplotípica (**HD**). Os maiores e menores índices de diversidade nucleotídica (π) foram observados nas localidades de Belém e rio Purus, com valores de 0,00427 e 0,00235, respectivamente. O teste de neutralidade D de Tajima revelou que as populações amostradas estão evoluindo de acordo com a neutralidade em relação ao DNA mitocondrial. Valores negativos e significativos ($p < 0,05$), também foram observados no teste Fs de Fu, indicando possível expansão populacional em todas as localidades amostradas (Tabela III).

Tabela III – Índices de diversidade molecular para região controle de *Brachyplatystoma capapretum* em nove pontos de coleta da Amazônia Brasileira (n=186).

População	N	H	HD	HU	S	ETA	PI (π)	D-Tajima	Fs FU
Belém (PA)	14	11	0,9560	4	15	14	0,00427	-0.47121	-4.58268*
Santarém (PA)	20	15	0,9684	7	16	13	0,00357	-0.40753	-8.73033*
Manaus (AM)	24	16	0,9457	8	16	13	0,00373	-0.08963	-7.87774*
Tefé (AM)	39	18	0,9055	11	19	18	0,00357	-0.77860	-7.54611*
Tabatinga (AM)	16	11	0,9250	7	13	11	0,00358	-0.06461	-4.09114*
rio Japurá (AM)	24	20	0,9819	10	21	20	0,00422	-1,03402	-15.37673*
rio Branco (RR)	13	7	0,8846	0	9	8	0,00310	0,36439	-1.13099
rio Madeira (RO)	13	12	0,9872	6	12	10	0,00279	-0.84798	-9.68486*
rio Purus (AM)	23	12	0,9012	5	10	9	0,00235	-0.41319	-5.60737*

N - número amostral, **H** – número de haplótipos, **HD** – diversidade haplotípica, **HU** – haplótipos únicos, **S** – sítios polimórficos, **ETA** – mutações totais, π – diversidade nucleotídica. *Valores significativos ($P < 0,05$)

Teste de estrutura populacional com base na análise da variância molecular (AMOVA).

O teste hierárquico da variação molecular (AMOVA) foi realizado para testar a hipótese de panmixia ou estruturação entre as localidades de *B.capapretum* amostradas. O primeiro agrupamento testado incluiu todas as localidades a fim de se verificar os níveis de diferenciação entre e dentro dos locais amostrados (Tabela IV). Os valores de Φ_{st} indicam baixos níveis de estruturação (Wright, 1978). A maior variabilidade foi observada dentro das localidades (96,58%) se comparada entre as localidades (3,42%).

Tabela IV – Análise da variância molecular de *B.capapretum* em nove localidades da Amazônia Brasileira.

Fonte da Variação.	Grau de liberdade	Soma dos quadrados	Componentes da variação	Porcentagem da variação
Entre localidades	8	24,481	0,06308 Va	3,42*
Dentro das localidades	177	314,987	1,77959 Vb	96,58*
Total	185	339,468	1,84267	100*
Índice de fixação Φ_{ST} : 0.0342				

*Valores significativos (P<0,05)

O segundo agrupamento hierárquico arquitetado consistiu na diferença entre amostras dos tributários amazônicos e a calha principal do Rio Amazonas. Os índices de fixação dos componentes da AMOVA mostram baixos níveis de estruturação genética. Uma significativa mudança nas porcentagens da variação foi observada, onde 5,21% da variação estavam inseridas entre as localidades (p< 0,50% entre os grupos das localidades e 94,29% dentro das localidades (Tabela V). Outros agrupamentos relevantes consistiram na fragmentação apenas dos tributários da esquerda e apenas nos tributários da direita do Rio Amazonas, sendo individualmente comparados com a calha principal do rio. Tributários da margem esquerda (Rio Japurá e Rio Branco) representaram 4,05% da variação genética existente entre todas as

localidades. Em contra partida, os tributários da margem direita (Rio Purus e Rio Madeira) agregaram cerca de 12,03% da variação existente entre as populações (dados não amostrados).

Tabela V – Análise da variância molecular de *Brachyplatystoma capapretum* para agrupamentos das localidades da calha (BE,SA,MA,TE,TA) e tributários amazônicos (MD,PU,JÁ,BR).

Fonte da Variação	Grau de liberdade	Soma dos quadrados	Componentes da variação	Porcentagem da variação
Entre calha e tributários	1	10.714	0.09838 Va	5,21%*
Entre grupos dentro das localidades	7	13.767	0.00935 Vb	0,50%*
Dentro das localidades	177	314.987	1.77959 Vc	94,29%*
Total	185	339.468	1,887,32	100%*
$\Phi_{sc} = \mathbf{0.0052}$				
$\Phi_{st} = \mathbf{0.0571}$				
$\Phi_{ct} = \mathbf{0.0521}$				

*Valores significativos (P<0,05)

Com as maiores porções de variação genética contida nos tributários da margem direita, foi realizado o teste hierárquico para os rios Purus e Madeira, de forma individual. Os valores referentes ao rio Purus demonstram que 8,21% da variação genética está presente entre as localidades amostradas e os grupos nestas localidades (dados não amostrados), em vista que para os valores referentes apenas ao rio Madeira, essa variação representa 9,98% de variação observada entre as localidades e grupos entre estas localidades (Tabela VI).

Tabela VI – Análise da variância molecular de *Brachyplatystoma capapretum* para agrupamentos das localidades do rio Madeira e demais localidades.

Fonte da variação	Grau de liberdade	Soma dos quadrados	Componentes da variação	Porcentagem da variação
Entre rio Madeira e demais localidades	1	6,142	0,1578 Va	7,98%*
Entre localidades dos grupos	7	18,339	0,0396 Vb	2,00%*
Dentro das localidades	177	314,987	1,7796 Vc	90,02%*
Total	185	3,39468	1,9769	100,00%*
$\Phi_{sc} = 0.0218$				
$\Phi_{st} = 0.0998$				
$\Phi_{ct} = 0.0798$				

*Valores significativos ($P < 0,05$)

Distância Genética e análises de fluxo gênico entre populações de *Brachyplatystoma capapretum* na Amazônia.

Apenas duas localidades apresentaram valores de Φ_{st} par a par significativos, quando comparadas a localidade do rio Purus, após correção de Bonferroni. As regiões do rio Purus com Santarém apresentaram $\Phi_{st} = 0,1698$ e rio Purus com Tabatinga com $\Phi_{st} = 0,2026$. Baixos valores de migrantes foram registrados nas localidades do rio Purus e rio Madeira, quando comparadas às demais localidades amazônicas. Os menores valores de migrantes foram observados entre as localidades do rio Madeira com Tabatinga e rio Purus com Tabatinga. Todas as localidades da calha apresentaram altos números de migrantes em comparações par a par (Tabela VII). Nenhum padrão de distribuição estruturado foi observado na confecção da árvore de haplótipos (Figura 4). A análise Bayesiana para inferência da estrutura populacional de *B.capapretum* indicam três grandes *clusters*, segmentados entre todas as localidades amostradas ($\log (ml) = -987.0761$) (Figura 5).

Tabela VII – Valores Φ_{st} par a par (valores inferiores) e número de migrantes (valores superiores) para populações de *Brachyplatystoma capapretum* provenientes de nove localidades da Amazônia Brasileira.

	Belém	Santarém	Tefé	Tabatinga	Manaus	Japurá	rio Branco	rio Purus	rio Madeira
Belém		<i>inf</i>	<i>inf</i>	<i>inf</i>	<i>inf</i>	<i>inf</i>	495,3247	4,2897	4,2095
Santarém	-0,0079		<i>inf</i>	<i>inf</i>	<i>inf</i>	852,1775	18,6688	2,4448	2,0858
Tefé	-0,0240	-0,0009		480,2053	<i>inf</i>	<i>inf</i>	<i>inf</i>	5,4185	4,3333
Tabatinga	-0,0223	-0,0261	0,0010		<i>inf</i>	78,2222	10,4907	1,9683	1,9149
Manaus	-0,0389	-0,0034	-0,0179	-0,0128		<i>inf</i>	152,7211	4,8038	4,3705
Japurá	-0,0249	0,0005	-0,0128	0,0063	-0,0100		<i>inf</i>	6,6506	5,7923
rio Branco	0,0010	0,0260	-0,0052	0,0454	0,0032	-0,0221		10,2982	11,2537
rio Purus	0,1043	0,1697*	0,0844	0,2025*	0,0942	0,0699	0,0463		<i>inf</i>
rio Madeira	0,1061	0,1933	0,1034	0,2070	0,1026	0,0794	0,0425	-0,0219	

*Valores significativos após correção de Bonferroni ($P < 0,0013$). *Inf* – Valores de fluxo que tendem ao infinito.

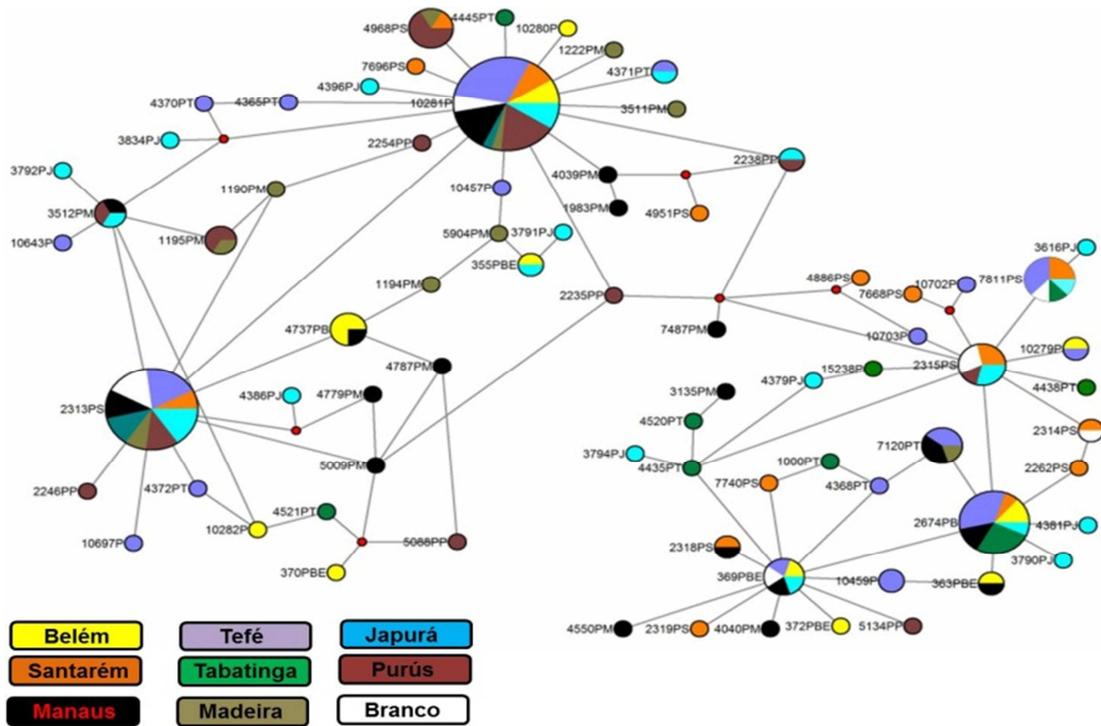


Figura 4 – Rede de haplótipos de *Brachyplatystoma capapretum*, com base em 186 seqüências nucleotídica da região controle do DNAm.

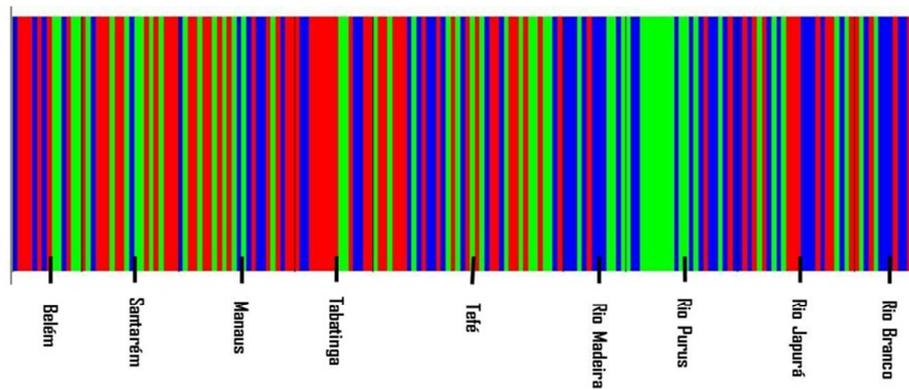


Figura 5 – Estrutura populacional de *Brachyplatystoma capapretum*: gráfico de barras gerado pelo programa BAPS 5.3 onde três *clusters* são definidos (verde, vermelho e azul) e distribuídos em todos os sítios de coleta.

Correlação geográfica e distância genética de *Brachyplatystoma capapretum*

A partir do teste de Mantel, não foi identificada uma correlação significativa entre a distância genética (Φ_{st}) e a distância geográfica entre as localidades. O valor do coeficiente de correlação $r = 0,3931$ não foi significativo ($P = 0,05470$).

Análises de expansão populacional (*mismatch distribution*) para *Brachyplatystoma capapretum*.

Os padrões multimodais observados nas curvas dos gráficos de *mismatch distribution* (Figura 6), indicam que as localidades em sua totalidade representam uma grande população com equilíbrio demográfico. Analisando os gráficos de distribuição individualmente, apenas amostragem dos rios Madeira e Purus apresentam gráficos unimodais, caracterizado por recente expansão populacional (Slatkin e Hudson, 1991). Os valores significativos de F_s de F_u (-9.68486 e -5.60737) corroboram a proposta de estes dois rios, Madeira e o Purus respectivamente, representarem um agrupamento diferenciado diante das demais localidades da Amazônia brasileira.

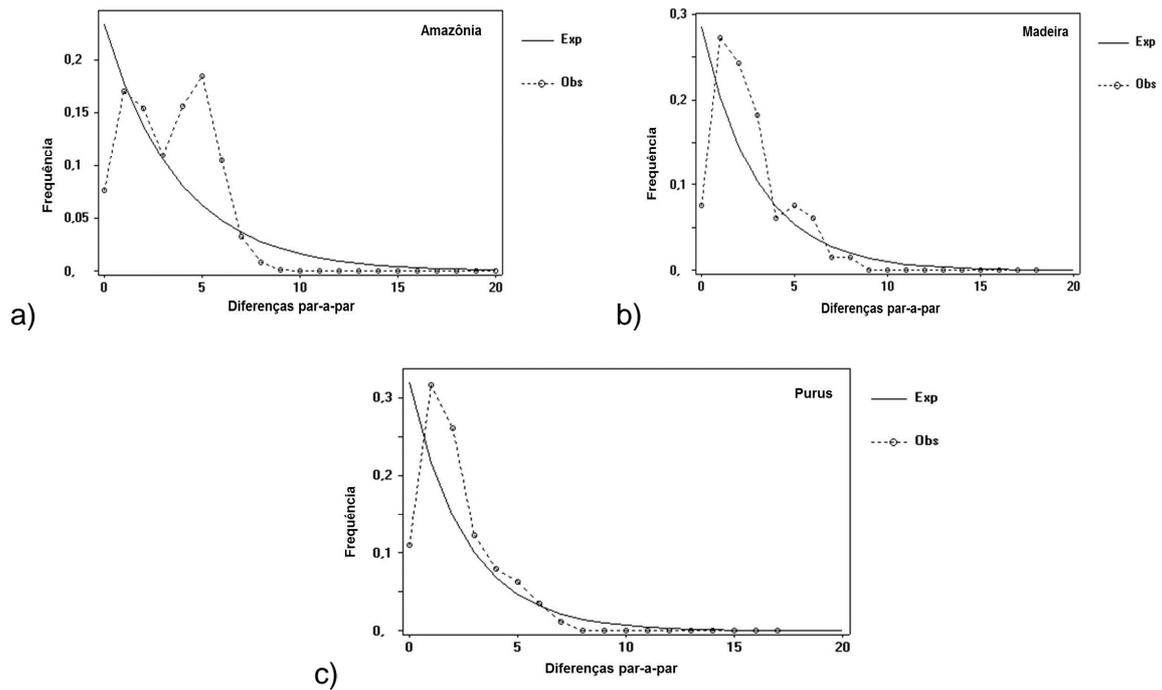


Figura 6 – *Mismatch Distribution* para populações de *Brachyplatystoma capapretum*: Amazônia (todas as localidades), rio Madeira e rio Purus.

Diversidade genética de *Brachyplatystoma capapretum* com base em marcadores microssatélites.

O estudo populacional foi conduzido através de uma matriz de genótipos de 164 indivíduos de *B. capapretum*, provenientes de nove localidades e baseados na diversidade de oito locos microssatélites previamente selecionados (Capítulo I). Foram observados 73 alelos, variando entre 7 (BC03 e BC28) à 13 (BC06). A heterozigosidade observada (H_0) dos oito locos utilizados variou de 0,053 (BC15) à 0,805 (BC16) e a heterozigosidade esperada (H_E) variou de 0,071 (BC15) à 0,728 (BC16). Os menores e maiores índices no Conteúdo de Polimorfismo Informativo (PIC) foram observados também nos locos BC15 e BC16, com valores 0,071 e 0,689 respectivamente. O loco BC15 também apresentou os maiores valores para o coeficiente de endogamia ($F_{IS} = 0,085$) (Tabela VIII).

Tabela VIII – Valores de diversidade genética para os locos microssatélites utilizados na inferência da variabilidade de *Brachyplatystoma capapretum*. Com número de alelos (A), Heterozigosidade observada (H_O), Heterozigosidade esperada (H_E), Conteúdo de Polimorfismo Informativo (PIC) e Coeficiente de endogamia (F_{IS}).

Locos	Tamanho	A	H_O	H_E	PIC	F_{IS}
BC03	169-201	7	0,16	0,169	0,165	0,039
BC06	306-332	13	0,653	0,663	0,609	0,058
BC15	312-342	8	0,053	0,071	0,071	0,085
BC16	116-150	10	0,805	0,728	0,689	0,047
BC18	136-164	12	0,496	0,627	0,603	0,055
BC28	149-179	7	0,388	0,349	0,326	0,065
BC30	232-250	8	0,500	0,699	0,656	0,077
BC32	123-145	8	0,408	0,364	0,318	0,041

Foi observado um total de 21 alelos exclusivos. O loco BC 15 apresentou um maior número de alelos privados dentre as nove localidades amostradas. A localidade do Rio Branco conteve o maior número de alelos exclusivos dentre os locos microssatélites, totalizando sete alelos. O alelo “145” apresentou a menor frequência dentre os demais (0,0016), sendo presente apenas na localidade de Tefé (Tabela IX).

A presença de alelos nulos foi sugerida pelo programa MicroChecker nas localidades de Santarém (BC18 e BC30), Tefé (BC 30), Rio Japurá (BC 30) e Rio Madeira (BC 18). Após a correção de Bonferroni ($P < 0,006$), desvios no equilíbrio de HWE foram observados nas localidades de Santarém para o loco BC18, nas localidades de Tefé e rio Japurá para o loco BC 30. Ressalta-se que em todos os locos que apresentaram desvios de HWE foi sugerido a presenças de alelos nulos na composição de seus genótipos (Tabela X). Dois locos apresentaram desequilíbrio de ligação (BC16/BC28).

Os maiores índices de heterozigosidade observada (H_O) e esperada (H_E) foram encontrados nos locos BC16 (1,000) e BC 30 (0,765), referentes às localidades do rio Madeira e Santarém, respectivamente. Foram calculadas 68 estimativas para os índices de endogamia

entre as localidades (F_{IS}), onde o maior valor observado foi registrado para o loco BC 15 na localidade de Santarém (0,474) e o menor para Tefé, respectivo ao loco BC 32 (-0,456). 41 estimativas de F_{IS} obtiveram valores negativos e 27 valores positivos. Ambas devido a excessos e deficiências nos valores de heterozigotos. A localidade com maior riqueza alélica (A_R) observada foi em Santarém, com valores médios de 5,50 alelos por loco (Tabela IX).

Tabela IX – Frequência de alelos exclusivos (em parênteses) de locos microsatélites observados em *Brachyplatystoma capapretum*, oriundos de nove localidades da Bacia Amazônica Brasileira.

Locos	Localidades									Total
	Belém	Santarém	Manaus	Tefé	Tabatinga	RioBranco	Japurá	Madeira	Purus	
BC03						201 (0,083)				1
BC06			318 (0,023)		310 (0,036)	306 (0,071)				3
BC15		322 (0,033)	312 (0,026)			334 (0,083)				6
		338 (0,033)				340 (0,167)				
						342 (0,083)				
BC16		150 (0,029)				146 (0,143)				2
BC18					142 (0,033)					1
BC28	175 (0,036)	153 (0,029)				179 (0,143)				3
BC30									250 (0,023)	1
BC32		139 (0,059)	131 (0,023)	145 (0,016)				143 (0,038)		4
Total	1	5	3	1	2	7	0	1	1	21

Tabela X - Índices de diversidade genética de *Brachyplatystoma capapretum* para nove localidades da Amazônia Brasileira; número amostral (N), número de alelos (A), Riqueza alélica (A_R), heterozigosidade observada (H_O), heterozigosidade esperada (H_E), índice de endogamia (F_{IS}), teste do equilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE) e frequência dos alelos nulos (R).

Populações	Índices	BC03	BC06	BC15	BC16	BC18	BC28	BC30	BC32	A_R
Belém	N	14	10	12	11	13	14	14	14	3,75
	A	3	5	1	6	6	4	4	2	
	H_O	0,286	0,600	-	0,818	0,692	0,714	0,429	0,143	
	H_E	0,255	0,630	-	0,752	0,627	0,533	0,533	0,133	
	F_{IS}	-0,120	0,048	-	-0,088	-0,104	-0,340	0,196	-0,077	
	HWE	1,000	0,423	-	0,492	0,053	1,000	0,169	1,000	
	R	-	-	-	-	-	-	-	-	
Santarém	N	17	17	15	17	17	17	14	17	5,50
	A	4	8	3	7	6	5	6	5	
	H_O	0,235	0,647	0,067	0,647	0,412	0,294	0,500	0,647	
	H_E	0,216	0,732	0,127	0,690	0,666	0,311	0,765	0,562	
	F_{IS}	-0,088	0,116	0,474	0,063	0,382	0,056	0,347	-0,151	
	HWE	1,000	0,151	0,034	0,111	0,005	0,411	0,021	0,035	
	R	-	-	-	-	0,152	-	0,150	-	
Manaus	N	22	22	19	19	21	22	18	22	4,75
	A	2	9	3	6	8	3	4	3	
	H_O	0,091	0,773	0,158	0,684	0,619	0,227	0,333	0,364	
	H_E	0,087	0,693	0,148	0,629	0,616	0,206	0,472	0,305	
	F_{IS}	-0,048	-0,115	-0,065	-0,088	-0,006	-0,106	0,294	-0,193	
	HWE	1,000	0,844	1,000	0,749	0,343	1,000	0,102	1,000	
	R	-	-	-	-	-	-	-	-	

Significante $p < 0,006$ – realce em negrito para valores significativos

Tabela X - Continuação...

Populações	Índices	BC03	BC06	BC15	BC16	BC18	BC28	BC30	BC32	A _R
Tefé	N	27	31	27	30	31	31	27	32	4,75
	A	3	8	2	7	8	3	4	3	
	H _O	0,074	0,677	0,037	0,900	0,452	0,419	0,481	0,656	
	H _E	0,072	0,656	0,036	0,732	0,569	0,347	0,711	0,451	
	F _{IS}	-0,029	-0,033	-0,019	-0,229	0,207	-0,208	0,322	-0,456	
	HWE	1,000	0,147	-	0,990	0,013	1,000	0,004	1,000	
	R	-	-	-	-	-	-	0,133	-	
Tabatinga	N	15	14	15	15	15	14	13	15	3,75
	A	2	8	1	6	6	2	4	2	
	H _O	0,133	0,643	-	0,667	0,467	0,143	0,538	0,267	
	H _E	0,124	0,691	-	0,713	0,651	0,133	0,426	0,231	
	F _{IS}	-0,071	0,070	-	0,065	0,283	-0,077	-0,264	-0,154	
	HWE	1,000	0,355	-	0,141	0,099	1,000	1,000	1,000	
	R	-	-	-	-	-	-	-	-	
Rio Branco	N	6	7	6	7	5	7	3	7	4,37
	A	5	4	4	5	5	4	4	4	
	H _O	0,500	0,286	0,333	0,857	0,600	0,571	0,667	0,714	
	H _E	0,681	0,459	0,514	0,745	0,600	0,602	0,722	0,704	
	F _{IS}	0,265	0,378	0,351	-0,151	0,000	0,051	0,077	-0,014	
	HWE	0,102	0,076	0,111	0,799	0,619	0,440	0,333	0,572	
	R	-	-	-	-	-	-	-	-	
Rio Japurá	N	21	21	22	21	21	22	20	22	3,62
	A	2	6	1	6	5	3	5	2	
	H _O	0,048	0,810	-	0,762	0,381	0,364	0,350	0,227	
	H _E	0,046	0,642	-	0,687	0,482	0,305	0,651	0,201	
	F _{IS}	-0,024	-0,261	-	-0,109	0,209	-0,193	0,463	-0,128	
	HWE	-	0,957	-	0,483	0,179	1,000	0,0007	1,000	
	R	-	-	-	-	-	-	0,182	-	

Significante $p < 0,006$ – realce em negrito para valores significativos

Tabela X- Continuação...

Populações	Índices	BC03	BC06	BC15	BC16	BC18	BC28	BC30	BC32	A _R
Rio Madeira	N	12	13	12	13	13	13	13	13	4,25
	A	2	5	2	6	6	3	7	3	
	H _O	0,167	0,615	0,083	1,000	0,462	0,846	0,692	0,385	
	H _E	0,153	0,660	0,080	0,734	0,683	0,541	0,751	0,322	
	F _{IS}	-0,091	0,067	-0,043	-0,363	0,325	-0,563	0,079	-0,193	
	HWE	1,000	0,406	-	1,000	0,066	1,000	0,145	1,000	
	R	-	-	-	-	0,131	-	-	-	
Rio Purus	N	22	21	22	21	21	22	22	22	4,12
	A	5	5	1	7	6	3	5	2	
	H _O	0,227	0,524	-	0,905	0,524	0,227	0,682	0,273	
	H _E	0,211	0,542	-	0,717	0,613	0,208	0,632	0,236	
	F _{IS}	-0,078	0,033	-	-0,263	0,146	-0,095	-0,078	-0,158	
	HWE	1,000	0,519	-	0,996	0,218	1,000	0,093	1,000	
	R	-	-	-	-	-	-	-	-	

Significante $p < 0,006$ – realce em negrito para valores significativos

Estrutura populacional de *Brachyplatystoma capapretum* baseada em locos microssatélites.

A hierárquica da Análise da Variância Molecular (AMOVA) para os locos microssatélites, corroborando os dados observados com a região controle do DNA mitocondrial, continua indicando que grande parcela da variabilidade genética está presente dentro das localidades amostradas (Tabela XI). Outros agrupamentos foram experimentados para identificar quais localidades são mais relevantes na composição genética de população de *B.capapretum*, identificando assim possíveis indícios de populações estruturadas. Os agrupamentos “*Calha / Tributários*”, “*Amazônia / Tributários Margem Direita*” e “*Amazônia / Tributários Margem Esquerda*” continuaram a apresentar a maior parte da variação genética dentro das localidades, onde “*Amazônia*” refere-se à comparação com todas as demais localidades (dados não amostrados). Contudo, o agrupamento “*Amazônia / Rio Branco*” mostrou significativos valores entre as localidades (11,49%), dentro dos grupos arquitetados (2,06%) e dentro das localidades amostradas (86,45%) (Tabela XII).

Tabela XI – Análise Global da Variância Molecular de *Brachyplatystoma capapretum* para agrupamentos das localidades Amazônicas.

Fonte da variação	Soma dos quadrados	Componentes da variação	Porcentagem da variação
Entre localidades	30.846	0.06233	3.38 %*
Dentro das localidades	535.868	178.260	96.62 %*
Total	566.714	184.493	100%*

Índice de fixação Φ_{ST} : **0.03378**

*Valores significativos (P<0,05)

Tabela XII – Análise da Variância Molecular de *Brachyplatystoma capapretum* para agrupamentos entre a localidade do rio Branco e os demais sítios amostrados (Amazônia).

Fonte da variação	Soma dos quadrados	Componentes da variação	Porcentagem da variação
Entre localidades	7.637	0.23690	11.49 %*
Entre localidades dos grupos	23.209	0.04229	2.06 %*
Dentro das localidades	535.868	1.78260	86.45 %*
Total	566.714	2.06180	100%*
Índice de fixação: Φ_{ST} 0.13542			
Φ_{SC} 0.02318			
Φ_{CT} 0.11490			

*Valores significativos ($P < 0,05$)

Distância Genética e análises de fluxo gênico com base em marcadores microssatélites.

Com base nos índices de Φ_{st} , apenas a localidade do rio Branco foi significativamente diferenciada das localidades de Belém, Manaus, Tabatinga, Rio Japurá e Rio Purus. Segundo Wright (1951) valores de F_{ST} que variam entre 0 a 0,05 indicam pouca diferenciação genética, 0,05 a 0,15 indicam moderada estruturação, 0,15 a 0,25 alto nível de estrutura populacional e valores maiores que 0,25 refletem um elevado nível de diferenciação entre populações comparadas. Logo, os valores de Φ_{st} indicam moderados níveis de diferenciação genética, significativos com valores $P < 0,0013$ e exibindo baixos números de migrantes entre essas localidades (Tabela XIII). Altos valores de migrantes foram observados entre as localidades da calha do Rio Amazonas quando comparadas aos sítios amostrados nos tributários amazônicos.

A inferência do número de possíveis populações existentes e o número de *clusters* mais verossímeis indica que o valor de $\Delta K = 3$ melhor reflete a realidade das amostras ($p = 21.416.455$). Contudo, os padrões apresentados no gráfico de barras do programa

STRUCTURE indica que as populações de *B.capapretum* são compostas por três grandes constituintes genéticos em panmixia (Figura 7).

Tabela XIII – Valores Φ_{st} par a par (valores inferiores) e número de migrantes (valores superiores) para *Brachyplatystoma capapretum* provenientes de nove localidades da Amazônia Brasileira.

	Belém	Santarém	Manaus	Tefé	Tabatinga	rio Branco	rio Japurá	rio Madeira	rio Purus
Belém		11,58469	298,79300	21,06251	<i>inf</i>	3,83333	<i>inf</i>	<i>inf</i>	18,90925
Santarém	0.04137		16,42312	<i>inf</i>	11,36151	12,50073	13,36322	28,50592	13,71274
Manaus	0.00167	0.02955		28,47113	<i>inf</i>	3,08436	120,38763	11,73721	26,85934
Tefé	0.02319	-0.00449	0.01726		14,84636	7,78030	22,02501	19,82802	16,62940
Tabatinga	-0.01572	0.04215	-0.01267	0.03258		2,92628	68,11623	12,20543	214,54898
rio Branco	0.11538*	0.03846	0.13949*	0.06038	0.14593*		2,67686	8,04966	4,35201
rio Japurá	-0.00102	0.03607	0.00414	0.02220	0.00729	0.15739*		19,77282	31,85949
rio Madeira	-0.00050	0.01724	0.04086	0.02460	0.03935	0.05848	0.02466		16,80490
rio Purus	0.02576	0.03518	0.01828	0.02919	0.00233	0.10305*	0.01545	0.02889	

*Valores significativos após correção de Bonferroni ($P < 0,0013$). *Inf* – Valores de fluxo que tendem ao infinito.

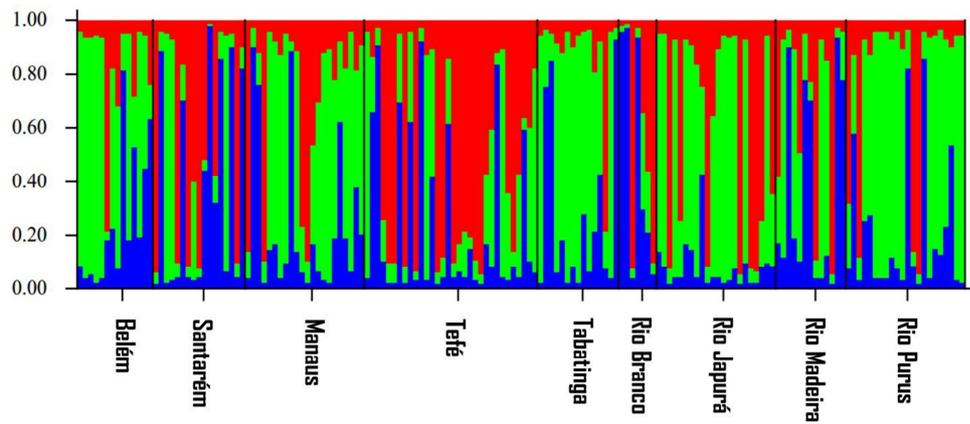


Figura 7 – Análise Bayesiana para estimativa de número de populações de *Brachyplatystoma capapretum*: gráfico de barras gerado pelo programa STRUCTURE.

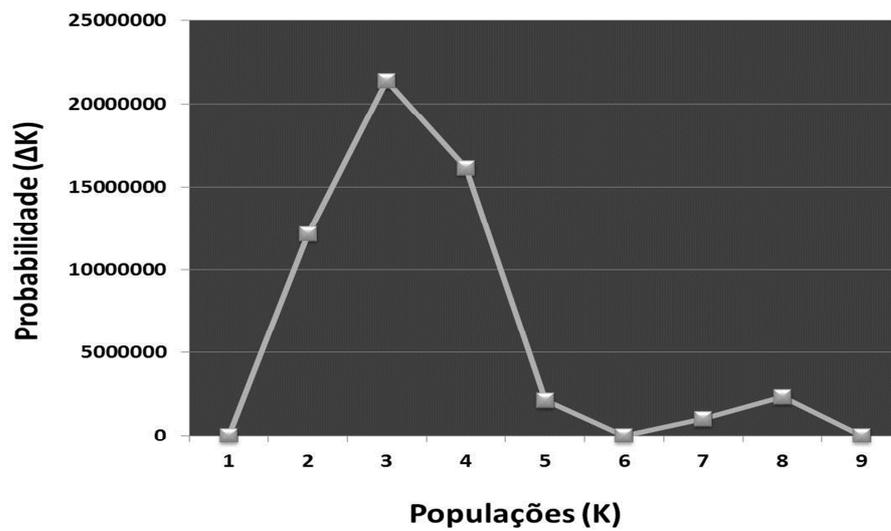


Figura 8 – Probabilidade estatística (ΔK) determinante para número de populações existente (K) com base no programa HAVESTER STRUCTURE.

Discussão

A extensão do fluxo gênico para espécies migradoras pode ser reduzida mediante a influência antrópica, como sobreexploração dos recursos naturais, desmatamento, depleção de cardumes-alvo e construção de hidrelétricas para fins energéticos (Santos 2008). Medir a diversidade genética dentro de grupos de organismos que exibem drásticos níveis de variação auxilia a manter a integridade populacional ou diagnosticar o grau de segregação entre as populações constituintes (Frankham *et al.*, 2004). Espécies como as do gênero *Brachyplatystoma* são comumente exploradas para fins comerciais, o que pode acarretar queda da diversidade genética desses recursos e redução de seus estoques naturais ao médio e longo prazo caso não haja medidas de conservação e manejo elaboradas em execução.

Das sete espécies de bagres que compõe este gênero, *Brachyplatystoma capapretum* seria a espécie com maiores deficiências de informações, vista a difícil identificação morfológica comparada com seu grupo irmão, *Brachyplatystoma filamentosum*. Embora Huergo *et al.* (2011) tenham apresentado o primeiro trabalho revelando os níveis de variabilidade de *B.capapretum* e *B.filamentosum*, associados às estimativas de captura, nenhuma descrição sobre estrutura populacional de *B.capapretum* é relatada na literatura.

O estado de panmixia é relatado para algumas espécies de peixes amazônicos (Galletti, 2009; Santos *et al.*, 2007; Batalha 2009; Machado 2009) e as variáveis ambientais são relatadas pelo fato de auxiliar na dispersão dessas espécies. Espécies de peixes migradores, como as do gênero *Brachyplatystoma*, comumente apresentam comportamento panmítico, devido as suas longas rotas reprodutivas. Para a dourada (*B.rouseauxii*) e piramutaba (*B.vaillantii*), estas representam um grande e único estoque dentro da bacia Amazônica, usando os tributários de

forma homogênea (Batista, 2010; Formiga-Aquino, 2004; Rodrigues, 2009). Porém, outros bagres do gênero apresentam padrões de dispersão diferenciados, como para o *B.filamentosum* (Huergo, 2009) e *B.platynemum* (Orrego, 2012). A piraíba (*B.filamentosum*) apresenta tendências de segregação por tipos de águas (escuras, claras e brancas), fazendo destas não apenas recursos abundantes, mas unidades de manejo diferenciadas nos rios amazônicos. Para o babão (*B.platynemum*), as peculiaridades do Rio Madeira parecem representar uma barreira ao fluxo gênico entre populações à Montante e à Jusante de suas cachoeiras. Assim foi proposta sua estrutura populacional baseada nessas estruturas geológicas.

Lundberg e Akama (2005) sugerem que a distribuição de *B.capapretum* abrange somente rios amazônicos de água branca e acima de cota altimétrica de 200m acima do nível do mar. Contudo alguns exemplares são encontrados em tributários de água preta e clara.

Identificação Molecular

O uso da região controle do DNA mitocondrial mostrou que este pode ser um marcador potencial para identificação de indivíduos. Os diferentes perfis gerados nos alinhamentos de 500 pb da região controle possibilitou a correta discriminação das amostras classificadas como *Brachyplatystoma* spp. Este pequeno sítio discriminante também foi utilizado por outros autores para identificação molecular de espécies de *Brachyplatystoma* (Batista e Alves-Gomes, 2006; Formiga-Akino, 2004; Rodrigues, 2009; Batista, 2010; Huergo *et al*, 2011; Orrego, 2012). Contudo, além da existência de um grande número de sítios discriminantes nesta região, a presença de vários outros sítios que ainda compartilham similaridades genéticas entre os *Brachyplatystoma* identificados, resultaram em um cladograma pouco resolutivo quando baseado no método *Neighbor Joining*.

As porcentagens relativas à identificação molecular revelam que a verdadeira composição de espécies capturadas como “piraíba” são compostas por cerca de 52,7% por *B.filamentosum*, 39,17% por *B.capapretum* e 8,13% por demais bagres pimelodídeos (*B.rousseauxii*, *B. platynemum* e *B. vaillantii*). Essas identificações baseadas em 194 amostras de *Brachyplatystoma. sp* apresentam proporções similares aos apresentados por Huergo *et al* (2011), ao relatarem que das 337 amostras comercializadas e identificadas também como “piraíba”, compunham aproximadamente 33% de exemplares de *B.capapretum* comercializadas como *B.filamentosum*, entre os anos de 1998 e 2008. Os menores valores observados para *B.capapretum* no presente trabalho, logo corroboram a hipótese desta espécie possuir uma menor cobertura populacional.

Variabilidade Genética (Dados Haplótipicos)

B.capapretum apresentou um total de 75 haplótipos, sendo 58 haplótipos únicos e 17 haplótipos compartilhados (Tabela II). A distribuição destes haplótipos foi abundante em quase toda porção da calha do Rio Amazonas. A numerosa distribuição desses haplótipos pode ser explicada pelo sentido da migração dessa espécie nos rios da Amazônia, onde possivelmente utilizam as porções das áreas estuarinas como berçários e a calha principal para acesso aos diversos tributários (Barthem e Goulding, 1998; Batista e Alves-Gomes, 2006).

A localidade do Rio Branco apresentou os menores números de haplótipos e haplótipos únicos. Esse resultado pode estar associado ao baixo tamanho amostral obtido. Dentre os 17 haplótipos compartilhados, sete encontram-se em regiões estuarinas (Belém) e oito em regiões nas proximidades ao estuário (Santarém). De forma geral, a frequência de haplótipos compartilhados é similar nas demais localidades, com pelo menos sete alelos

compartilhados por localidade. Tefé e o Rio Japurá apresentaram os maiores valores de haplótipos únicos (**HU**). Esses índices de diversidade são indicativos de que essas localidades agregam alto nível de miscigenação entre os indivíduos de piraíba negra.

Dentre os integrantes do gênero *Brachyplatystoma*, os menores índices de diversidade genética proporcionalmente foram observados para *B.capapretum*. Em contraste aos dados obtidos de Huergo *et al* (2011), o número de haplótipos (**H**) e a diversidade haplotípica (**HD**) obtiveram discretos aumentos, muito provavelmente devido ao número amostral. Contudo outros valores de diversidade genética, como a diversidade nucleotídica (π), apontam a delicada situação de *B.capapretum* diante das demais espécies do gênero.

Segundo Machado *et al* (2008), pelo menos sete espécies de água doce brasileiras são apontadas como pertencentes a classe de peixes ameaçados de sobreexploração, como: o pirarucu (*Arapaima gigas*), tambaqui (*Colossoma macropomum*), o jaraqui (*Semaprochilodus taeniurus* e *Semaprochilodus insignis*) a piramutaba (*Brachyplatystoma vailantii*), a dourada (*Brachyplatystoma rosseauxii*) e o jaú (*Zungaro zungaro*). Quanto aos índices de diversidade nucleotídica (π) observados em um panorama global, indicam valores similares aos de espécies vulneráveis, largamente citadas por listas protetoras da fauna ameaçada (Tabela XIV) (Fergusson *et al* (2009); Machado *et al* (2008)).

Ainda em uma diagnose dos dados de diversidade entre localidades para *B.capapretum*, os altos valores de haplótipos (**H**) e diversidade nucleotídica (π) observados na calha do rio Amazonas, no rio Japurá e em Tefé pode não apenas estar associado ao maior número de exemplares, mas aos perfis de distribuições para a espécie. Segundo Batista (2010), a dourada (*B.rousseauxii*) apresenta uma grande diversidade a montante da região de

Tefé, onde indivíduos maiores são comumente encontrados. Este perfil de distribuição indica que indivíduos maiores passam a residir nestas regiões para alimentação, pelo menos após sua primeira desova (2 anos de idade). Poucos indivíduos de dourada menores que 80 cm são encontrados fora das regiões estuarinas, reforçando a ideia de poucos representantes retornarem ao estuário em um novo ciclo reprodutivo (Alonso 2002).

De acordo com as médias furcais obtidas durante a captura dos exemplares de *B.capapretum*, indivíduos menores que 70 cm são comumente encontrados nos tributários. Os maiores exemplares de filhote foram observados nos rios Japurá, Juruá (dados não amostrados no estudo populacional) e na porção de Tabatinga, todos com médias maiores de que 100 cm. A proximidade nos comportamentos reprodutivos entre estas espécies de bagres sugere uma distribuição similar de *B.capapretum* nas localidades a Jusante de Tefé. A alta diversidade haplotípica também observada nas regiões do estuário (Belém e Santarém) reforça a ideia destas áreas serem abrigo para juvenis e pré-adultos, compondo provavelmente indivíduos de 2 a 3 anos de idade oriundos de diversos tributários (Batista e Alves-Gomes, 2006; Barthem e Goulding, 2007).

Variabilidade Genética (Dados Microsatélites)

Para melhor caracterizar geneticamente as populações naturais de *B.capapretum* oriundas de nove localidades, oito locos microsatélites foram selecionados com base em sua eficiência de amplificação, número de alelos e perfil de genotipagem (Capítulo I). Alelos nulos foram sugeridos para dois locos (BC 18 e BC 30). Entretanto, apenas em poucas localidades foram sugeridos a presença deste déficit (Santarém, Tefé e Japurá), não comprometendo as análises posteriores. Alelos nulos são caracterizados como a ineficiência

da amplificação de um dos alelos em um dado sítio, quando este sofre algum tipo de mutação na região de anelamento dos *primers* (Wagner *et al*, 2006). Como a presença de alelos nulos pode afetar diretamente na presença de heterozigotos no banco de dados, provavelmente os desvios no equilíbrio de Hardy-Weinberg podem ser atribuídos a este fator limitante.

Entre os oito locos analisados, foram observados 73 alelos totais sendo 21 exclusivos. A estimativa de alelos exclusivos pode ser utilizada indiretamente para inferir fluxo gênico entre localidades, onde as mais estruturadas tendem a ter um maior número desses alelos por mutações. Este pressuposto é corroborado pelas análises posteriores de estrutura populacional, na qual apontou o rio Branco com um maior número de alelos exclusivos (7 alelos). Os índices de diversidade genética em *B.capapretum*, baseado em locos microssatélites exibem os menores valores quando comparado a outros Siluriformes sobreexplotados, sendo apenas maiores que em *B.platynemum*, no qual um menor número de locos microssatélites heterólogos foi utilizado. Espécies extensamente comercializadas, ou com algum risco de vulnerabilidade dentro dos critérios das listas de espécies ameaçadas geralmente exibem baixos valores de A_R , critério utilizado para mensurar a diversidade genética entre espécies (Caballero *et al*, 2010). *B. capapretum*, portanto revela em seus locos microssatélites uma baixa variabilidade ($A_R = 4,91$) (Tabela XV).

Estrutura populacional (Dados Haplotípicos)

Os valores negativos e não significativos do teste de neutralidade D de Tajima sugerem que a região controle do DNAm_t nas populações de *B.capapretum* evoluem sem pressões seletivas. Contudo, os valores significativos para o teste de expansão de Fu indicam que todas as localidades, com exceção do rio Branco, passam por uma expansão populacional

recente. Enquanto que o teste D de Tajima compara valores entre os sítios polimórficos e diversidade nucleotídica (Tajima, 1989), o teste F_s de Fu (Fu, 1997) baseia-se em estimativas de θ (theta) para inferir a diversidade genética. Valores negativos podem ser interpretados como excesso de mutações, característico em populações em expansão. Logo, populações com um rápido crescimento populacional tendem ao maior acúmulo de mutações (Rogers e Harpending, 1992).

As diferenças nucleotídicas par a par (*mismatch distribution*) foram utilizadas para contrastar os dados de expansão observados no teste F_s de Fu. Considerando todas as localidades, o perfil do gráfico para as diferenças nucleotídicas indica que de forma conjunta, todas as localidades passam por uma estabilidade populacional. Contudo, apenas os gráficos da localidade do Rio Madeira e Rio Purus apresentam padrões unimodais, indicando expansão populacional. Obviamente, este padrão pouco resolutivo entre as análises pode ser explicado pela quantidade de localidades amostradas, onde não se observa um único padrão entre estas. Padrões similares foram observados na análise populacional do tambaqui (*Colossoma macropomum*) onde a Bacia Amazônica e a Bacia Boliviana obtiveram padrões opostos quando analisadas separadamente (Santos 2009).

O teste hierárquico da Análise da Variância Molecular (AMOVA) foi utilizado para testar a panmixia entre todas as localidades ou a significância dos tributários em relação à diversidade genética total de *B. capapretum*. Análises *a priori* indicaram que uma maior parcela da diversidade genética observada em *B. capapretum* está contida dentro das localidades (96,58%), e uma pequena fração entre as localidades (3,42%). Os agrupamentos mais significativos foram compostos por dois tributários da margem direita do rio Amazonas (rio Purus e rio Madeira). O registro de um baixo número de migrantes nessas localidades

corroborar esses agrupamentos. As estimativas de Φ_{st} (análogo ao F_{ST}) indicam que o rio Purus apresenta um alto grau de estruturação com relação às localidades de Santarém e Tabatinga (F_{ST} 0,1697 e 0,2025).

Contudo, a análise Bayesiana do programa BAPS 5.3 sobre o possível número de populações obtida a partir da matriz de dados das 186 sequências, indica a presença de três grandes *clusters* que compartilham material genético dentro das nove localidades amostradas. Nos padrões da árvore de haplótipos e nas análises utilizando oito locos microssatélites polimórficos também pode ser observado três grandes agrupamentos compostos por indivíduos de todas as localidades. Esses constituintes genéticos podem ser compostos por indivíduos de diferentes “coortes” ou faixas etárias, movendo-se em períodos temporais diferentes durante a migração. Se uma grande porção dos reprodutores de *B.capapretum* maiores que 65 cm realmente não voltam ao tributário amazônico, esses três grandes agrupamentos podem ser explicados pela formação de três coortes, que ao longo do tempo foram miscigenadas pelas larvas oriundas destas mesmas cortes. Ao retornarem ao estuário e alcançarem a idade reprodutiva, possivelmente podem se dispersar de forma aleatória em outros tributários, quando aptas ao recrutamento.

Estrutura populacional (Microssatélites)

Os níveis de diversidade genética em *B.capapretum*, relativo a oito locos microssatélites revelaram agrupamentos significativos o quais não foram discriminados pela região controle. Diferentes níveis de estrutura populacional podem ser revelados com base nas taxas mutacionais entre marcadores diferentes. Enquanto a região controle possui taxas evolutivas 4 à 5 vezes maior as demais regiões do genoma mitocondrial, regiões

microssatélites apresentam taxas mutacionais variando entre 10^{-2} e 10^{-6} (Tarbelet, 1996; Ferreira e Grattapaglia, 1998). O perfil de herança inerente a essas regiões também pode influenciar nas resoluções obtidas. Heranças exclusivamente maternas podem comumente mascarar estruturas populacionais, “solubilizando” os níveis de variabilidade genética. Em contrapartida, microssatélites possuem herança codominante, fornecendo um maior conteúdo informativo por loco gênico analisado.

Keeney (2005) estimou a estrutura genética do tubarão (*Carcharhinus limbatus*) em berçários continentais do noroeste do Oceano Atlântico, Golfo do México e Caribe pelo uso da região controle do DNA mitocondrial e oito locos microssatélites evidenciando clara estruturação por ambos os marcadores em nove berçários. Diferenciações decorrentes por microssatélites foram limitadas em regiões do Golfo do México devido a altos níveis de homogeneidade genética. Para populações de espécies migradoras, como os bagres amazônicos, abordagens com múltiplos marcadores podem auxiliar e ampliar a visão sobre a dispersão desses organismos nas diversificadas bacias. Heyden, *et al* (2010) verificou a baixa variabilidade da região controle do DNA mitocondrial em grupos de peixes *Merluccius paradoxus* coletados em várias localidades da África Austral e África do Sul, observando uma fraca estrutura populacional e reconhecendo a necessidade do uso de marcadores com evolução mais rápida, como os marcadores microssatélites.

Nas análises de grupos hierárquicos significativos (AMOVA), além da maior parte da variação genética estar presente dentro das localidades e minoritariamente entre estas, agrupamentos significantes entre o Rio Branco e os demais pontos de coleta foram identificados. Um total de 11,49% da variabilidade genética compunha esse arranjo. Baseados na significância estatística de Φ_{st} , moderados níveis de estruturação também foram

evidenciados entre o Rio Branco e as localidades de Belém, Manaus, Tabatinga, Rio Japurá e Rio Purus, assim como um baixo número de migrantes (Nm). O gráfico de barras do STRUCTURE 2.2 revela novamente que o número de *clusters* mais verossímil seria igual a três, apontando para a probabilidade de todos os indivíduos compartilharem material genético.

Distribuição

O estado de panmixia pode ser apontado para *B.capapretum*, contudo é incontestável também a importância de três grandes tributários amazônicos para manutenção da diversidade desta espécie migradora. O atual perfil de distribuição de *B.capapretum*, pode estar associado às graduais mudanças geológicas que os sistemas hídricos sofreram no passado. O gênero *Brachyplatystoma* possui ampla distribuição nos canais de rios Amazônicos, abrangendo a bacia do Orinoco, Bacia Amazônica e bacias hidrográficas das Guianas (Barthem e Goulding, 2007). Nenhum registro fóssil confirma a presença dos *Brachyplatystoma* a oeste ou norte dos Andes. O subgênero *Malacobagrus*, que abrange as espécies mais exploradas de bagres migradores, *Brachyplatystoma vaillantii* (dourada), *Brachyplatystoma filamentosum* (piraíba) e *Brachyplatystoma capapretum* (piraíba negra), datam de 12,8 a 13 milhões de anos, juntamente com uma antiga espécie extinta de bagre denominado *Brachyplatystoma promagdalenae* (Lundberg, 2005).

Uma suposta rota marítima mantinha as bacias Amazônica, Orinoco e Paraná-Paraguai interconectadas (Carolsfeld *et al*, 2003). No final do Mioceno (10-3,5 M.A) o soergimento dos Andes deu fim às incursões marinhas, isolando o mar do Caribe e o oceano Pacífico do resto da porção noroeste da Amazônia (Hoorn *et al*, 2010). Um grande sistema lacustre pode ter sido formado até o Plioceno (5,2 M.A), tornando possível o contato entre diversas espécies

de peixes, muitas de origem marinha (Marroig e Cerqueira, 1997). Outras áreas da Amazônia também puderam ser cobertas pelas diversas incursões marinhas devido ao aumento no nível do mar no Pleistoceno (1,7 M.A) e o atual sentido do rio Amazonas estabelecido com o fraturamento do arco tectônico do Purus há oito milhões de anos (Lundberg *et al*, 1998).

Posteriormente, mudanças extremas nessa paisagem podem ter limitado a distribuição de muitas comunidades biológicas, inclusive as populações de *B.capapretum*, de um grande ambiente lacustre para áreas fluviais mais limitadas. Apesar das escassas informações sobre o período relativo à diferenciação entre *B.filamentosum* e *B.capapretum* e dificuldades para calibração do relógio molecular, um ancestral comum pode ter se distribuído amplamente no que antes seria um proto-Solimões. Em consequência disso, *B.capapretum* teria sua abrangência parcialmente restrita a rios de águas brancas e *B.filamentosum* expandir-se-ia posteriormente em rios de água clara e preta.

Outra explicação para a moderada estruturação observada em *B.capapretum* está contida na origem dos sedimentos carregados por estes rios. Os agrupamentos significativos apontados pelos marcadores moleculares no rio Purus, rio Madeira e rio Branco carregam sedimentos oriundos de estruturas geológicas distintas. O rio Branco (584 km) é o maior afluente do rio Negro e carrega sedimentos oriundos dos escudos cratônicos das Guianas. Por este motivo é erroneamente classificado por ser constituído por águas “semi-brancas”. Contudo, em períodos de seca, poucos sedimentos são carregados, apresentando baixos teores de nutrientes. Suas propriedades químicas aproximam-se mais dos rios de água clara, sendo assim classificado (Junk *et al*, 2011).

Os cardumes migradores de *B.capapretum* tendem a transpor uma extensa parcela de água preta proveniente do rio Negro (aproximadamente 300 km), antes de acessar as águas claras do rio Branco. Esse “conflito” na transposição em tipos de água quimicamente diferentes pode fazer com que apenas pequenos cardumes mais seletos de *B.capapretum* acessem essas localidades. Em contrapartida, os sedimentos andinos em suspensão que se depositam em grande volume no rio Purus e rio Madeira (Filizola e Guyot, 2011; Rios-Villamizar, 2013), fazem destes tributários, uma sutil preferência na rota de migração para alguns indivíduos destes bagres. De fato, poucos indivíduos de *B.capapretum* são encontrados nas porções do médio e alto rio Negro ou em outros tributários de água clara.

Medidas de Manejo para *Brachyplatystoma capapretum*

A União Internacional para Conservação da Natureza (IUCN) reconhece a diversidade genética como um dos fatores chave para manutenção da biodiversidade no planeta, assim como a manutenção dos processos ecológicos e o uso sustentável da diversidade de espécies e ecossistemas. A caracterização genética e resolução de incertezas taxonômicas são as primeiras etapas na adoção de planos de manejo em espécies ameaçadas. Assim, populações naturais caracterizadas geneticamente são comumente delimitadas dentro de unidades de manejo. Conforme são designados os níveis hierárquicos de uma população e suas significâncias na variabilidade da espécie, mas obsoletos os conceitos se apresentam. Contudo alguns conceitos são difundidos na literatura para designar populações para unidades de manejo como; Entidades Biologicamente Significativas (EBS), Unidades Evolutivas Significativas (ESU), Unidades de Conservação (CU) e Unidades de Gestão (MU), (Ryder, 1986; Moritz 1999; Crandall *et al*, 2000; Frankham, 2008; Funk *et al*, 2012).

Delimitação de planos de manejo para espécies migradoras como as do gênero *Brachyplatystoma* torna-se uma tarefa complexa, uma vez que esses organismos distribuem-se em habitats diversificados (várzea, igapós, tributários e a calha principal), em espaços temporais distintos (cheia e vazante) e entre países fronteiriços (Bacia Amazônica e Orinoco, Paraná-Paraguai) (Barthem e Goulding, 1997; Barthem e Goulding, 2007; Fabré e Barthem, 2005).

O status sobre a estrutura genética e distribuições de *B.capapretum* até o presente estudo era desconhecido. As análises de diversidade genética apontam que dentro do subgênero *Malacobagrus*, constituinte de *Brachyplatystoma*, *B.capapretum* apresenta os menores índices de variabilidade. Com base nos dados de estrutura populacional, é razoável interpretar que *B.capapretum* apresenta uma grande e única população migradora, com baixa densidade de indivíduos. Contudo, dentro de sua área de abrangência os tributários amazônicos devem ser tratados de forma diferenciada em um futuro plano de manejo para a referida espécie. Em particular, o rio Branco, o rio Purus e o rio Madeira agregam indivíduos com importantes componentes genéticos na manutenção do estoque como um todo.

Sua importância comercial continua significativa, porém o efeito da pesca sobre sua densidade populacional ainda não pode ser mensurado, em vista que esta espécie compartilha sua pesca com *B.filamentosum* e nenhum esforço de discriminação é adotado no levantamento dos dados de estatística pesqueira. O alerta de sobrepesca para *B. filamentosum* sugerido por Petreire Jr *et al* (2004) repercute no futuro das populações naturais de *B.capapretum*, em vista que tecnicamente não se conhece verdadeiramente em qual das duas espécies é exercida maior pressão das frotas pesqueiras.

Outros fatores como a depleção dos recursos nos nichos utilizados por *B.capapretum*, a queda no número de presas para esta espécie e a competição natural no forrageamento entre *B. capapretum* e *B. filamentosum*, são variáveis que devem ser consideradas na adoção de medidas conservacionistas. A estrutura e a diversidade genética revelada neste trabalho representam o marco inicial para comparações futuras dos níveis de variabilidade não só em *B.capapretum*, mas também em futuros trabalhos envolvendo as demais espécies do gênero *Brachyplatystoma*.

Tabela XIV – Lista de peixes mundialmente comercializados segundo grau de significância e parâmetros de diversidade genética da região controle do DNAm. N- número amostral, H- número de haplótipos, HD- diversidade haplotípica, HU- haplótipos únicos, S- sítios polimórficos e PI (π)- diversidade nucleotídica.

Grau de significância	Organismo	Nome popular	N	Tamanho (pb)	H	HD	HU	S	PI (π)	Autor
Siluriformes sobreplotados	<i>Tandanus tandanus</i>	Peixe cauda de enguia	240	408	26	0,842	25	36	0,0210	Rourke e Gilligan (2010)
	<i>Brachyplatystoma vaillantii</i>	Pirurutaba	100	942	92	0,999	87	58	0,0159	Formiga-Akino (2004)
	<i>Brachyplatystoma vaillantii</i>	Pirurutaba	149	942	141	0,997	134	64	0,0137	Rodrigues (2009)
	<i>Brachyplatystoma filamentosum</i>	Piraíba	225	914	130	0,987	96	68	0,0118	Huergo <i>et al</i> , 2011
	<i>Brachyplatystoma capapretum</i>	Piraíba negra	112	913	53	0,951	40	34	0,0041	Huergo <i>et al</i> , 2011
	<i>Brachyplatystoma rouseauxii</i>	Dourada	45	1037	31	0,933	27	54	0,0079	Batista e Alves-Gomes (2006)
	<i>Brachyplatystoma rouseauxii</i>	Dourada	652	911	301	0,979	240	134	0,0089	Batista (2010)
	<i>Brachyplatystoma platynemum</i>	Babão	216	663	66	0,915	47	45	0,0076	Orrego (2012)
	<i>Brachyplatystoma capapretum</i>	Piraíba negra	186	914	75	0,939	58	45	0,0034	Presente estudo
Espécies em sobrepesca	<i>Arapaima gigas</i>	Pirarucu	139	1204	34	-	-	44	-	Hrebek <i>et al</i> (2005)
	<i>Colossoma macropomum</i>	Tambaqui	45	1077	44	0,999	43	72	0,0120	Santos <i>et al</i> (2007)
	<i>Colossoma macropomum</i>	Tambaqui	537	1561	444	0,998	400	228	0,0124	Santos (2009)
	<i>Semaprochilodus insignis</i>	Jaraqui escama grossa	249	1148	121	0,961	43	125	0,0119	Batalha (2009)
Espécies ameaçadas	<i>Cetorhinus maximus</i>	Tubarão elefante	62	550	6	0,720	-	-	0,0013	Hoelzel <i>et al</i> (2006)
	<i>Carcharodon carcharias</i>	Tubarão branco	94	842	31	0,877	14	51	0,0085	Blower <i>et al</i> (2012)
	<i>Galeorhinus galeus</i>	Tubarão-vitamínico	116	1068	38	0,920	37	36	0,0071	Chabot e Allen (2009)

Tabela XV – Lista de peixes mundialmente comercializados segundo grau de significância e parâmetros de diversidade genética em locos microssatélites. N- número amostral, A_R-riqueza alélica, H_O- Heterozigosidade observada, H_E- Heterozigosidade esperada.

Grau de significância	Organismo	Nome popular	N	Locos	A _R	H _O	H _E	Autor
Siluriformes sobreexplotados	<i>Tandanus tandanus</i>	Peixe cauda de enguia	821	8	3,78	0,55	0,57	Rourke e Gillian (2010)
	<i>Pseudoplatystoma corruscans</i>	Pintado	223	7	8,83	0,56	0,7	Pereira <i>et al</i> (2009)
	<i>Pseudoplatystoma reticulatum</i>	Cachara	52	7	4,91	0,33	0,49	Abreu <i>et al</i> (2009)
	<i>Brachyplatystoma vaillantii</i>	Piramutaba	161	6	9,208	0,78	0,75	Rodrigues <i>et al</i> (2009)
	<i>Brachyplatystoma rouseauxii</i>	Dourada	483	8	11,3	0,59	0,61	Batista (2010)
	<i>Brachyplatystoma platynemum</i>	Babão	169	6	4,21	0,42	0,49	Orrego (2012)
	<i>Brachyplatystoma capapretum</i>	Piraíba negra	164	8	4,31	0,43	0,45	Presente estudo
Espécies sobreexplotadas	<i>Arapaima gigas</i>	Pirarucu	561	7	4,3	0,65	0,56	Araipe <i>et al</i> (2013)
	<i>Colossoma macropomum</i>	Tambaqui	604	12	21,41	0,72	0,77	Santos (2009)
	<i>Paracheirodon axelrodi</i>	Cardinal	294	6	7,7	0,66	0,73	Assunção (2006)
	<i>Piaractus mesopotamicus</i>	Pacu	60	6	3,58	0,61	0,55	Povh <i>et al</i> (2011)
	<i>Symphysodon spp</i>	Acará	336	11	50,04	0,43	0,46	Amado (2008)
	<i>Brycon insignis</i>	Piabanha	208	5	7,18	0,85	0,78	Matsumoto e Hilsdorf (2009)
Espécies ameaçadas	<i>Carcharodon carcharias</i>	Tubarão branco	97	6	7,16	0,67	0,68	Blower <i>et al</i> (2012)
	<i>Galaxiella pusilla</i>	Eastern Dwarf Galaxias	198	11	2,9	0,4	0,39	Coleman <i>et al</i> (2010)
	<i>Aplochiton taeniatus</i>	Aplochiton	456	13	11	0,37	0,511	Vanhaecke <i>et al</i> (2012)

Conclusões gerais

- ❖ Para estimar a variabilidade genética de *B.capapretum*, o referido trabalho disponibilizou um kit biotecnológico na forma de 24 *locos* microssatélites (Capítulo I).
- ❖ A amplificação heteróloga resultou em 22 *locos* amplificados e polimórficos em pelo menos uma espécie do gênero *Brachyplatystoma*.
- ❖ Inesperadamente, os três *locos* monomórficos para *B.capapretum* (BC17, BC31 e BC34) mostraram-se polimórficos em quase todas as espécies do gênero *Brachyplatystoma*.
- ❖ Com base na região controle do DNAm_t (186 indivíduos com 914 pb) e oito *locos* microssatélites (164 indivíduos), foi possível revelar a atual variabilidade genética da espécie, assim como o atual perfil de sua distribuição nos rios Amazônicos Brasileiros.
- ❖ Nenhuma correlação entre distância genética e distância geográfica foi observada, assim como um alto número de migrantes foi detectado entre as localidades da calha do rio Amazonas.
- ❖ Com base na região controle do DNAm_t foi evidenciada uma tendência de estrutura genética entre as demais localidades e os tributários da margem direita amostrados (rio Purus e rio Madeira), assim como um baixo número de migrantes e valores significativos na AMOVA (Análise da Variância Molecular).
- ❖ Um agrupamento segregante foi observado em um tributário da margem esquerda do rio Amazonas (Rio Branco), evidenciado apenas pelos marcadores microssatélites.
- ❖ A piraiíba preta (*Brachyplatystoma capapretum*) representa um único estoque panmítico nos rios Amazônicos, com tendências de agregação em tributários da margem direita (Rio Madeira e Rio Purus) e tributários da margem esquerda (Rio Branco), provavelmente utilizados para reprodução e alimentação.

Referências Bibliográficas

ABREU, M. M; PEREIRA, L. H. G; VILA, V. B; FORESTI, F; OLIVEIRA, C. 2009. *Genetic variability of two populations of Pseudoplatystoma reticulatum from the Upper Paraguay River Basin*. Genetics and Molecular Biology, v. 32, n. 4. p. 868-873.

AGUIRRE, L. F. *et al.* 2009. *Libro rojo de la fauna silvestre de vertebrados de Bolivia*. Ministerio de Medio Ambiente y Agua. La Paz. Bolivia. p. 571.

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

AMADO, M.V; HRBEK, T; GRAVENA, W; FANTIN, C; ASSUNÇÃO, E.N.D; ASTOLFI-FILHO, S; FARIAS, I.P. 2008. *Isolation and characterization of microsatellite markers for the ornamental discus fish (Symphysodon discus) and cross-species amplification in other Heroini cichlid species*. Molecular Ecology Resources, p. 1451-1453.

ANGELINI, R; FABRÉ, N. N; SILVA-RJ, U. L. 2006. *Trophic analysis and fishing simulation of the biggest Amazonian catfish*. African Journal of Agricultural Research. v.1. n. 5. p. 151-158.

ARAIPE, J; RÊGO, P. S; QUEIROZ, H; SAMPAIO, I; SCHNEIDER, H. 2013. *Dispersal Capacity and Genetic Structure of Arapaima gigas on Different Geographic Scales Using Microsatellite Markers*. Plos. One. v. 8.

ARCOT, S. S; WANG, Z; WEBER, J. L; DEINIGER, P. L; BATZER, M. A. 1995. *Alu Repeats: A Source of the Genesis of Primate Microsatellites*. Genomics. v. 29. p. 136-144.

ASSUNÇÃO, A. A. A. 2007. *Estudo da variabilidade genética do cardinal (OSTARIOPHYSI: CHARACIFORMES: Paracheirodon axelrodi) na bacia do Rio Negro*.

Dissertação de mestrado. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia/ Universidade Federal do Amazonas. p 67.

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

BARLETTA, M. *et al.* 2010. *Fish and aquatic habitat conservation in South America: a continental overview with emphasis on neotropical systems*. The Fisheries Society of the British Isles. v.76. p. 2118–2176.

BARROS, J. F; RIBEIRO, M. O. A. 2005. *Aspectos sociais e conhecimento ecológico tradicional na pesca de bagres*. In: FABRÉ, N. N; BARTHEM, R. B. *O manejo da pesca dos bagres migradores: Piramutaba e Dourada no Eixo Solimões-Amazonas*. Ibama. Pro Várzea. Manaus. Amazonas. p 114.

BARTHEM, R. B; FABRÉ, N. N. 2003. *A pesca e os recursos pesqueiros na Amazônia*. Provárzea. Ibama. Manaus. Amazonas. p. 269.

BARTHEM, R; GOULDING, M. 1997. *Os Bagres Balizadores: Ecologia, Migração e Conservação de Peixes Amazônicos*. Sociedade Civil Mamirauá, MCT, CNPq, IPAAM. Brasília. Brazil. p. 140.

BARTHEM, R; GOULDING, M. 2007. *Um ecossistema inesperado : A Amazônia revelada pela pesca*. Sociedade Civil do Mamirauá. Brasília. p. 2410.

BATALHA, K.P. 2009. *Genética populacional do jaraqui de escama grossa (Semaprochilodus insignis - Prochilodontidae, Characiformes)*. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Amazonas. Manaus. p. 57.

BATISTA, J. S. 2010. *Caracterização genética da dourada - Brachyplatystoma rousseauxii, Castelnau, 1855 (Siluriformes: Pimelodidae) na Amazônia por meio de marcadores moleculares mitocondriais e microssatélites: subsídios para conservação e manejo*. Tese de Doutorado. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia. Manaus. Amazonas. Brasil. p. 148.

BATISTA, J.S; ALVES-GOMES, J.A. 2006. *Phylogeography of Brachyplatystoma rousseauxii (Siluriformes - Pimelodidae) in the Amazon Basin offers preliminary evidence for the first case of “homing” for an Amazonian migratory catfish.* Genetics and Molecular Research. v. 5. n. 4. p.723-740.

BEHEREGARAY, L.B.; PIGGOTT, M.; CHAO, N.L.; CACCONE, A. 2006. *Development and characterization of microsatellite markers for the Amazonian blackwing hatchetfish, (Carnegiella marthae) (Teleostei, Gasteropelecidae).* Molecular Ecology Notes. p. 787-788.

BHARGAVA, M; SHARMA, A. 2013. *DNA barcoding in plants: Evolution and applications of in silico approaches and resources.* Molecular Phylogenetics and Evolution. v. 67. p. 631-641.

BILLOTTE, N; LAGODA, P; RISTERUCCI, A; BAURENS, F. 1999. *Microsatellite-enriched libraries: applied methodology for the development of SSR markers in tropical crops.* Fruits. n. 54. p. 277-288.

BLOWER, D. C; PANDOLFI, J, M; BRUCE, B. D; GOMEZ-CABRERA, M. C; OVENDEN, J. R. 2012. *Population genetics of Australian white sharks reveals fine-scale spatial structure, transoceanic dispersal events and low effective population sizes.* Mar. Ecol. Prog. Ser. v. 455. p. 229-244.

BOHLKE, J.E; WEITZMAN, S.H. e MENEZES, N.A. 1978. *Estado atual da sistemática dos peixes de água doce da América do Sul.* Acta Amazonica. v. 8. p. 657-678.

BONI, T. A. 2008. *Comparação Molecular de Populações Naturais de Jaú (Zungaro) (Pisces, Siluriformes, Pimelodidae) das Bacias Amazônicas e do Paraná-Paraguai.* Tese de Doutorado. Universidade Estadual de Maringá. Paraná. Brasil. p 59.

BOORE, J. L. 1999. *Animal Mitochondrial Genomes.* Nucleic Acids Research. v.27. n.8.

BOTSTEIN, D. *et al.* 1980. *Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms.* Am. J. Hum. Genet. v. 32. p. 314–331.

- BRODANI, R.P.V; BRODANI, C; GRATTAPLAGIA, D. 2007. *Manual prático para o desenvolvimento de marcadores microssatélites em plantas*. Embrapa. Brasília, DF. p 9-12.
- BROWN, J. R; BECKENBACH, A. T; SMITH, M. J. 1992. *Mitochondrial DNA Length Variation and Heteroplasmy in Populations of White Sturgeon (Acipenser transmontanus)*. Genetics Society of America. v. 132. p. 221-228.
- BROWN, W. M; GEORGE Jr, M; WILSON, A. C. 1979. *Rapid evolution of Animal mitochondrial DNA*. Proc. Natl. v. 76. n. 4. p. 1967-1971.
- CABALLERO, A; RODRÍGUEZ-RAMILO, S. T; ÁVILA, V; FERNADÉZ, J. 2010. Management of genetic diversity of subdivided populations in conservation programmes. Conservation Genetics. v. 11. p. 409-419.
- CAROLSFELD, J; HARVEY, B; ROSS, C; BAER, A. 2003. *Migratory Fishes of South America*. The International Bank for Reconstruction and Development/ The World Bank. Ottawa. Ontario. Canada.
- CARRILLO-AVILA, M.; RESENDE, E.; MARQUES, D.; GALETTI, P. 2009. *Isolation and characterization of polymorphic microsatellites in the threatened catfish Jaú, Zungaro jahu (Siluriformes, Pimelodidae)*. Conservation Genetics. p. 1597-1599.
- CARVALHO, D. C; OLIVEIRA, A. A; SAMPAIO, I; BEHEREGARAY, L. 2009. *Microsatellite markers for the Amazon peacock bass (Cichla piquiti)*. Molecular Ecology Resources. n. 9. p. 239–241.
- CASTRESANA, J. 2001. *Cytochrome b Phylogeny and the Taxonomy of Great Apes and Mammals*. Mol. Biol. Evol. v. 18. n. 4. p. 465-471.
- CASTRO PAZ, F. P. 2012. *Identificação molecular (DNA barcode) das espécies de Hyphessobrycon Durbin (Characiformes: Characidae) do sistema Solimões-Amazonas*. Dissertação de Mestrado. Manaus. Amazonas. Brasil. p. 41.

- CHABOT, C. L; ALLEN, L. G. 2009. *Global population structure of the tope (Galeorhinus galeus) inferred by mitochondrial control region sequence data*. *Molecular Ecology*. v. 18. n. 545-552.
- COLEMAN, R. A; PETTIGROVE, V; RAADIK, T. A; HOFFMANN, A. A; MILLER, A. D; CAREW, M. E. 2010. *Microsatellite markers and mtDNA data indicate two distinct groups in dwarf galaxias, Galaxiella pusilla (Mack) (Pisces: Galaxiidae), a threatened freshwater fish from south-eastern Australia*. *Conserv Genet*. v.11. p.1911–1928.
- CORANDER, J; MARTTINEN, P; SIRÉN, J; TANG, J. 2008. *Enhanced Bayesian modelling in BAPS software for learning genetic structures of populations*. *BMC Bioinformatics*. v. 9. p. 539.
- 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*. v. 65. n.10. p. 859-868.
- CRANDALL, K. A; BININDA-EMONDS, O. R. P; MACE, G. M; WAYNE, R. K. 2000. *Considering evolutionary processes in conservation biology*. *Tree*. v. 15. n. 7. p. 290-295.
- CROW, J. F; KIMURA, M. 1970. *An introduction to population genetics theory*. Harper & Row, New York. p. 656.
- CSINK, A. K; HENIKOFF, S. 1998. *Something from nothing: the evolution and utility of satellite repeats*. *Trends Genet*. v. 14. n. 5. p. 200-204.
- DARKIN, E. E; AVISE, J. C. 2004. *Microsatellite null alleles in parentage analysis*. *Heredity*. p. 504-509.
- DARRIBA, D; TABOADA, G, L; DOALLO, R; POSADA, D. 2012. *jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing*. *Nature Methods*. v. 9. n. 8. p. 772.

- DI RIENZO, A; PETERSON, A.C; GARZA, J.C; VALDES, A.M; SLATKIN, M; FREIMER, N.B. 1994. *Mutational processes of simple-sequence repeat loci in human populations*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. v. 91. p.3166-3170.
- DORIA, C. R. C; RUFINO, M. L; HIJAZI, N. C; CRUZ, R. L. 2012. *A pesca comercial na bacia do rio Madeira no estado de Rondônia, Amazônia Brasileira*. Acta Amazonica. v. 42. p. 29-40.
- DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. 1990. *Isolation of plants DNA from fresh tissue*. Focus. n. 13. p. 13-15.
- EARL, D. A; VONHOLDT, B. M. 2012. *STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method*. Conservation Genetics Resources. v. 4. p. 359-361. doi: 10.1007/s12686-011-9548-7
- ESPOSTI, M. D. *et al.* 1993. *Mitochondrial cytochrome b: evolution and structure of the protein*. Biochimica et. Biophysica Acta. v. 1143. p. 243-271.
- ESTOUP, A; JARNE, P; CORNEUT, J. 2002. *Homoplasy and mutation model at microsatellite loci and their consequences for population genetics analysis*. Molecular Ecology. v. 11. p. 1591-1604.
- EVANNO, G; REGNAUT, S; GOUDET, J. 2005. *Detecting the number of clusters of individuals using the software structure: a simulation study*. Molecular Ecology. v. 14. p. 2611-2620.
- EXCOFFIER, L; LAVAL, G; SCHNEIDER, S. 2007. *Arlequin ver. 3.11: An integrated software package for population genetics data analysis*. Evolutionary Bioinformatics Online. v. 1. p. 47-50.
- FABRÉ, N. N; BARTHEM, R. B. 2005. *O manejo da pesca dos bagres migradore: Piramutaba e Dourada no Eixo Solimões-Amazonas*. Ibama, Pro Várzea. Manaus. Amazonas. p 114.

- FALUSH, D; STEPHENS, M; PRITCHARD, J. K. 2003. *Inference of Population Structure Using Multilocus Genotype Data: Linked Loci and Correlated Allele Frequencies*. *Genetics*. v. 164. p.1567-1587.
- FARIAS, I. P.; ORTI, G.; MEYER, A. 2000. *Total evidence: molecules, morphology, and the phylogenetics of cichlid fishes*. *Journal of Experimental Zoology*. n. 288. p. 76-92.
- FARIAS, I. P; ORTÍ, G; SAMPAIO, I; SCHNEIDER, H; MEYER, A. 1999. *Mitochondrial DNA Phylogeny of the Family Cichlidae: Monophyly and Fast Molecular Evolution of the Neotropical Assemblage*. *J. Mol. Evol.* v. 48. p. 703-711.
- FARIAS, I. P; ORTÍ, G; SAMPAIO, I; SCHNEIDER, H; MEYER, A. 2001. *The Cytochrome b Gene as a Phylogenetic Marker: The Limits of Resolution for Analyzing Relationships Among Cichlid Fishes*. *J. Mol. Evol.* v. 53. p. 89-103.
- FARIAS, I. P; TORRICO, J. P; GARCÍA-DÁVILA, C; SANTOS, M. C. F; HRBEK, T; RENNO, J, F. 2010. *Are rapids a barrier for floodplain fishes of the Amazon basin? A demographic study of the keystone floodplain species *Colossoma macropomum* (Teleostei: Characiformes)*. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. v. 56. n. 3. p. 1129-1135.
- FARIAS, I.P.; HRBEK, T. 2008. *Patterns of diversification in discus fishes (*Symphysodon* spp. Cichlidae) of the Amazon basin*. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, n. 49. p 32-43.
- FARIAS, I.P; HRBEK, T; BRINKMANN, H; SAMPAIO; MEYER, A. 2003. *Characterization and isolation of DNA microsatellite primers for *Arapaima gigas*, an economically important but severely over-exploited fish species of the Amazon basin*. *Molecular ecology notes*. p. 128-130.
- FARIAS, I.P; MUNIZ, L.B; ASTOLFI-FILHO, S; SAMPAIO, I. 2006. *Isolation and characterization of DNA microsatellite primers for *Cynoscion acoupa*, the most exploited sciaenid fish along the coast of Brazil*. *Molecular ecology notes*. p. 660-663.

FERGUSON, I; COMPAGNO, L. J. V; MARKS, M. 2009. *Carcharodon carcharias*. In: *IUCN 2013*. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2013. Downloaded on www.iucnredlist.org.

FERREIRA, M; GRATTAPAGLIA, D. 1998. *Introdução ao uso de Marcadores Moleculares em análises genéticas*. EMBRAPA-CERNAGEN, Brasília, p. 220.

FILIZOLA, N; GUYOT, J. L. 2011. *Fluxo de sedimentos em suspensão nos rios da Amazônia*. Revista Brasileira de Geociências. n. 41. v. 4. p. 566-576.

FORMIGA-AQUINO, K. 2004. *Variabilidade genética da piramutaba - Brachyplatystoma vaillantii (Velenciennes, 1840) (Siluriformes - Pimelodidae) no sistema Estuário-Amazonas-Solimões*. Dissertação de Mestrado. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia. Manaus. Amazonas. Brasil. p.73.

FRANKHAM, R ; BALLOU, J.D ; BRISCOE, D.A. 2008. *Fundamentos da Genética da Conservação*. CBG (Sociedade Brasileira de Genética) Ribeirão Preto. São Paulo. p. 280.

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

FUNK, W. C; MCKAY, J. K; HOHENLOHE, P. A; ALLENDORF, F. W. 2012. *Harnessing genomics for delineating conservation units*. Trends in Ecology and Evolution. v. 27. n. 9. p. 489-496.

GALBUSERA, P; VOLCKAERT, F. A; HELLEMANS, B; OLLEVIER, F. 1996. *Isolation and characterization of microsatellite markers in the African catfish Clarias gariepinus (Burchell, 1822)*. Molecular Ecology. v. 5. p. 703-705.

GALLETTI, E. S. 2009. *Distribuição da variabilidade genética da pescada, Plagioscion squamosissimus (HECKEL, 1840) na calha do Rio Amazonas*. Dissertação de mestrado. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia. Manaus. Amazonas. Brasil. p 67.

- GOUDET, J. 2002. *FSTAT, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices (version 2.9.3.2)*. Disponível em: <http://www.unil.ch/izea/software/fstat.html>.
- GRAY, M.W. 1989. *Origin and Evolution of Mitochondrial DNA*. Annual Review of Cell Biology. v. 5. p. 25-50.
- HALL, T.A. 1999. *Bio Edit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for windows 95/98/NT*. Nucl. Acidr. Fynp. Ser. n. 41. p. 95-98.
- HERBET, P. D. N. *et al.* 2003. *Biological identifications through DNA barcodes*. Proc. R. Soc. Lond. v. 270. p. 313-321.
- HEYDEN, S; LIPINSKI, M. R; MATTHEE, C. A. 2010. *Remarkably low mtDNA control region diversity in an abundant demersal fish*. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. v. 55. p. 1183–1188.
- HOELZEL, A. R; SHIVJI, M, S; MAGNUSSEN, J; FRANCIS, M. P . 2006. *Low worldwide genetic diversity in the basking shark (Cetorhinus maximus)*. Biol. Lett. v. 2. p. 639-642.
- HOORN, C; WESSELING, F. P; STEEGE, H; BERMUDEZ, M. A; MORA, A; SEVINK, J; SANMARTÍN, I; SANCHEZ-MESEGUER, A; ANDERSON, C. L; FIGUEIREDO, J. P; JARAMILLO, C; RIFF, D; NEGRI, F. R; HOOGHIEMSTRA, H; LUNDBERG, J; STADLER, T; SARKINEN, T; ANTONELLI, A. 2010. *Amazonia Through Time: Andean Uplift, Climate Change, Landscape Evolution, and Biodiversity*. Science. v. 330. p. 927-931.
- HRBEK, T.; CROSSA, M.; FARIAS, I.P. 2007. Conservation strategies for *Arapaima gigas* (Schinz, 1822) and the Amazonian várzea ecosystem. *Brazilian Journal of Biology*, n. 67. p 909-917.
- HRBEK, T; FARIAS, I. P. 2008. *The complete mitochondrial genome of the pirarucu (Arapaima gigas, Arapaimidae, Osteoglossiformes)*. Genetics and Molecular Biology. v. 31. n. 1. p. 293-302.

HRBEK, T; FARIAS, I. P; CROSSA, M; SAMPAIO, I; PORTO, J. I. R; MEYER, A. 2005. Population genetic analysis of *Arapaima gigas*, one of the largest freshwater fishes of the Amazon basin: implications for its conservation. *Animal Conservation*. n.8. p. 297–308.

HUERGO, G. P. C. M. 2009. *Estimativa da diversidade genética da piraíba (Brachyplatystoma filamentosum, Lichtenstein 1819) e da piraíba negra (Brachyplatystoma capapretum, Lundberg e Akama 2005), na Amazônia Brasileira, inferidas através do DNA mitocondrial: Subsídios para Manejo e Conservação*. Tese de Doutorado. INPA- Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia. Manaus. Amazonas. p 114.

HUERGO, G. M; FILGUEIRAS-SOUZA, R. J; BATISTA, J. S; FORMIGA-AQUINO, K; ALVEZ-GOMES, J. A. 2011. *Molecular genetics as a tool for fisheries management in the Brazilian Amazon: Piraíba (Brachyplatystoma filamentosum and Brachyplatystoma capapretum) (Siluriformes: Pimelodidae) in white-water rivers*. Pan-American Journal of Aquatic Sciences. v. 6. n. 4. p. 280-289.

JEFREYS, A.J; TAMAKI, K; MACLEOD, A; MONCKTON, D.G; NEIL, D.L; ARMOUR, J.A. 1994. *Complex gene conversion events in germline mutation at human minisatellites*. Nature Genetics. v. 6. p.136-145.

JHONS, G. C; AVISE, J. C. 1998. *A Comparative Summary of Genetic Distances in the Vertebrates from the Mitochondrial Cytochrome b Gene*. Mol. Bio. Evol. v. 15. n. 11. p. 1481-1490.

JOHSON, K. P; CLAYTON, D. H. 2000. *Nuclear and Mitochondrial Genes Contain Similar Phylogenetic Signal for Pigeons and Doves (Aves: Columbiformes)*. Molecular Phylogenetics and Evolution. v. 14. n. 1. p. 141-151.

JUNK, W. J; PIEDADE, M. T. F; SCHONGART, J; COHN-HALF, M; ADENEY, J. M; WITTMANN, F. A. 2011. *Classification of Major Naturally-Occurring Amazonian Lowland Wetlands*. Wetlands. v. 31. p. 623–640.

KARHU, A. 2001. *Evolution and application of pine microsatellites*. University of Oulu/ Departamento de Biologia. Oulu. Finlândia. p. 52.

- KATTI, M. V; RANJEKAR, P. K; GUPTA, V. S. 2001. *Differential Distribution of Simple Sequence Repeats in Eukaryotic Genome Sequences*. Mol. Biol. Evol. v. 18. n. 7. p. 1161-1167.
- KEENEY, D. B; HEUPEL, M. R; HUETER, R. E; HEIST, E. J. 2005. *Microsatellite and mitochondrial DNA analyses of the genetic structure of blacktip shark (Carcharhinus limbatus) nurseries in the northwestern Atlantic, Gulf of Mexico, and Caribbean Sea*. Molecular Ecology. v. 14. p. 1911–1923.
- KIMURA, M. 1980. A Simple Method for Estimating Evolutionary Rates of Base Substitutions Through Comparative Studies of Nucleotide Sequences. J. Mol. Evol. v. 16. p. 111-120.
- KIMURA, M.; CROW, J.F. 1964. *The number of alleles that can be maintained in a finite population*. Genetics. n. 49. p. 725-738.
- KIMURA, M; OHTA, T. 1978. *Stepwise mutation model and distribution of allelic frequencies in a finite population*. Proc Natl Acad Sci U S A. v. 75. n. 6. p. 2868-2872.
- LAGERCRANTZ, U; ELLEGREN, H; ANDERSSON, L. 1993. The Abundance of various polymorphic microsatellites motifs differs between plants and vertebrates. Nucleic Acids Research. v. 21. n. 5. p. 1111-1115.
- LEVINSON, G.; GUTMAN, G.A. 1987. *Slipped-strand mispairing: a major mechanisms for DNA sequence evolution*. Molecular Biology and Evolution. v. 4. n. 3. p. 203-221.
- LI, Y. C; KOROL, A. B; FAHIMA, T; BEILES, A; NEVO, E. 2002. *Microsatellites: genomic distribution, putative functions and mutational mechanisms: a review*. Molecular Ecology. v. 11. p. 2453-2465.
- LI, Y. C; KOROL, A. B; FAHIMA, T; NEVO, E. 2004. *Microsatellites Within Genes: Structure, Function, and Evolution*. Mol. Biol. Evol. v. 21. n. 6. p. 991-1007.

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

LIMA, M. P ; CAMPOS, T.; Sousa, A. C. B ; Souza, A. P; ALMEIDA-VAL, V. M. F. 2010. *Isolation and characterization of microsatellite markers for Cichla monoculus (Agassiz, 1831), an important freshwater fish in the Amazon*. *Conservation Genetics Resources*. v. 2. p. 215-218.

LITT, M ; LUTTY, J.A. A. 1989. *Hypervariability microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene*. Chicago. p. 397-401.

LIU, Z. J; CORDES, J. F. 2004. *DNA markers technology and their applications in aquaculture genetics*. *Aquaculture*. v. 238. p. 1-37.

LOWE-MCCONNELL, R.H. 1987. *Ecological Studies in Tropical Fish Communities*. Cambridge University Press. p. 382.

LUNDBERG, J. G; MARSHALL, L. G; GUERRERO, J; HORTON, B; MALABARBA, M. C. S; 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, Z. M. S; LUCENA, C. A. S. *Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes*. EDIPUCRS. p. 13-48.

LUNDBERG, J.G. 2005. *Brachyplatystoma promagdalenae*, new species, a fossil goliath catfish (Siluriformes: Pimelodidae) from the Miocene of Colombia, South America. *Neotropical Ichthyology*. n. 4. p 597- 605.

LUNDBERG, J.G. e AKAMA A. 2005. *Brachyplatystoma capapretum: a New Species of Goliath Catfish from the Amazon Basin, with a Reclassification of Allied Catfishes (Siluriformes: Pimelodidae)*. *Copeia*. v.3. p. 492-516.

- MACHADO, A. B. M; DRUMMOND, G. M; PAGLIA, A. P. 2008. *Livro vermelho da fauna brasileira ameaçada de extinção*. Fundação Biodiversitas. Ministério do Meio Ambiente – MMA. Brasília. DF. p. 1420.
- MACHADO, V.N. 2009. *Análise da variabilidade genética do curimatã Prochilodus nigricans (Agassiz, 1829) na calha do rio Amazonas e seus principais tributários*. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Amazonas. Manaus. Amazonas. Brasil.
- MAHESWARAN, M. 2004. *Molecular Markers: History, Features and Applications*. *Advanced Biotech*. p. 17-24.
- MAIA, C. R. 2011. Deferênciação genética e relações filogenéticas entre as linhagens de *Microsternachus* (Gymnotiformes: Hypopomidae) na bacia do rio negro, em função de marcadores moleculares mitocôndriais e nucleares. Dissertação de mestrado. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia/ Universidade Federal do Amazonas. p. 69.
- MANTEL, N. 1967. *The detection of disease clustering and a generalized regression approach*. *Cancer Research*. n. 27. p. 209-220.
- MARQUES. D. K. S. 2002. *Aplicação da biologia molecular em programas de conservação de recursos pesqueira*. Embrapa Pantanal. Corumbá. Mato Grosso do Sul. Brasil. p. 22.
- MARROIG, G; CERQUEIRA R. 1997. *Plio-Pleistocene South America history and the Amazonas Lagoon Hypothesis: a piece in the puzzle of Amazonian diversification*. *Journal of Comparative Biology*. v. 2. p. 103-119.
- MARTINS, W.S; LUCAS, D.C.S; NEVES, K.F.D.S; BERTIOLI, D.J. 2009. *WebSat - A web software for microsatellite marker development*. *Bioinformation*. n. 3. p. 282-283.
- MATIOLI, S. R. 2004. *Biologia Molecular e Evolução*. Holos. São Paulo. Brasil. p. 202.
- MATSUMO, C. K; HILSDORF, A. W. 2009. *Microsatellite variation and population genetic structure of a neotropical endangered Bryconinae species Brycon insignis*

Steindachner, 1877: implications for its conservation and sustainable management. Neotropical Ichthyology. v. 7. n. 3. p. 395-402.

MEYER, A. 1993. *Evolution of mitochondrial DNA in fishes.* Biochemistry and molecular biology of fishes. n. 2. p. 1-38.

MINISTÉRIO DA PESCA E AQUICULTURA - MPA. 2008. *Boletim estatístico da pesca e aquicultura: Brasil 2008-2009.* IBAMA. Brasília. Brasília. p. 99.

MINISTÉRIO DA PESCA E AQUICULTURA - MPA. 2010. *Boletim estatístico da pesca e aquicultura: Brasil 2010.* IBAMA. Brasília. p. 128.

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE - MMA. 2000. *Estatística da Pesca 2000: Brasil, grandes Regiões e Unidades da Federação.* IBAMA. Brasília. p. 16.

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE - MMA. 2001. *Estatística da Pesca 2001: Brasil, grandes Regiões e Unidades da Federação.* IBAMA. Brasília. p. 97.

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE - MMA. 2002. *Estatística da Pesca 2002: Brasil, grandes Regiões e Unidades da Federação.* IBAMA. Brasília. p. 97.

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE - MMA. 2003. *Estatística da Pesca 2003: Brasil, grandes Regiões e Unidades da Federação.* IBAMA. Brasília. p. 98.

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE - MMA. 2004. *Estatística da Pesca 2004: Brasil, grandes Regiões e Unidades da Federação.* IBAMA. Brasília. p. 98.

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE - MMA. 2005. *Estatística da Pesca 2005: Brasil, grandes Regiões e Unidades da Federação.* IBAMA. Brasília. p. 108.

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE - MMA. 2006. *Estatística da Pesca 2006: Brasil, grandes Regiões e Unidades da Federação.* IBAMA. Brasília. p. 180.

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE - MMA. 2007. *Estatística da Pesca 2007: Brasil, grandes Regiões e Unidades da Federação*. IBAMA. Brasília. p. 113.

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

MOJICA, J. I. *et al.* 2012. *Libro rojo de peces dulceacuícolas de Colombia*. Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt. Bogotá. Colombia. p. 319.

Molecular Ecology Resources Primer Development Consortium, AGATA, K., ALASAAD, S., ALMEIDA-VAL, V. M. F., ÁLVAREZ-DIOS, J. A., BARBISAN, F., BEADELL, J. S., BELTRÁN, J. F., BENÍTEZ, M., BINO, G., BLEAY, C., BLOOR, P., BOHLMANN, J., BOOTH, W., BOSCARI, E., CACCONE, A., CAMPOS, T., CARVALHO, B. M., CLIMACO, G. T., CLOBERT, J., CONGIU, L., COWGER, C., DIAS, G., DOADRIO, I., FARIAS, I. P., FERRAND, N., FREITAS, P. D., FUSCO, G., GALETTI, P. M., GALLARDO-ESCÁRATE, C., GAUNT, M. W., GOMEZ OCAMPO, Z., GONÇALVES, H., GONZALEZ, E. G., HAYE, P., HONNAY, O., HYSENI, C., JACQUEMYN, H., JOWERS, M. J., KAKEZAWA, A., KAWAGUCHI, E., KEELING, C. I., KWAN, Y.-S., LA SPINA, M., LEE, W.-O., LEŚNIEWSKA, M., LI, Y., LIU, H., LIU, X., LOPES, S., MARTÍNEZ, P., MEEUS, S., MURRAY, B. W., NUNES, A. G., OKEDI, L. M., OUMA, J. O., PARDO, B. G., PARKS, R., PAULA-SILVA, M. N., PEDRAZA-LARA, C., PERERA, O. P., PINO-QUERIDO, A., RICHARD, M., ROSSINI, B. C., SAMARASEKERA, N. G., SÁNCHEZ, A., SANCHEZ, J. A., SANTOS, C. H. d. A., SHINOHARA, W., SORIGUER, R. C., SOUSA, A. C. B., SOUSA, C. F. d. S., STEVENS, V. M., TEJEDO, M., VALENZUELA-BUSTAMANTE, M., VAN de VLIET, M. S., VANDEPITTE, K., VERA, M., WANDELER, P., WANG, W., WON, Y.-J., YAMASHIRO, A., YAMASHIRO, T. and ZHU, C. 2011. *Permanent Genetic Resources added to Molecular Ecology Resources Database 1 December 2010–31 January 2011*. *Molecular Ecology Resources*. v. 11. p. 586–589. doi: 10.1111/j.1755-0998.2011.03004.x

Molecular Ecology Resources Primer Development Consortium, Aksoy, S., Almeida-Val, V. M. F., Azevedo, V. C. R., Baucom, R., Bazaga, P., Beheregaray, L. B., Bennetzen, J. L., Brassaloti, R. A., Burgess, T. I., Caccone, A., Chang, S.-M., Ciampi, A. Y., Ciancaleoni, S.,

Clímaco, G. T., clouet, C., Coimbra, M. R. M., Coutinho, L. L., Dantas, H. L., De Vega, C., Echodu, R., Enyaru, J., Figueira, A., Filho, M. A. G., Foltz, B., Fressigné, L., Gadomski, M., Gauthier, N., Herrera, C. M., Hyseni, C., Jorge, E. C., Kaczmarczyk, D., Knott, E., Kuester, A., Lima, A. P. S., Lima, M. A., Lima, M. P., Longo, A. L. B., Lor, G., Maggioni, R., Marques, T. S., Martins, A. R., Matoso, D. A., Medrano, M., Mendonça, M. A. C., Mettler, R., Nascimento, P. R. M., Negri, V., Oliveira, K. K. C., Oliveira, L. O., Ovcarenko, I., Paula-Silva, M. N., Raggi, L., Sandoval-Castillo, J., Santos, C. H. D. A., Martin Schaefer, H., Segelbacher, G., Seino, M. M., Sistro, M., Taole, M. M., Teske, P. R., Tsagkarakou, A., Verdade, L. M., Villela, P. M. S., Vinson, C. C., Wingfield, B. D. and Wingfield, M. J. 2013. *Permanent Genetic Resources added to Molecular Ecology Resources Database 1 October 2012–30 November 2012*. *Molecular Ecology Resources*. v. 13. p. 341–343. doi: 10.1111/1755-0998.12061

MORAES, A. O; SCHOR, T; ALVES-GOMES, J. A. 2010. *Relações de transporte na pesca de bagres no Rio Solimões – AM*. *Novos Cadernos NAEA*. v. 13. n. 1. p. 155-170.

MORITZ, C. 1999. *Conservation units and translocations: strategies for conserving evolutionary processes*. *Hereditas*. v. 130. p. 130-228.

MORITZ, C; CICERO, C. 2004. *DNA Barcoding: Promise and Pitfalls*. *Plos Biology*. v. 2. n. 10. p. 1529-1531.

MOXON, E. R; WILLS, C. 1999. *DNA Microsatellites: Agents of evolution?*. *Scientific American*. v. 280. n. 1. p. 94-99.

NA-NAKORN, U. *et al.* 1999. *Isolation and characterization of microsatellite loci of Clarias macrocephalus and their application to genetic diversity study*. *Fisheries Science*. v. 65. n. 4. p. 520-526.

NASCIMENTO, P. R. M; SANTOS, C. F. S; CLÍMACO, G. T; PAULA-SILVA, M. N; ALMEIDA-VAL, V. M. F. 2012. *Isolation and development microsatellite markers in the *Pygocentrus nattereri* (Kner, 1858) (Characiformes, Serrasalminae), an important freshwater fish in the Amazon*. *Conservation Genetic. Resour.* v. 4. p. 271-274.

- NEI, M. 1987. *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia University Press. New York. p. 512.
- NELSON, J.S. 2006. *Fishes of the World*. Department of Biological Science. University of Alberta. Canada. v.4. p. 601.
- NGAMSIRI, T; OHASHI, Y; SUKUMASAVIN, N; NAKAJIMA, M; NA-NAKORN, U; TANIGUCHI, N. 2006. *Characterization of microsatellite DNA markers in a critically endangered species, Mekong giant catfish, Pangasianodon gigas*. *Molecular Ecology Notes*. n. 6. p. 313-315.
- OLIVEIRA, E. J; PÁDUA, J, G; ZUCCHI, M. I; VENCOVSKY, R; VIEIRA, M. L. C. 2006. *Origin, evolution and genome distribution of microsatellites*. *GMR*. v. 29. n. 2. p. 294-307.
- ORREGO, L. E. O. 2012. *Análise filogeográfica de Brachyplatystoma platynemum (Siluriformes: Pimelodidae)*. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual Paulista. Botucatu. p. 64.
- ORTIZ, M. F. 2010. *Validação do dna barcoding como identificador de espécies: um estudo de ampla amostragem com o gênero Pseudoplatystoma (SILURIFORMES; PIMELODIDAE) na Amazônia*. Dissertação de Mestrado. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia. Manaus. Amazonas. Brasil. p 73.
- PARENTE, V. M; VIEIRA, E. F; CARVALHO, A. R; FABRÉ, N.; N. 2005. *A pesca e a economia da pesca de bagres no eixo Solimões-Amazonas*. In: FABRÉ, N. N; BARTHEM, R. B. *O manejo da pesca dos bagres migradore: Piramutaba e Dourada no Eixo Solimões-Amazonas*. Ibama, Pro Várzea. Manaus. Amazonas. p 114.
- PARK, S. D. E. 2001. *Trypanotolerance in West African cattle and the population genetic effects of selection*. Ph.D thesis. University of Dublin. Dublin.
- PASSOS, K. P; LEÃO, A. S. A; OLIVEIRA, D. P; FARIAS, I. P; HRBEK, T. 2010. *Polymorphic microsatellite markers for the overexploited Amazonian fish, Semaprochilodus insignis (Jardine and Schomburgk 1841)*. *Conservation Genetics Resour.* p. 231-234.

- PEAKALL, R; SMOUSE, P. E. 2006. *genalex 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research*. Molecular Ecology Notes. v. 6. p. 288-295.
- PEREIRA, L. H. G; FOREST, F; OLIVEIRA, C. 2009. *Genetic structure of the migratory catfish *Pseudoplatystoma corruscans* (Siluriformes: Pimelodidae) suggests homing behavior*. Ecology of Freshwater Fish. v. 18. p. 215-225.
- PEREIRA, S. L. 2000. *Mitochondrial genome organization and vertebrate phylogenetics*. Artigo de revisão. Genetics and Molecular Biology, v. 23. n. 4. p 745-752.
- PETRERE JR, M ; BARTHEM, R. B ; CÓRDOBA, E. A ; GÓMEZ, B. C. 2004. *Review of the large fisheries in the upper Amazon and de stock depletion of piraíba (*Brachyplatystoma filamentosum* Lichtenstein)*. Reviews in Fish Biology and Fisheries. Brasil. v. 14. p. 403-414.
- PIORSKI, N. M. *et al.* 2008. Contribution of conservation genetics in assessing neotropical freshwater fish biodiversity. *Braz. J. Biol.* v.68, n.4. p. 1039-1050.
- POVH, J. A; RIBEIRO, R. P; LOPERA-BARRERO, N. M; JACOMETO, B; VARGAS, L; GOMES, P. C; LOPES, T. S. 2011. *Microsatellite analysis of pacu broodstocks used in the stocking program of Paranapanema River, Brazil*. Sci. Agric. v. 68. n. 3. p. 308-313.
- PRITCHARD, J.K; STEPHENS, M; DONNELLY, P. 2000. *Inference of Population Structure Using Multilocus Genotype Data*. Genetics. n. 155. p. 945-959.
- RAYMOND, M; ROUSSET, F. 1995. *GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism*. J Hered. v. 86.p. 248–249.
- REVALDAVES, E; PEREIRA, L.H.G; FORESTI, F; OLIVEIRA, C. 2005. *Isolation and characterization of microsatellite loci in *Pseudoplatystoma corruscans* (Siluriformes: Pimelodidae) and cross-species amplification*. Molecular Ecology Notes. v. 5. p. 463-465.
- RICE, W.R. 1989. *Analyzing tables of statistical tests*. Evolution. v. 43. p. 223-225.

- ROBERTS, T.R. 1972. *Ecology of fishes in the Amazon and Congo basins*. Bulletin of the Museum of Comparative Zoology. Harvard. v.143. p.117-147.
- RODRIGUES, F. C; FARIAS I.P; BATISTA, J.S; ALVES-GOMES, J.A. 2009. *Estimativa da variabilidade genética da piramutaba (Brachyplatystoma vaillantii) por meio de marcadores moleculares microssatélites e D-loop de quatro localidades da Amazônia: diferenças entre calha e tributários*. Dissertação de Mestrado. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia/ Universidade Federal do Amazonas. Manaus. Amazonas. p 96.
- RODRÍGUEZ. J. P; ROJAS-SUÁREZ. 2008. Libro Rojo de la Fauna Venezolana. Provita y Shell Venezuela, S.A. Caracas. Venezuela. v. 3. p. 364.
- ROGERS, A.R; HARPENDING, H. 1992. *Population Growth Makes Waves in the Distribution of Pairwise genetic differences*. Mol. Biol. Evol. v. 9. p. 552-569.
- ROURKE, M; GILLIGAN, D. 2010. *Population genetic structure of freshwater catfish (Tandanus tandanus) in the Murray-Darling Basin and coastal catchments of New South Wales: Implications for future re-stocking programs*. Industry & Investment NSW. n. 123. Narrandera. Australia.
- RUFFINO, M.L. 2001. *Strategies for Managing Biodiversity in Amazonian Fisheries*. Blue Millennium: Managing Global Fisheries for Biodiversity. UNEP/BPSP. Mimeo.
- RYDER, O.A. 1986. *Species conservation and systematics: the dilemma of subspecies*. Trends Ecol. Evol. v. 1. p. 9–10.
- SACCONI, C. *et al.* 1999. *Evolutionary genomics in Metazoa: the mitochondrial DNA as a model system*. Gene. v. 238. p. 195-209.
- SAITOU, N.; NEI, M. 1987. *The Neighbor-joining Method: A New Method for Reconstructing Phylogenetic Trees*. Molecular Biology and Evolution. n. 4. p. 406-425.
- SAMBROOK J, FRITSCH EF, MANIATIS T. 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Springs Harbor Laboratory Press: Cold Springs Harbor. NY. v. 2.

- SANTANA, G. X; SANTOS, C. H. A; SOUSA, C. F. S; NASCIMENTO, P. R. M; PAULA-SILVA, M. N; SOUSA, A. C. B; CAMPOS, T; ALMEIDA-VAL, V. M. A. 2012. *Isolation of novel microsatellite markers for tambaqui (Colossoma macropomum, Cuvier 1818), an important freshwater fish of the Amazon*. Conservation Genet. Resour. v. 4. p. 197-200.
- SANTOS, M. C. F. 2009. Caracterização genética das populações naturais de tambaqui *Colossoma macropomum*, na bacia amazônica através de marcadores mitocondriais e microssatélites. Tese de Doutorado. Universidade Federal do Amazonas. 156 pp.
- SANTOS, M. C. F; RUFFINO, M.L.; FARIAS, I.P. 2007. *High levels of genetic variability and panmixia of the tambaqui Colossoma macropomum (Cuvier, 1818) in the main channel of the Amazon River*. J. Fish Biol. n. 71. p. 33-44.
- SANTOS, G. M. 2008. Pesca e Ictiofauna no Rio Madeira. In: SWITKES, G. *Águas Turvas: Alertas sobre as consequências de barrar o maior afluente do Amazonas*. International Rivers. São Paulo. 1º edição. 237 pps.
- SANTOS, G. M; FERREIRA, E. J; ZUANON, J.A. 2006. *Peixes comerciais de Manaus*. Ibama. Provárzea. Manaus, Amazonas. p. 80; 85-87; 97; 101.
- SAULO-MACHADO, A.C ; FORMIGA, K.M; ORTIZ, M.F; SOUZA, A.C.B; ALVES-GOMES, J.A; BATISTA, J.B. 2010. *Polymorphic microsatellite markers for the Amazonian catfish Pseudoplatystoma punctifer (Siluriformes: Pimelodidae)*. Conservation genetics resources. p. 231-234.
- SBISÁ, E; TANZARIELLO, F; REYES, A; PESOLE, G; SACCONI, C. 1997. *Mammalian mitochondrial D-loop region structural analysis: identification of new conserved sequences and their functional and evolutionary implications*. Gene. n. 205 . p.125-140.
- SCHLOTTERER, C. 2004. The evolution of molecular markers: just a matter of fashion? *Nature Reviews Genetics*. v.5. p. 63-69.

SCHLOTTERER, C; TAUTZ, D. 1992. *Slippage synthesis of simple sequence DNA*. Nucleic Acids Research. v. 20. n. 2. p. 211-215.

SCHMITT, R. 2005. *Filogeografia de Hypopygus lepturus Hoedman, 1962 (Gymnotiformes: Rhamphichthyidae) ao longo do médio rio Negro, Amazônia*. Dissertação de Mestrado. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia/ Universidade Federal do Amazonas. Manaus. Amazonas. Brasil. p. 95.

SCHNEIDER, C. H; GROSS, M. C; TERCENIO, M. L; PORTO, J. I. R. 2012. *Cryptic diversity in the mtDNA of the ornamental fish Carnegiella strigata*. Journal of Fish Biology. v. 81. p. 1210-1224.

SCHUELKE M. 2000. *An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments*. Nat Biotechnol. v. 18. p. 233–234.

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

SHADEL, G. S; CLAYTON, D. A. 1997. *Mitochondrial DNA Maintenance in Vertebrates*. Annu. Rev. Biochem. n. 66. p. 409.

SILVA, T. D. J. D; HRBEK, T.; FARIAS, I. P. 2009. *Microsatellite markers for the silver arowana, Osteoglossum bicirrhosum (Osteoglossidae, Osteoglossiformes)*. Molecular Ecology Resources. v. 9. p. 1019-1022.

SIVASUNDAR, A; BERMINGHAM, E; ORTI. 2001. *Population structure and biogeography of migratory freshwater fishes (Prochilodus : Characiformes) in major South American rivers*. Molecular Ecology. n. 10. p. 407–417.

SLATKIN, M; HUDSON, R. R.1991. *Pairwise Comparisons of Mitochondrial DNA Sequences in Stable and Exponentially Growing Populations*. Genetics. v. 129 . p. 555-562.

SOUSA, C; SANTOS, C; SOUSA, A; PAULA-SILVA, M; SOUZA, A; FARIAS, I; FERREIRA-NOZAWA, M; ALMEIDA-VAL, V. 2009. *Development and characterization of*

microsatellite markers in Astronotus crassipinis (Heckel, 1840). Conservation Genetics Resources.

SUNNUCKS, P. 2000. *Efficient genetic markers for population biology*. Tree. v. 15. n. 5. p. 199-2003.

TABERLET, P. 1996. *The use of the Mitochondrial DNA Region Sequencing in Conservation Genetics*. In: SMITH, T. B; WAYNE, R. K. *Molecular Genetics Approaches in Conservation*. Oxford University Press. New York.

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

TAMURA, K; DUDLEY, J; NEI, M ; KUMAR, S. 2007. *MEGA 4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0*. Molecular Biology and Evolution, n. 24. p. 1596-1599.

TAUTZ, D. 1989. *Hypervariability of simple sequences of general source for polymorphic DNA markers*. Oxford. p. 6463-6471.

TERENCIO, M. L; SCHENEIDER, C. H; PORTO, J. I. R. 2012. *Molecular signature of the D-loop in the brown pencilfish Nannostomus eques(Characiformes, Lebiasinidae) reveals at least two evolutionary units in the Rio Negro basin, Brazil*. Journal of Fish Biology. v. 81. p. 110-124.

TÓTH, G; GÁSPÁRI, Z; JURKA, J. 2000. *Microsatellites in Different Eukaryotic Genomes: Survey and Analysis*. v. 10. p. 967-981.

UPHOLT, W. B; DAWID, I. B. 1977. *Mapping of Mitochondrial DNA of Individual Sheep and Goats: Rapid Evolution in the D Loop Region*. Cell. v. 11. p. 571-583.

VAN OOSTERHOUT, C; HUTCHINSON, W.F; WILLS, D.P.M; SHIPLEY, P. 2004. *Micro-checker: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data*. Molecular Ecology Notes. n. 4. p. 535-538.

VANHAECKE, D; LEANIZ, C. G; GAJARDO, G; YOUNG, K.; SAZANA, J; ORELLANA, G; FOWLER, D; HOWES, P; MONZON-ARGUELLO, C; CONSUEGRA, S. 2012. *DNA Barcoding and Microsatellites Help Species Delimitation and Hybrid Identification in Endangered Galaxiid Fishes*. Plos One. v. 7. n. 3.

VARI, R.P; MALABARBA, L.R. 1998. *Neotropical Ichthyology: An Overview*. In MALABARBA, L.R, et al. *Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes*. Edipucrs. Porto Alegre. Brazil. p. 1-11.

VIEIRA, E. 2005. Legislação e plano de manejo para a pesca de bagres na bacia Amazônica. In: FABRÉ, N. N; BARTHEM, R. B. *O manejo da pesca dos bagres migradore: Piramutaba e Dourada no Eixo Solimões-Amazonas*. Ibama, Pro Várzea. Manaus. Amazonas. p 114.

VOLCKAERT, F. A. M; HELLEMANS, B. POUYAND, L. 1999. *Nine polymorphic microsatellite markers in the SE Asian catfishes Pangasius hypophthalmus and Clarias batrachus*. Animal Genetics. v. 30. p. 382-405.

WAGNER, A; CREEL, S; KALINOWSKI, S. 2006. *Estimating relatedness and relationships using microsatellite loci with null alleles*. Heredity. p. 1-10.

WATTIER, R; ENGEL, C. R; SAUMITOU-LAPRADE, P; VALERO, M. 1998. *Short allele dominance as a source of heterozygote deficiency at microsatellite loci: experimental evidence at the dinucleotide locus GvICT in Gracilaria gracilis (Rhodophyta)*. Molecular Ecology. v. 7. p. 1569-1573.

WEBER, J. L ; MAY, P.E. 1989. *Abundant class for human DNA polymorphisms which can be typed using the Polymerase Chain Reaction*. Chicago. p. 388-396.

WRIGHT, S. 1951. *The genetical structure of populations*. Annals of Eugenics. v.15. p. 323-354.

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

XIA, X. 2013. *DAMBE5: A comprehensive software package for data analysis in molecular biology and evolution*. Mol. Biol. Evol. Disponível em: dambe.bio.uottawa.ca/dambe.asp. doi:10.1093/molbev/mst064.

ZARDOYA, R; MEYER, A. 1996. *Phylogenetic Performance of Mitochondrial Protein Coding Genes in Resolving Relationships Among Vertebrates*. Mol.Biol.Evol. v.13. n. 7. p. 933-942.

ZHU, Y; STRASSMANN, J. E; QUELLER D. C. 2000. *Insertions, substitutions, and the origin of microsatellites*. Genet. Res. v.76. p. 227-236.

Apêndice A

Distribuição dos 75 haplótipos de *Brachyplatystoma capapretum* com base em 914 pb da região controle do DNAmT em nove localidades Amazônicas.

Haplótipos	Regiões									Total
	Belém (11)	Santarém (15)	Manaus (16)	Tabatinga (11)	Tefé (18)	Madeira (12)	Purus (12)	Japurá (20)	Rio Branco (07)	
HBC01	1							1		2
HBC02	1		1							2
HBC03	1		1		1			1	1	5
HBC04	1									1
HBC05	1									1
HBC06	2	1	2	4	5			1		15
HBC07	1		1						2	4
HBC08	1				1					2
HBC09	1									1
HBC10	3	3	5	1	10	1	6	2	2	33
HBC11	1									1
HBC12		1								1
HBC13		2	3	3	5	2	3	3	4	25
HBC14		1							1	2
HBC15		2					1	2	2	7
HBC16		1	1							2
HBC17		1								1
HBC18		1								1
HBC19		1								1
HBC20		1				1	4			6
HBC21		1								1
HBC22		1								1
HBC23		1								1
HBC24		2		1	3			1	1	8
HBC25			1							1
HBC26			1							1
HBC27			2		2	1				5
HBC28			1							1
HBC29			1							1
HBC30			1							1
HBC31			1							1
HBC32			1							1
HBC33			1							1
HBC34				1						1
HBC35				1						1
HBC36				1						1
HBC37				1						1
HBC38				1						1
HBC39				1						1
HBC40				1						1
HBC41					1					1
HBC42					1					1
HBC43					1					1
HBC44					1			1		2

Continuação...

Haplótipos	Regiões									Total
	Belém (11)	Santarém (15)	Manaus (16)	Tabatinga (11)	Tefé (18)	Madeira (12)	Purus (12)	Japurá (20)	Rio Branco (07)	
HBC45					1					1
HBC46					1					1
HBC47					2					2
HBC48					1					1
HBC49					1					1
HBC50					1					1
HBC51					1					1
HBC52						1				1
HBC53						1				1
HBC54						1				1
HBC55						1				1
HBC56						1	2			3
HBC57						1				1
HBC58						1				1
HBC59						1	1	1		3
HBC60							1			1
HBC61							1	1		2
HBC62							1			1
HBC63							1			1
HBC64							1			1
HBC65							1			1
HBC66								1		1
HBC67								1		1
HBC68								1		1
HBC69								1		1
HBC70								1		1
HBC71								1		1
HBC72								1		1
HBC73								1		1
HBC74								1		1
HBC75								1		1
Total										186 sequências