



DIVERSIDADE  
BIOLÓGICA  
PPG - UFAM



**UFAM**

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS -ICB  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
DIVERSIDADE BIOLÓGICA  
PPG-DIVBIO

DIVERSIDADE GENÉTICA E PADRÕES POPULACIONAIS  
DA PIRAPITINGA *Piaractus brachypomus* (Cuvier, 1818) CHARACIFORMES:  
UM CRITÉRIO PARA SEU MANEJO

MARIA DORIS ESCOBAR LIZARAZO

Manaus, Amazonas  
Setembro, 2013



DIVERSIDADE  
BIOLÓGICA  
PPG - UFAM



**UFAM**

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS -ICB  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
DIVERSIDADE BIOLÓGICA  
PPG-DIVBIO

DIVERSIDADE GENÉTICA E PADRÕES POPULACIONAIS  
DA PIRAPITINGA *Piaractus brachypomus* (Cuvier, 1818) CHARACIFORMES:  
UM CRITÉRIO PARA SEU MANEJO

MARIA DORIS ESCOBAR LIZARAZO  
Orientador: Tomas Hrbek, Ph.D  
Co-Orientador: Izeni Pires Farias, Dra.

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação  
em Diversidade Biológica, como parte dos  
requisitos para obtenção do título de Doutor em  
área de concentração em Biodiversidade  
Amazônica.

Manaus, Amazonas  
Setembro, 2013

Ficha Catalográfica  
(Catalogação realizada pela Biblioteca Central da UFAM)

L789d

Lizarazo, Maria Doris Escobar

Diversidade genética e padrões populacionais da pirapitinga *Piaractus  
brachypomus* (Cuvier, 1818) characiformes: um critério para seu manejo /  
Maria Doris Escobar Lizarazo. - 2013.

159 f. : il. color. ; 31 cm.

Tese (doutorado em Diversidade Biológica) — Universidade Federal do  
Amazonas.

Orientador: Prof. Ph.Dr. Tomas Hrbek.

Co-orientador: Prof. Dr. Izeni Pires Farias.

1. Pirapitinga (Peixe) 2. Peixe - Populações 3. Microssatélites  
(Genética) 4. Peixe de água doce I. Hrbek, Tomas, orientador II. Farias,  
Izeni Pires, orientador III. Universidade Federal do Amazonas IV. Título

CDU (2007): 597.5(043.2)

*Este trabalho está dedicado a minha mãe Arcelina,  
obrigada pelas orações, pela força e pelo amor!*

*Também é dedicado à Vida,  
pelas maravilhosas oportunidades que ela me dá*

## AGRADECIMENTOS

Antes de tudo a Deus, meu Pai e Divino orientador.

Imensamente e com admiração a meus orientadores Dr. Tomas Hrbek e Dra. Izeni Pires Farias pelos seus grandes ensinamentos, palavras de força e paciência.

A minha mãe Arcelina, meus irmãos Alberto, Julio, Rosa, Cecilia e Luis, e meu cunhado Gilberto pela paciência e amor.

Os meus colegas de laboratório do LEGAL, principalmente Concy, José Gregorio, Valeria e Mario pelo apoio, sem esquecer os momentos compartilhados com: Nicole, Juliana, Waleska, Gabriela, Deyla, Fabinho, Julia, Kelmer, Pedro Ivo, Natasha, Olavo, Mauro, Daniel, Antônio Saulo, Roberta, Israela, Sarah, Jessica e o inigualável Adriano.

Os meus amigos Renata, Gisele, Anita, José Gregorio, Marcos, Arnold, Diana, Sandra, Rosseval e Gina, pelo apoio, momentos de alegria, conselhos e força nos momentos de debilidade.

A Vinícius Verona por seu grande apoio, alegria, palavras e amor incondicional neste último ano de caminhada.

Aos amigos e colegas que conheci durante meu percurso profissional, graças a eles foi possível enxergar aos lugares mais inacessíveis da Amazônia e do Orinoco.

A vida por me dar a oportunidade de morar e conhecer esta bela terra, onde não só me fortaleci profissionalmente, mas cresci espiritual e pessoalmente.

A todos eles muito obrigado!

## SUMARIO

RESUMO	VII
ABSTRACT	IX
LISTA DE FIGURAS	XI
LISTA DE TABELAS	XIII
<b>1. INTRODUÇÃO GERAL</b>	<b>1</b>
<b>2. OBJETIVOS E HIPOTESSES</b>	<b>10</b>
<b>3. CAPITULOS</b>	
CAPITULO I. Testando a panmixia e identificando unidades evolutivas significativas em <i>Piaractus brachypomus</i> (Characiformes: Serrasalminidae).	17
CAPITULO II. Caracterização genético-populacional da cachama blanca ou morocoto <i>Piaractus brachypomus</i> na bacia do rio Orinoco.	61
CAPITULO III. Caracterização genético-populacional da pirapitinga <i>Piaractus brachypomus</i> (Cuvier, 1818) na bacia do rio Amazonas	106
<b>4. CONCLUSÕES GERAIS</b>	<b>160</b>

## RESUMO

No Neotrópico uma das maiores espécies de Characiformes é *Piaractus brachypomus*, amplamente distribuída nas bacias do Orinoco e Amazonas. É um peixe de comportamento migratório que desenvolve seu ciclo de vida nos ambientes lacustres e fluviais. De hábito alimentar onívoro, tem preferência por sementes o que o torna junto com outras espécies um dispersador de sementes importante para a manutenção da floresta tropical. Na aquicultura é a espécie nativa pioneira no desenvolvimento desta atividade em América do Sul, principalmente em países como Colômbia, Peru e Venezuela. Nas pescarias é uma espécie importante para o consumo local e regional, o que tem causado sobre-exploração das populações naturais. Por mais que existam estratégias de manejo para a conservação e aproveitamento a espécie, elas não estão causando efeitos positivos para a recuperação no meio natural. As informações biológicas a nível populacional são inexistentes, o que limita a gestão adequada deste recurso natural baixo o conceito de bacia e manejo transfronteiriço. O desenvolvimento de técnicas moleculares nos últimos tempos tem-se convertido em uma ferramenta apropriada para o conhecimento das características de uma população, sua dinâmica e estado de conservação. Neste estudo, realiza-se uma abordagem genético-populacional de *Piaractus brachypomus* em sua área de distribuição natural. O trabalho foi baseado na premissa de que a população é panmítica devido ao seu comportamento migratório, estratégia reprodutiva e ampla distribuição. Para o estudo foram coletados um total de 398 indivíduos provenientes de diferentes localidades das bacias Orinoco e Amazonas, os quais foram analisados com 7 microssatélites, a partir da transferibilidade de microssatélites desenvolvidos para espécies filogeneticamente próximas. Também foram utilizados os marcadores mitocondriais *Dloop* e *COI* para ajudar a suportar as análises populacionais em grande escala, assim como considerações morfológicas. Detectou-se alta estruturação entre as populações das bacias do Orinoco e Amazonas, com fluxo gênico restrito entre elas, além de características diagnósticas genéticas e morfológicas que diferenciaram as duas populações, o que permitiu delimitá-las como duas Unidades Evolutivas Significantes -*ESU*. A população da bacia do Orinoco, mostrou-se panmítica em toda sua área de distribuição ( $F_{ST}=0,044$ ) com moderada diversidade genética ( $H_e=0,66$ ) ao se comparar com outros peixes neotropicais. O fluxo gênico foi bidirecional e assimétrico ( $N_m=2,03$  a  $7,21$  imigrantes efetivos por geração), sendo a planície

conhecida como “delta interno” a que maior número de imigrantes recebe. O tamanho efetivo populacional médio foi de  $N_e=1675$ , com maior população localizada no Guaviare. Detectou-se um declínio populacional datado há 690 anos, que foi associado às variações ambientais da época como mudanças climáticas e fortes fenômenos *El Niño*. A população da bacia do Amazonas, apresentou uma diversidade genética alta ( $H_e=0,72$ ) ao se comparar com outros peixes Amazônicos. Sua população está moderadamente estruturada em duas unidades biológicas ( $F_{ST}=0,057$ ;  $K=2$ ) produto de barreiras geomorfológicas do passado durante a formação da região. A unidade biológica do oeste está associada a bacia sedimentária do Amazonas e a unidade biológica do leste está relacionada com os escudos cristalinos e uma zona de contato na calha principal Solimões–Amazonas e áreas adjacentes. O fluxo gênico mostrou interações complexas, assimétricas e um valor baixo ( $N_m= 0,85$  a  $4,75$  imigrantes efetivos por geração) ao se comparar com outros peixes migratórios Amazônicos, mas suficiente para manter a conexão da população. O tamanho populacional efetivo médio foi de  $N_e=1139$ , levemente menor à população do Orinoco, apesar da ampla área geográfica que ocupa. Detectou-se um declínio populacional datado há 2507 anos, que foi associado às fortes variações ambientais da época. Definidas e caracterizadas as duas *ESU* sugere-se o manejo separado para cada população de *Piaractus brachypomus*. Sugere-se que a população do Amazonas deve ter um manejo diferenciado concordante com as unidades biológicas e zona de contato, estabelecido de acordo com os territórios nacionais que elas ocupam. Enquanto que a população do Orinoco pode ter um manejo conjunto entre os dois países que formam a região, baseado em uma população panmítica.

## ABSTRACT

In the neotropics, *Piaractus brachypomus* is one of the largest Characiforme species, widely dispersed throughout the Orinoco and Amazon Basins. It is a migratory fish that carries out its lifecycle in fluvial and lacustrine environments. Its omnivorous feeding habits focus on seeds, making it, along other species, an seed disperser very important to the tropical forest. In aquiculture it is a pioneer species in the development of this activity in South America, mostly in countries like Colombia, Peru and Venezuela. As a fishing resource the species is very important for local and regional consumption, what drives over-exploration of natural populations. Management strategies for conservation and use, although in practice, do not show positive effects for its recovery in the natural environment. The lack of biological information in a populatin level does pose a limit on the correct management of this natural resource under the concepts of basin and trans-border management. The development of molecular techniques in the last years have delivered appropriate tools for the understanding of a population, its dynamics and conservation status. In this study, an genetic-populational approach of *Piaractus brachypomus* within its natural range was carried out. This work was based upon the premisse that the population is panmictic by its migratory behavior, reproductive strategy and wide distribution. A total of 398 specimens, from different sites in the Amazon and Orinoco basins, were collected and then analyzed with 7 microsatellites in total, by the transferability of microsatellites developed for phylogenetically near species. Also used were mitochondrial *Dloop* and *COI* to support large scale population analysis and morphological considerations. Orinoco and Amazon basins populations were found to be highly structured, with restricted gene flow within them, and also genetical and morphological diagnostic features that differentiate between them, what makes possible to delimit each as a Significant Evolutionary Unit – SEU. Orinoco basin population has showed panmictic within all its range ( $F_{ST}=0,044$ ), with moderate genetic diversity ( $H_e=0,66$ ) when compared to other neotropical fish. Gene flow was bi-directional and asymmetric ( $Nm=2,03$  to  $7,21$  effective immigrant per generation), being the floodplain known as the “internal delta”, that which receives the greater number of immigrants. The average effective population size was  $N_e=1675$ , the largest population located in the Guaviare basin. It was detected a populational decline 690 years ago, what has been associated to then current environmental variations such as climatic changes and strong *El Niño* events. The Amazon basin population showed high genetic diversity

( $H_e=0,72$ ) when compared to other amazonian fish. It is moderately structured in two biological structures ( $F_{ST}=0,057$ ;  $K=2$ ), a product of past geomorphological barriers during the region formation. The west biological unit is associated with the Amazon sedimentary basin. the east biological unit is associated with the crystalline shields and a contact zone in the main Solimões-Amazonas river and its adjacent areas. Gene flow showed complex and asymmetrical interactions, and was low ( $Nm= 0,85$  a  $4,75$  effective immigrants per generation) when compared to other migratory Amazonian fish, but sufficient to maintain population connectivity. Effective population size was  $N_e=1139$ , slightly lower than the Orinoco population, despite the its wide range. It was detected a populational decline dated by 2507 years ago, what is associated to strong variations in the environment then. As the two *SEU* were defined and characterized it is suggested that management be separated for each *Piaractus brachypomus* population. It is suggested that the Amazon basin population must have a differentiated management according to the biological units and contact zones, to be established according to the national territories that they occupy. The Orinoco basin, otherwise, may have a integrated management between the two countries that make up the region, based upon the fact that the population is panmictic.

## LISTA DE FIGURAS

### Introdução

- Figura 1.** Exemplar adulto de *Piaractus brachypomus*.....2
- Figura 2.** Cardumes de juvenis de serrassalmídeos: *Pygocentrus*, *Mylossoma*, *Piaractus* e *Colossoma* em áreas alagadas.....2
- Figura 3.** Diferenciação do opérculo.....3
- Figura 4.** Distribuição geográfica de *Piaractus brachypomus* nas bacias do Amazonas e Orinoco.....4
- Figura 5.** Tamanhos de captura de *Piaractus brachypomus* na área de fronteira Peru-Colômbia. Brasil.....5
- Figura 6.** Estatística de cultivo da pirapitinga.....6

### Capítulo I

- Figura 1.** Localização das coletas para análises de microssatélites na área de distribuição de *Piaractus brachypomus*.....52
- Figura 2.** Localização das coletas para análises de mitocondrial na área de distribuição de *Piaractus brachypomus*.....53
- Figura 3.** Resultados de *Structure* na área de distribuição de *Piaractus brachypomus*....54
- Figura 4.** Rede haplotípica da população de *Piaractus brachypomus* em sua área de distribuição a partir da região *Dloop*.....55
- Figura 5.** Arvore filogenética da população de *Piaractus brachypomus* a partir de o gene COI..... 56
- Figura 6.** Localização dos pontos homólogos e distribuição do padrão de *cerchas*.....57
- Figura 7.** Análises de componentes principais.....58
- Figura 8.** Histograma de correlação das variáveis morfológicas nos componentes.....59
- Figura 9.** Área de distribuição para cada ESU de *Piaractus brachypomus*.....60

### Capítulo II

- Figura 1.** Localização das coletas na bacia do rio Orinoco.....101
- Figura 2.** Resultados de *Structure* para bacia do Orinoco.....102

<b>Figura 3.</b> Demografia histórica de <i>Piaractus brachypomus</i> na bacia do Orinoco.....	103
<b>Figura 4.</b> Diagrama de fluxo gênico da população de <i>Piaractus brachypomus</i> na bacia do rio Orinoco.....	104
<b>Figura 5.</b> Fluxo gênico da população de <i>Piaractus brachypomus</i> na bacia do rio Orinoco.....	105

### Capítulo III

<b>Figura 1.</b> Localização das coletas na bacia do Amazonas.....	154
<b>Figura 2.</b> Resultados de <i>Structure</i> para a bacia do Amazonas.....	155
<b>Figura 3.</b> Diagrama de fluxo gênico históricos da população de <i>Piaractus brachypomus</i> na bacia do rio Amazonas.....	156
<b>Figura 4.</b> Diagrama detalhado do fluxo gênico da população de <i>Piaractus brachypomus</i> na bacia do rio Amazonas.....	157
<b>Figura 5.</b> Demografia histórica da população de <i>Piaractus brachypomus</i> na bacia do Amazonas.....	158
<b>Figura 5.</b> Unidades Biológicas ( <i>UB</i> ) de <i>Piaractus brachypomus</i> na bacia Amazônica....	159

## LISTA DE TABELAS

### Introdução

<b>Tabela 1.</b> Estratégias de manejo pesqueiro para <i>Piaractus brachypomus</i> .....	6
--	---

### Capítulo I

<b>Tabela 1.</b> Marcadores moleculares usados nas análises da população de <i>Piaractus brachypomus</i> .....	45
--	----

<b>Tabela 2.</b> Valores de atribuição Q.....	46
---	----

<b>Tabela 3.</b> Análise de Variância Molecular AMOVA para <i>Piaractus brachypomus</i> (Orinoco-Amazonas).....	47
---	----

<b>Tabela 4.</b> Estimções de parâmetros demográficos de <i>Piaractus brachypomus</i> . .....	48
--	----

<b>Tabela 5.</b> Descrição das variáveis representadas no padrão de <i>cerchas</i> construído entre os pontos homólogos.....	49
--	----

<b>Tabela 6.</b> Análises de Agregação Populacional -PAA para a região <i>Dloop</i> em <i>Piaractus brachypomus</i> .....	50
---	----

<b>Tabela 7.</b> Análises de Agregação Populacional -PAA do gene <i>COI</i> em <i>Piaractus brachypomus</i> .....	51
---	----

### Capítulo II

<b>Tabela 1.</b> Marcadores moleculares usados nas análises da população de <i>Piaractus brachypomus</i> na bacia do Orinoco.....	93
---	----

<b>Tabela 2.</b> Alelos privados.....	94
---------------------------------------	----

<b>Tabela 3.</b> Caracterização genética de <i>Piaractus brachypomus</i> (Orinoco).....	95
---	----

<b>Tabela 4.</b> Análise de Variância Molecular AMOVA para <i>Piaractus brachypomus</i> (Orinoco).....	96
--	----

<b>Tabela 5.</b> Diversidade genética para peixes de águas doces.....	97
---	----

<b>Tabela 6.</b> Relação par a par de <i>FST</i> entre as localidades.....	98
--	----

<b>Tabela 7.</b> Taxa de imigração e <i>theta</i> por localidade na bacia do Orinoco.....	99
---	----

<b>Tabela 8.</b> Fluxo gênico e tamanho efetivo populacional.....	100
---	-----

### Capítulo III

<b>Tabela 1.</b> Marcadores moleculares usados nas análises da população de <i>Piaractus brachypomus</i> na bacia do Amazonas.....	142
<b>Tabela 2.</b> Alelos privados .....	143
<b>Tabela 3.</b> Caracterização genética de <i>Piaractus brachypomus</i> .....	144
<b>Tabela 4.</b> Continuidade caracterização genética de <i>Piaractus brachypomus</i> .....	145
<b>Tabela 5.</b> Continuidade caracterização genética de <i>Piaractus brachypomus</i> .....	146
<b>Tabela 6.</b> Análise de Variância Molecular AMOVA para <i>Piaractus brachypomus</i> .....	147
<b>Tabela 7.</b> Relação par a par de $F_{ST}$ entre as localidades.....	148
<b>Tabela 8.</b> Taxa de imigração e valor de $\Theta$ por localidade na bacia do Amazonas.....	149
<b>Tabela 9.</b> Continuidade taxa de imigração e valor de $\Theta$ por localidade na bacia do Amazonas.....	150
<b>Tabela 10.</b> Fluxo gênico e tamanho efetivo populacional.....	151
<b>Tabela 11.</b> Diversidade genética para peixes de águas doces.....	152
<b>Tabela 12.</b> Valores de atribuição ( $Q$ ) dos indivíduos de cada localidade.....	153

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

Na grande bioregião Neotropical o núcleo da alta biodiversidade localiza-se no sistema Amazônico, o maior sistema interconectado de águas doces do planeta (Albert et al. 2011). Formado pela bacia do Amazonas e suas regiões adjacentes: Orinoco, sistema Essequibo-Guiana e os sistemas fluviais que os interconectam (Lowe-McConnell, 1987; James & Reis, 2011), abriga cerca de 65% da ictiofauna Neotropical (James & Reis 2011). Sua complexa diversificação tem sido altamente associada com a história geológica da formação dos ecossistemas (Wesselingh & Hoorn 2011) refletida em parte na estreita relação entre os grupos de peixes nos sistemas hidrográficos que apresentam um padrão de divergência alopátrica (Vari 1988).

Os Characiformes, a ordem com maior diversidade Ictíca no Neotrópico (1700 espécies) é um claro exemplo desse tipo de diversificação com variadas formas, tamanho corporal e nichos ecológicos (James & Reis 2011; Oliveira et al. 2011). Dentro dos grandes peixes do grupo dos Characiformes destaca-se o *Piaractus brachipomus*, o segundo maior peixe da família Serrasalminidae (Ortí & Meyer 1997; Calcagnotto et al. 2005; Javonillo et al. 2010; de Carvalho et al. 2011) amplamente distribuído nas bacias do Amazonas e Orinoco (Machado-Allison 1982; Taphorn. 2003; Novoa 2002; Barthem & Goulding 2007; Reis et al. 2003) e reportada no rio Essequibo (Watkins et al. 2004) mesmo alguns autores mencionem que a espécie não é nativa desta bacia (Loubens & Panfili 2001). Desde sua descrição taxonômica original feita por Cuvier (1818) a identificação é confusa devido a descrições incompletas, e a utilizações de formas juvenis e adultos separadamente (Machado-Allison 1982). Inconsistências como essas são refletidas nas numerosas sinonímias que apresenta a espécie (13 reportadas) exceto aquelas que têm sido por erro ortográfico (Forse & Pauly 2013).

Nesta pesquisa se faz uma análise da espécie a nível populacional em sua área de distribuição usando marcadores moleculares, com o fim de avaliar a diversidade genética nas bacias do Orinoco e Amazonas. Se parte do princípio que a espécie é uma só população biológica pelo que as coletas são distribuídas ao longo das duas bacias, e a amostragem se faz sem ter em conta o tamanho do peixe e identificando-o pelas suas características morfológicas.

## 1.2. Características da espécie

*Piaractus brachypomus* caracteriza-se pela forma romboidal de cor parda cinza no dorso e lados do corpo, o abdômen é esbranquiçado com manchas cor alaranjada de tonalidade leve (Machado-Allison 1982; dos Santos et al. 2006) (Figura 1).



Figura 1. Exemplar adulto de *Piaractus brachypomus*.

Os jovens apresentam coloração mais clara com tonalidade vermelha intensa na parte anterior do abdômen e nadadeiras anal e caudal com padrão muito similar às piranhas (*Pygocentrus* spp), pacus (*Mylossoma* spp) e tambaquis (*Colossoma macropomum*) com quem vivem em simpatria formando cardumes nas áreas alagadas (Machado-Allison 1987; Taphorn B. 2003; Araujo-Lima 1984). A diferença de *Piaractus brachypomus* com os outros juvenis da família é a presença de um ponto preto opercular em espécimes de aproximadamente 10 mm de comprimento padrão (Taphorn. 2003) (Figura 2).

Suas movimentações em cardume foram documentadas por Goulding (1979); Novoa (2002); Loubens & Panfili (2001) e Van Damme et al. (2011) em diferentes áreas do Amazonas e Orinoco. É considerada uma espécie migradora que se desloca para se reproduzir (Barthem & Fabré 2004) e catalogada por Usma et al. (2009) e Van Damme et al. (2011) como um peixe de medianas migrações.

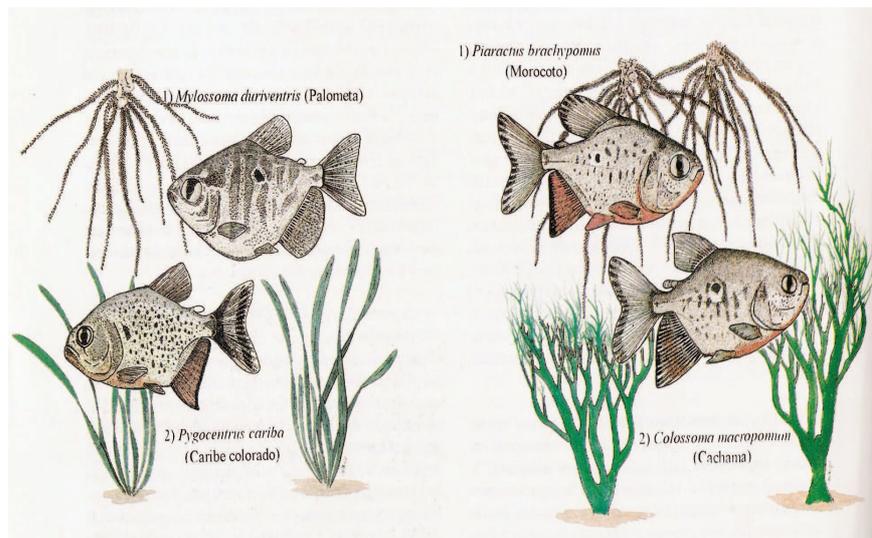


Figura 2. Cardumes de juvenis de serrassalmídeos: *Pygocentrus*, *Mylossoma*, *Piaractus* e *Colossoma* em áreas alagadas. Fonte: (Machado-Allison 1987).

Morfologicamente *Piaractus brachipomus* diferencia-se de *Colossoma macropomum* com quem vive em simpatria por possuir entre 78 a 90 escamas na linha lateral, o pré-maxilar com duas fileiras de dentes cônicos, devido ao pouco número de branquiospinhos que possui (37 no primeiro arco branquial) apresenta menor capacidade de filtração quando comparado com *Colossoma macropomum*. A nadadeira dorsal tem dois espinhos, mas a nadadeira adiposa não apresenta raios ossificados. O opérculo é mais estreito com relação ao opérculo do *Colossoma macropomum* (Taphorn 2003) (Figura 3).

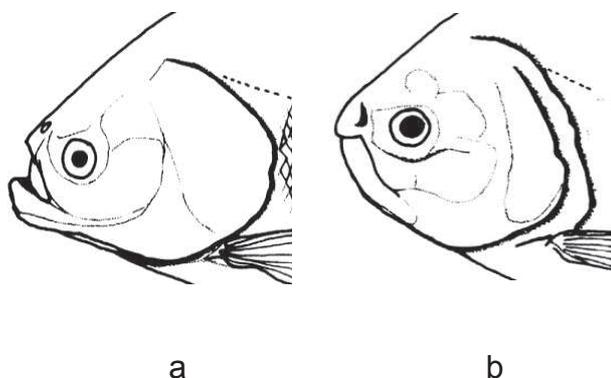


Figura 3. Diferenciação do opérculo a) Opérculo de *Colossoma macropomum*; b) opérculo estreito de *Piaractus brachipomus*. Fonte: (Taphorn 2003)

### **1.3. Aspectos biológicos e ecológicos de *Piaractus brachypomus***

Estudos da história natural só foram realizados por Machado-Allison (1982) e Loubens & Panfili (2001), mas a maioria do conhecimento relacionado a espécie vem de estudos biológicos pesqueiros e observações durante seu cultivo.

*Piaractus brachypomus*, como a maioria dos peixes migradores tem estratégia reprodutiva tipo  $r^2$  se caracteriza por ter gerações de vida-longa, alta fecundidade e baixa alocação de energia na proteção da cria (Winemiller & Taphorn 1989). As fêmeas produzem entre 200.000 a 1.500.000 ovócitos que são depositados no canal principal do rio (Novoa 2002; Landines-Parra & Mojica-Benítez 2005).

Barthem & Fabré (2004) agruparam *Piaractus brachypomus* dentro das espécies migradoras de planície, as quais as definem como peixes que migram sazonalmente com fins reprodutivos, trófico ou de dispersão, conforme o nível do rio. Cumprem parte de seu ciclo de vida nos lagos, no período de enchente, onde se alimentam e crescem intensamente. Alguns peixes permanecem nos lagos residindo nas áreas alagadas antes de iniciarem sua migração no rio. Tem desova total no rio, alta fecundidade e tendência de alto fluxo genético entre grupos de diferentes sistemas fluviais.

Segundo Araujo-Lima (1984) as larvas podem alcançar distâncias de 700 km desde sua origem, sendo essa dispersão à deriva uma forma de manter o equilíbrio dos peixes que migram.

### **1.4. Distribuição geográfica da espécie e nomes comuns**

*Piaractus brachypomus* é uma espécie amplamente distribuída nas bacias do rio Amazonas (Goulding 1979; Barthem & Goulding 2007; Maldonado-Ocampo et al. 2008), rio Orinoco (Novoa 2002; Taphorn 2003; Lasso et al. 2004) e rio Essequibo (Watkins et al. 2004) reportada principalmente em rios de águas brancas e claras (Barthem & Goulding 2007) (Figura 4).

De acordo com países onde a espécie ocorre, pode mudar o nome comum conhecendo-se assim: pirapitinga ou caranha no Brasil; cachama blanca ou paco em Colômbia, cachama blanca ou morocoto na Venezuela; paco no Peru, cachama no

Equador e tambaqui na Bolívia (Taphorn 2003; Carvajal-Vallejos & Zeballos-Fernández 2011).



Figura 4. Distribuição geográfica de *Piaractus brachypomus* nas bacias do Amazonas e Orinoco. Fonte: Goulding et al. (2003); Taphorn (2003).

### 1.5. Pesca e aquicultura

A espécie é comumente utilizada no consumo local, sendo pouco frequente nos desembarques comerciais e muitas vezes se agrupa com *Colossoma macropomum*. No Amazonas e Orinoco suas capturas são realizadas durante o ano todo, sendo mais frequente durante as águas descendentes quando realiza as migrações (Novoa 2002).

Segundo dados de estatística pesqueira da Colômbia, na região Amazônica (área de fronteira Peru, Brasil e Colômbia) a espécie está sendo sobre-explorada. Reporta-se que nesta área o 97% dos exemplares são capturados com comprimento padrão de 29,9 cm, medida menor de que o tamanho médio de captura regulamentar (51 cm) indicando uma possível sobrepesca de crescimento (CCI 2008) (Figura 5). Essas análises concordam com as observações de Goulding (1979) quem já tinha reportado a diminuição das capturas da espécie por causa da sobre exploração na localidade de Porto Velho no rio Madeira.

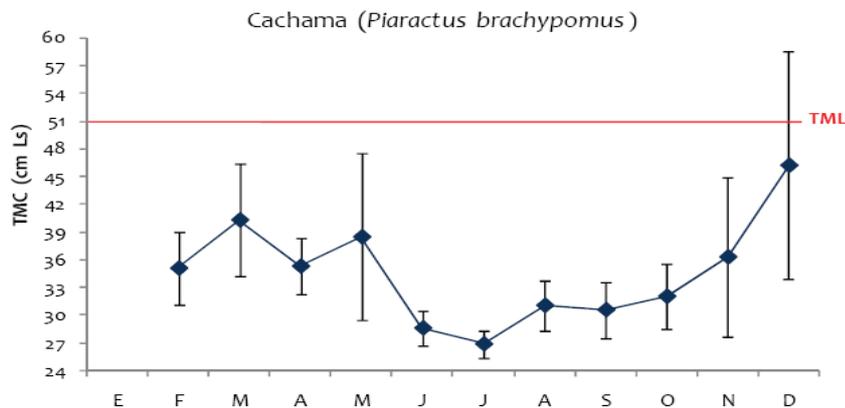


Figura 5. Tamanhos de captura de *Piaractus brachyomus* na área de fronteira Peru-Colômbia. Brasil. Fonte (CCI 2008).

Igualmente na bacia do Orinoco reporta-se diminuição na produção pesqueira. Na Colômbia por exemplo, 67,3 % dos indivíduos são capturados com comprimento padrão menor (45,8 cm) em relação ao tamanho mínimo de captura (51 cm) (CCI 2008).

Os dados estatísticos pesqueiros revelam que a espécie pode estar passando por uma condição crítica de conservação, no entanto Mojica et al. (2012) mencionam que o conhecimento biológico e ecológico em vida silvestre não é suficiente para sua inclusão no livro vermelho de peixes de águas doces. Embora, existem políticas pesqueiras que pretendem garantir sua proteção elas não estão padronizadas nos países onde a espécie ocorre (Tabela 1).

Tabela 1. Estratégias de manejo pesqueiro para *Piaractus brachyomus*.

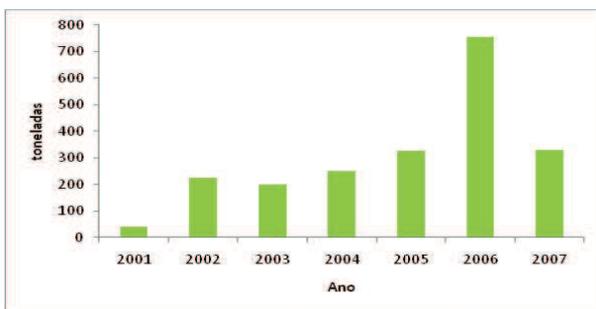
Bacia	País	Norma de proteção	
		Tamanho de captura	Época de defeso
Orinoco	Colômbia	51 cm CP	1 maio – 30 junho
	Venezuela	55 cm CT	Domingo de ressurreição – 31 de julho
Amazonas	Colômbia	51 cm CP	Ausência de legislação
	Perú	40 cm CZ	Ausência de legislação
	Brasil	Ausência de legislação	15 de novembro a 15 de março

CP= comprimento padrão, CT= comprimento total; CZ=comprimento zoológico

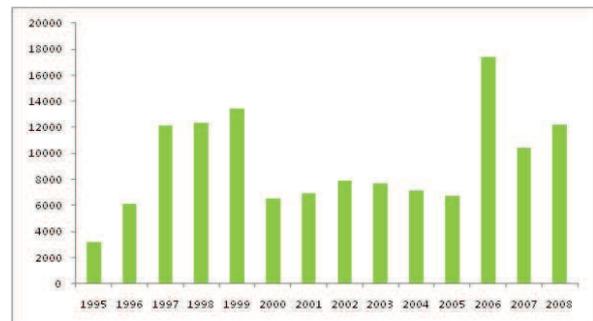
Com relação à aquicultura, no Brasil a pirapitinga é cultivada na região Amazônica nos estados do Amazonas, Rondônia, Acre, Pará e Amapá. Fora de sua área de distribuição natural essa espécie também é cultivada no Rio de Janeiro (IBAMA 2008) (Figura 6a).

*Piaractus brachypomus* foi a espécie pioneira na aquicultura de peixes nativos em países como Peru, Bolívia, Equador, Colômbia e Venezuela, sendo atualmente a mais cultivada. Em Colômbia por exemplo o cultivo cresceu de 3.181 toneladas/ano em 1995 para 12.189 toneladas/ano em 2008, sendo em 2006 o ano com maior produção com 17.415 toneladas (CCI 2008), dez vezes maior que o que produz o estado do Amazonas no Brasil (Figura 6b).

Pode-se considerar, que a criação desta espécie é uma prática alternativa de produção de proteína nas zonas rurais. Atividade que diminui a pressão de pesca ajudando a conservar as populações naturais.



(a)



(b)

Figura 6. Estatística de cultivo da pirapitinga. a) Brasil (IBAMA 2008) b).Colômbia (CCI 2008).

## 1.6. Estudo e aplicação da genética nos recursos pesqueiros

Dos recursos naturais os peixes é o recurso mais importante como alimento para o ser humano. Eles são fonte de proteína para muitas populações e importantes na economia de vários países. Nos últimos tempos a diminuição dos recursos pesqueiros faz parte da preocupação mundial, sendo esta diminuição ocasionada pelas atividades humanas tais como: poluição, sobre exploração pesqueiras, destruição do habitat, bloqueio das rotas migratórias e outros desenvolvimentos humanos, que causam

alteração da diversidade genética do recurso natural (Çiftci & Okumus 2002).

Medir a diversidade genética de uma população pesqueira é essencial para interpretação, entendimento e gestão efetiva destas populações ou estoques (Okumus & Çiftci 2003). Em longo prazo a utilidade de manter a diversidade genética é dar a população habilidade para se adaptar a mudanças ambientais e antropogênicas (Kapuscinski & Miller 2007). Por estas razões a pesquisa com genética molecular é um bom suporte para a gestão deste recurso natural tão importante.

Diversas técnicas genéticas desenvolvidas nas últimas décadas permitem o estudo da diversidade genética das populações e marcadores moleculares atualmente são os mais utilizados para o estudo de populações de peixes, sendo as três classes: 1) Alozymas, 2) DNA mitocondrial, 3) DNA nuclear (Okumus & Çiftci 2003). Destes, dois são utilizados no desenvolvimento deste estudo: o DNA mitocondrial e o DNA nuclear.

#### **1.6.1. DNA mitocondrial**

O genoma mitocondrial, como seu nome indica, encontra-se aderido à matriz interna da mitocôndria. Presente em cópias múltiplas por organela numa organização simples e de tamanho variado em diferentes espécies. De característica haploide e herdado da linhagem materna, permite traçar genealogias de fêmeas de uma população natural (Avisé et al. 1984). O DNA mitocondrial (DNAm) nos peixes é constituído por 13 genes codificadores de proteínas e uma região não codificadora denominada região controle o *D-loop*. Em peixes, esta região é constituída em torno de 1100 pares de bases (Meyer 1993). Comparada com outras regiões do DNAm a região controle apresenta taxa de mutação muito mais elevada, devido ao acúmulo de substituições nucleotídicas ser muito mais rápido (Meyer et al. 1990). Por causa de sua elevada variabilidade, a região controle tem sido amplamente utilizada para análises de estrutura populacional e relação entre diferentes espécies de peixes

Outras regiões do DNAm são altamente utilizadas para identificação de organismos que pertencem a uma espécie em particular. Hebert et al. (2003) propõe a pequena região (648 pb) do gene *Cytochrome c oxidase subunit I* (COI) conhecida como DNA *Barcoding* como marcador universal. Isso porque esta sequência é variável entre espécies e

relativamente invariável dentro de espécies. Em peixes o gene tem sido altamente eficiente na identificação de espécies marinhas e de águas doces, com uma taxa de sucesso de 90% (Pereira et al. 2013).

### **1.6.2. DNA nuclear: microssatélites**

Chamados também de *Simple Sequence Repeats* (SSR) são repetições curtas que se repetem em série (em *tandem*) cujo comprimento está entre 1 a 10 pares de bases (Goldstein & Schlotterer 1999). Nas extremidades de um locus de microssatélites são encontradas regiões denominadas de regiões flaqueadoras (ou regiões adjacentes). Estas regiões são conservadas dentro das espécies e ainda às vezes a níveis taxonômicos maiores, mas sua afinidade decresce à medida que aumenta o tempo de separação entre elas (Moore et al. 1990; Fitzsimmons et al. 1995). Por isso, devido homologia encontrada nas sequências flaqueadoras, os *primers* desenvolvidos para uma espécie também podem ser amplificados em espécies relacionadas (Moore et al. 1991). Os microssatélites, possuem uma taxa de mutação na ordem de  $10^{-3}$  e  $10^{-6}$  por loco por gameta por geração, em comparação com outras regiões do genoma (Schlotterer 2000). Por ser um dos marcadores mais variáveis, não codificantes, considerados por ter seleção neutra e herança mendeliana é um dos marcadores genéticos mais populares usados para identificação de parentesco e estudos populacionais (Okumus & Çiftci 2003).

### **1.7. Estudos genéticos relacionados**

A nível genético, a espécie tem sido estudada isoladamente com diversos interesses. O primeiro estudo, foi realizado por Ortí et al. (1996) a partir de um estudo filogenético das piranhas, nele determina-se o número cromossômico para *Piaractus brachypomus* como  $2n=54$ , não havendo variação no número diploide quando comparado com as espécies filogeneticamente próximas *Colossoma* e *Mylossoma*, localizando o clado como basal na topologia dos Serrasalminidae. Ainda no Brasil foi realizado um estudo citogenético de cinco espécies de *Serrasalminidae*, o que indicou grande similaridade cariotípica entre *P. brachypomus* e *P. mesopotamicus* em diversos marcadores citogenético, sendo as regiões organizadoras de nucléolo mais eficiente para a

diferenciação destas espécies (Baroni 2006).

Na Bolívia foi realizado por Aliaga (2004) uma pesquisa sobre variabilidade genética de *Colossoma macropomum* e *Piaractus brachypomus* na região do alto Madera (Amazônia boliviana), usando *íntrons* para diferenciar as espécies e detectar introgressão genética entre elas, além de avaliar a panmixia de cada população. O estudo, mostrou que as espécies são claramente diferenciadas e não apresentam introgressão, e concluiu que *Piaractus brachypomus* tem maior intercâmbio gênico e capacidade migratória que sua espécie irmã *Colossoma macropomum*. O estudo é a primeira aproximação a um estudo populacional mas a área do estudo é reduzida ao se comparar com ampla distribuição que a espécie tem na bacia do Amazonas, não oferecendo resultados satisfatórios com relação à dinâmica populacional.

Na Colômbia foi realizado um estudo genético de *Piaractus brachypomus* a partir de exemplares de criação, com o fim de conhecer o nível da diversidade genética da espécie para o manejo em viveiros e futuros programas de repovoamento. Para isso foram utilizados microssatélites desenvolvidos para *Piaractus mesopotamicus*. No estudo estimaram-se valores de heterozigoticidade de 46,8% e 54,2%, mencionando que a população não está afetada por seleção artificial e os indivíduos são aptos para programas de melhoramento genético e conservação da espécie (Pineda et al. 2006). Mesmo que o estudo seja interessante por seus objetivos, ele não tem dados provenientes das espécies silvestres para comparar e saber exatamente o nível da variação genética dos exemplares em cativeiro e determinar assim se são apropriados para projetos de conservação da espécie no ambiente natural.

## 2. OBJETIVOS E HIPÓTESES

### 2.1. Objetivos

#### 2.1.1. Objetivo geral

Estimar e avaliar a diversidade gênica e sua distribuição na pirapitinga (*Piaractus brachypomus*) nas bacias do Amazonas e do Orinoco.

#### 2.1.2. Objetivos específicos

- Estimar e caracterizar a diversidade genética de *Piaractus brachypomus* em diferentes localidades das duas bacias.
- Testar a existência da estrutura populacional de *Piaractus brachypomus* nas bacias do Amazonas e Orinoco.
- Estimar os níveis do fluxo gênico de *Piaractus brachypomus* dentro e entre as bacias do Amazonas e Orinoco.
- Testar quais fatores ecológicos e geológicos podem explicar a existência da estrutura, caso a estrutura seja encontrada.
- Sugerir algumas estratégias de manejo e conservação para a espécie na área de estudo.

### 2.2. Hipóteses

H<sub>0</sub>: A diversidade genética da pirapitinga não é diferente entre as localidades amostradas dentro das bacias e nem entre elas.

H<sub>1</sub>: A diversidade genética da pirapitinga é diferente entre as localidades amostradas de cada bacia.

H<sub>2</sub>: A diversidade genética é diferente entre bacias, mais não entre localidades de cada bacia.

H<sub>0</sub>: O *Piaractus brachypomus* não apresenta estrutura populacional, ela é panmítica.

H<sub>1</sub>: O *Piaractus brachypomus* apresenta estrutura populacional dentro e entre as

bacias.

H<sub>2</sub>: O *Piractus brachypomus* apresenta estrutura populacional entre as duas bacias, mais não dentro das bacias.

H<sub>0</sub>: O fluxo gênico é igual entre todas as localidades amostradas para *Piractus brachypomus*.

H<sub>1</sub>: O fluxo gênico de *Piractus brachypomus* é consistente com o modelo de isolamento por distancia.

H<sub>2</sub>: O fluxo gênico de *Piractus brachypomus* é maior entre localidades amostradas dentro de cada bacia que entre as bacias.

H<sub>3</sub>: O fluxo gênico de *Piractus brachypomus* entre a bacia Amazônica e Orinoco é inexistente, mas existe entre as localidades amostradas dentro de cada bacia.

H<sub>4</sub>: O fluxo gênico de *Piractus brachypomus* entre localidades amostradas é inexistente.

#### 4. BIBLIOGRAFIA

- Albert, J., Jr, H.B. & Reis, R., 2011. Species richness and cladal diversity. In J. . Albert & R. . Reis, eds. *Historical Biogeography of Neotropical Freshwater Fishes*. Berkeley and Los Angeles, California, pp. 89–104.
- Aliaga, C., 2004. *Variabilidad genética de Colossoma macropomum y Piaractus brachypomus en la región de alto Madera (Amazonía Boliviana) Para el análisis del polimorfismo de la longitud de secuencias intrónicas (EPIC-PCR)*. Universidad mayor de San Andrés.
- Araujo-Lima, C., 1984. *Distribuição espacial e temporal de larvas de Characiformes em um sector do rio Amazonas, próximo a Manaus*. Manaus: INPA & UFAM.
- Avise, J.C. et al., 1984. Characterization of mitochondrial DNA variability in a hybrid swarm between subspecies of bluegill sunfish (*Lepomis macrochirus*). *Evolution*, 38(5), pp.931–941.
- Baroni, S., 2006. *Análise citogenético-molecular do cariótipo em cinco espécies de Serrasalminae, Colossoma macropomum, Piaractus brachypomus, Piaractus mesopotamicus, Metynnis maculatus e Mylossoma duriventre (Teleostei, Characidae)*. Universidade de São Paulo, USP.
- Barthem, R.B. & Fabr e, N.N., 2004. Biologia e diversidade dos recursos pesqueiros da Amazônia. In M. L. Ruffino, ed. *A Pesca e os Recursos Pesqueiros na Amazônia Brasileira*. Manaus, Brazil: Ibama/ProV rzea, pp. 11–55.
- Barthem, R.B. & Goulding, M., 2007. *An Unexpected Ecosystem: The Amazon as Revealed by Fisheries*, St. Louis, MO, USA: Amazon Conservation Association and Missouri Botanical Garden Press.
- Calcagnotto, D., Schaefer, S.A. & DeSalle, R., 2005. Relationships among characiform fishes inferred from analysis of nuclear and mitochondrial gene sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 36, pp.135–153.
- Carvajal-Vallejos, F. & Zeballos-Fernández, A., 2011. Diversidad y distribución de los peces de la Amazonía boliviana. In P. Van Damme, F. Carvajal-Vallejos, & J. Molina-Carpio, eds. *Los peces y delfines de la Amazonía boliviana*. Cochabamba, Bolivia, pp. 101–148.
- De Carvalho, D.C. et al., 2011. Deep barcode divergence in Brazilian freshwater fishes: the case of the S o Francisco River basin. *Mitochondrial DNA*, 22(S1), pp.80–86.
- CCI, C.C.I., 2008. *Pesca y Acuicultura de Colombia 2008.*,
- Çiftci, Y. & Okumus, I., 2002. Fish Population Genetics and Applications of Molecular Markers to Fisheries and Aquaculture: I-Basic Principles of Fish Population Genetics. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 2, pp.145–155.
- Cuvier, G., 1818. Sur les Poissons du sous-genre Myl tes. *Mémoires du Mus um National d'Historie Naturelle, Paris*, 4, pp.44–456.
- Van Damme, P.A. et al., 2011. Peces migratorios de la Amazonía boliviana. In P. A. Van Damme, F. M. Carvajal-Vallejos, & J. Molina Carpio, eds. *Los peces y delfines de la Amazonía boliviana*. Cochabamba, Bolivia, pp. 149–202.

- Fitzsimmons, N.N., Moritz, C. & Moore, S.S., 1995. Conservation and dynamics of microsatellite loci over 300 million years of marine turtle evolution. *Molecular Biology and Evolution*, 12, pp.432–440.
- Forse, R. & Pauly, D., 2013. FishBase. *Piaractus brachypomus* (Cuvier, 1818).
- Goldstein, D.B. & Schlötterer, C., 1999. Microsatellites: Evolution and Applications. , p.352.
- Goulding, M., 1979. *Ecologia de Pesca do Rio Madeira*, Manaus, Brazil: INPA.
- Goulding, M., Barthem, R.B. & Ferreira, E.J.G., 2003. *The Smithsonian Atlas of the Amazon*, Washington, DC: Smithsonian Institution Press.
- Hebert, P.D.N., Ratnasingham, S. & DeWaard, J.R., 2003. Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proceedings of the Royal Society of London, B (Supplement), Biology Letters*, 270(suppl. 1), pp.S96–S99.
- IBAMA, 2008. <http://www.ibama.gov.br/recursos-pesqueiros/areas-tematicas/estatistica-peixes-ornamentais/>.
- James, A. & Reis, R., 2011. Introduction to Neotropical Freshwaters. In *Historical Biogeography of Neotropical Fishes*. pp. 3–19.
- Javonillo, R. et al., 2010. Relationships among major lineages of characid fishes (Teleostei: Ostariophysi: Characiformes), based on molecular sequence data. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 54, pp.498–511.
- Kapuscinski, A.R. & Miller, L.M., 2007. *Genetic Guidelines for Fisheries Management* University. S. Moen & M. Zhuikov, eds.,
- Landines-Parra, M. & Mojica-Benítez, H., 2005. Manejo y Reproducción de Carácidos. In P. . Daza, M. . Landines-Parra, & A. . Sanabria-Ochoa, eds. *Reproducción de peces en el trópico*. Bogotá, Colombia, pp. 91–103.
- Lasso, C. et al., 2004. Peces de la cuenca del río Orinoco. Parte I. Lista de especies y distribución por subcuencas. *Biota Colombiana*, 5(0124-5376), pp.95–157.
- Loubens, G. & Panfili, J., 2001. Biologie de *Piaractus brachypomus* (Teleostei: Serrasalmidae) dans le bassin du Mamoré (Amazonie bolivienne). *Ichthyology Exploration Freshwaters*, 12(0936-9902), pp.51–64.
- Lowe-McConnell, R.H., 1999. *Estudos Ecológicos de Comunidades de Peixes Tropicais*, São Paulo, Brazil: Edusp.
- Machado-Allison, A., 1982. Estudios sobre la subfamilia Serrasalminae (Teleostei, Characidae). Parte 1. Estudio Comparado de los Juveniles de las “Cachamas” de Venezuela (Genero: Colossoma y Piaractus). *Acta Biologica Venezuelana*, 11 (3), pp.1–101.
- Machado-Allison, A., 1987. *Los peces de lo Llano de Venezuela: un ensayo sobre su Historia Natural* Consejo De., Caracas, Venezuela.
- Maldonado-Ocampo, J.A., Vari, R.P. & Usma, J.S., 2008. Checklist of the freshwater fishes of Colombia. *Biota Colombiana*, 9(2), pp.143–237.
- Meyer, A., 1993. Evolution of mitochondrial DNA in fishes. In P. W. Hochachka & T. P.

Mommsen, eds. *Molecular Biology Frontiers: Biochemistry and Molecular Biology of Fishes*. Vol. 2. Amsterdam, Holland: Elsevier.

- Meyer, A. et al., 1990. Monophyletic origin of Lake Victoria cichlid fishes suggested by mitochondrial DNA sequences. *Nature*, 347, pp.550–553.
- Mojica, J.I. et al., 2012. *Libro Rojo de Peces Dulceacuícolas de Colombia*,
- Moore, S. et al., 1990. The conservation of dinucleotide microsatellites among mammalian genomes allows the use of heterologous PCR primer pairs in closely related species. *Genomics*, 10, pp.654–660.
- Moore, S.S. et al., 1991. The conservation of dinucleotide microsatellites among mammalian genomes allows the use of heterologous PCR primer pairs in closely related species. *Genomics*, 10, pp.654–660.
- Novoa, D., 2002. Los recursos pesqueros del eje fluvial Orinoco – Apure: presente y futuro. , p.143.
- Okumus, I. & Çiftçi, Y., 2003. Fish Population Genetics and Molecular Markers: II- Molecular Markers and Their Applications in Fisheries and Aquaculture. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 3, pp.51–79.
- Oliveira, C. et al., 2011. Phylogenetic relationships within the speciose family Characidae (Teleostei: Ostariophysi: Characiformes) based on multilocus analysis and extensive ingroup sampling. *BMC Evolutionary Biology*, 11(1), p.275.
- Ortí, G. et al., 1996. Patterns of nucleotide changes in mitochondrial ribosomal RNA genes and the phylogeny of piranhas. *Journal of Molecular Evolution*, 42, pp.169–182.
- Ortí, G. & Meyer, A., 1997. The radiation of characiform fishes and the limits of resolution of mitochondrial ribosomal DNA sequences. *Systematic Biology*, 46(1), pp.75–100.
- Pereira, L. et al., 2013. Can DNA barcoding accurately discriminate megadiverse Neotropical freshwater fish fauna? *BMC Genetics*, 14(20), pp.1471–2156.
- Pineda, H. et al., 2006. Evaluación del polimorfismo por microsatélites en individuos de *Piaractus brachypomus* (Characidae, Serrasalminae) provenientes do rio Meta, Colombia. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 19:1, pp.66–69.
- Reis, R.E., Kullander, S.O. & Ferraris, C.J., 2003. Check List of the Freshwater Fishes of South and Central America. , p.734.
- Dos Santos, G.M., Ferreira, E.J.G. & Zuanon, J.A.S., 2006. *Peixes comerciais de Manaus*, Manaus, AM, Brazil: IBAMA/Pró-Várzea.
- Schlötterer, C., 2000. Evolutionary dynamics of microsatellite DNA. *Chromosoma*, 109, pp.265–371.
- Taphorn B., D.C., 2003. The Characiform fishes of the Apure River drainage, Venezuela. *Biollania*, special ed, pp.1–124.
- Usma, J.S. et al., 2009. Peces dulceacuícolas migratórios en Colombia. In L. Germán Naranjo & J. D. Amaya Espinel, eds. *Plan Nacional de las Especies Migratorias*. Bogotá, Colombia: Ministro de Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial and World Wildlife Fund Colombia, pp. 103–131.

- Vari, R.P., 1988. The Curimatidae, a lowland Neotropical fish family (Pisces: Characiformes): distribution, endemism, and phylogenetic biogeography. In W. R. Heyer & P. E. Vanzolini, eds. *Proceedings of a Workshop on Neotropical Distribution Patterns*. Rio de Janeiro, RJ, Brazil: Academia Brasileira de Ciencias, pp. 343–377.
- Watkins, G. et al., 2004. The fish fauna of the Iwokrama forest. *Proceedings of the Academy of Natural Sciences of Philadelphia*, 154(1), pp.39–53.
- Wesselingh, F. & Hoorn, C., 2011. Geological Development of Amazon and Orinoco Basins. In *Historical Biogeography of Neotropical Fishes*. pp. 59–68.
- Winemiller, K.O. & Taphorn, D.C., 1989. La Evolución de las estrategias de vida de los peces de los llanos occidentales de Venezuela. *Biollania*, 6, pp.77–122.

## CAPITULO I



Foto: Sergio León.  
Parque Natural Amacayacu, Leticia, Amazonas, Colombia.

**TESTANDO A PANMIXIA E IDENTIFICANDO UNIDADES EVOLUTIVAS  
SIGNIFICATIVAS EM *Piaractus brachypomus* (CHARACIFORMES:  
SERRASALMIDAE)**

Maria Doris Escobar L.<sup>1,2</sup>, Juanita Andrade<sup>3</sup>, Izeni P. Farias<sup>1</sup>, Tomas Hrbek<sup>1,2</sup>

1. Laboratório de Evolução e Genética Animal, Departamento de Biología, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, AM, Brasil.
2. Pós-graduação em Diversidade Biológica, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, AM, Brasil.
3. Laboratório de Sistemática de Peces. Instituto de Zoología Tropical. Universidad Central de Venezuela, Caracas, Venezuela.

Palavras-chave: DNA mitocondrial, fluxo gênico, microssatélites, morfometria geométrica.

## ABSTRACT

*Piaractus brachypomus*, its known for being a widely distributed species in the basins of the Orinoco and Amazon, its migratory characteristics and expand distribution led to the believe that it was a single population. Using molecular analysis of microsatellite and mitochondrial (*Dloop* and *COI*) the panmixia of the specie. This theory was rejected due to the high differentiation in population structure ( $F_{ST}=0,2207$ ). Two stocks were defined ( $K=2$ ) that correspong to each of the basins they also showed mild morphological variances. The demographic parameters revealed that the diversification of two populations occurred recently and no gene flow occurs between them. Building on the results obtained during the study was defined both stocks as two Evolutionary Significant Units (*ESU*) that deserve independent management.

## RESUMO

*Piaractus brachypomus* tem sido conhecida como uma espécie amplamente distribuída nas bacias do Orinoco e Amazonas, suas características migratórias e ampla distribuição levou a pensar que se tratava de uma única população. A partir de análises moleculares de microssatélites e mitocondriais (*Dloop* e *COI*) testou-se a panmixia da espécie a qual foi rejeitada pela alta diferenciação na estrutura da população ( $F_{ST}=0,2207$ ). Definiu-se duas unidades populacionais ( $K=2$ ) que foram relacionadas a cada bacia e as quais também apresentaram leves variâncias morfológicas. Os parâmetros demográficos revelaram que não ocorre fluxo gênico entre as populações e que a diversificação ocorreu recentemente. Apoiados nos resultados obtidos durante o estudo, foram definidas duas unidades populacionais como duas Unidades Evolutivas Significantes (*ESU*) que merecem ter manejo independente.

## 1. INTRODUÇÃO

*Piaractus brachypomus* é uma espécie pertencente à ordem dos Characiformes e da família Serrasalminidae (Ortí & Meyer 1997; Calcagnotto et al. 2005; Oliveira et al. 2011), amplamente distribuída nas bacias do Orinoco e Amazonas Eigenmann & Allen (1942); Fowler (1942) e Machado-Allison (1982). A espécie é considerada migradora de grande porte (Novoa 2002; Goulding 1979; Loubens & Panfili 2001) e de importância comercial nas pesqueiras regionais nas duas bacias, assim como na aquicultura regional e nacional em Colômbia, Peru, Bolívia e Venezuela (Novoa 2002; Lasso et al. 2011). Da mesma forma, devido a seus hábitos alimentares tem sido considerada importante ecologicamente ao ser dispersadora de sementes (Machado-Allison 1982; Goulding 1989).

Estudos pesqueiros na Orinoquia e Amazônia colombiana reportam que as populações de *Piaractus brachypomus* têm diminuído drasticamente nos últimos anos (CCI 2008). Esta diminuição também foi reportada no alto rio Madeira, na Amazônia brasileira por Goulding (1979), indicando que a espécie era muito comum no mercado de Porto Velho (Rondônia, Brasil) e agora suas populações diminuíram por causa de sobrexploração pesqueira.

Mesmo que, de forma geral, existam estratégias de proteção para esta espécie marcadas dentro dos peixes comerciais (época de defeso) ou específicas (tamanho mínima de captura) nos países onde ela ocorre, estas são diferentes. Isso leva a questionar, se a gestão pesqueira atual está sendo efetiva para a recuperação das populações naturais.

Atualmente, a aplicação de técnicas genéticas, tem-se convertido em uma das principais ferramentas para os gestores da pesca para garantir a sustentabilidade das capturas pesqueiras e evitar o esgotamento do recurso (Reiss et al. 2009). Os estudos genéticos populacionais, passaram a ser um pré-requisito para o manejo moderno das pesqueiras, encaminhado à manutenção da diversidade genética e identificação das Unidades de Manejo ou Unidades Evolutivas Significativas como base a orientar questionamentos ecológicos e evolutivos, fundamentais no manejo e conservação dos recursos pesqueiros (Allendorf et al. 1987; Dudgeon et al. 2012).

Tais características estão relacionadas com formas próprias de variação genética, fisiológica e ecológica da espécie (Allendorf & Ryman 1987), atributo que permite que cada Unidade de Manejo ou Unidade Significativa Evolutiva, possa responder aos diversos fatores ambientais e/ou antropogênicos como: pressão pesqueira, degradação do habitat e competição com espécies invasoras (Allendorf et al. 1987; Stepiens 1995).

A chave da aplicação dos métodos genéticos na gestão dos recursos pesqueiros é avaliar em um nível molecular a diferença populacional para saber se justifica um manejo separado; considerações que também dependem das características biológicas e história populacional de cada espécie (Reiss et al. 2009)

A variabilidade genética pode ser detectada por meio do uso de diversos tipos de marcadores moleculares, com características e aplicações específicas. No caso de populações, marcadores moleculares tipo microssatélites são amplamente utilizados, pelas suas características codominantes, alto nível de polimorfismo, herança mendeliana, considerados não codificadores, alta taxa de mutação com relação a outras regiões e por serem abundantes no genoma (Schlötterer 2000).

Por outro lado, o DNA mitocondrial (*DNAm*), também pode ser usado como ferramenta para deduzir a história evolutiva do passado de populações e espécies (Ballard & Whitlock 2004). No entanto, a escolha do fragmento da região ou gene depende do interesse do estudo e da taxa evolutiva (Avice 2000). Para estudos populacionais e relação entre espécies, a região controle é a mais usada pela alta taxa de mutação que apresenta em comparação a outras regiões codificadoras da molécula (Meyer 1993).

Estudos genéticos populacionais em *Piractus brachypomus* não têm sido realizados em sua ampla área de distribuição. No entanto, dois foram desenvolvidos respondendo a questionamentos em nível local (rio Madeira) na Bolívia (Aliaga 2004), assim como para fins de criação e programas de repovoamento na Colômbia (Pineda et al. 2006).

Este estudo é a primeira análise em nível populacional abarcando a máxima área de distribuição da espécie nas bacias do Orinoco e Amazonas. Para isso, tem-se como objetivo testar a panmixia de *Piractus brachypomus* a partir de análises moleculares e morfológicas e identificar Unidades Significativas de Manejo em sua área de distribuição.

O estudo, se baseou no princípio que *Piaractus brachypomus* é uma espécie com alta vagilidade (capacidade de um organismo para se deslocar e dispersar na paisagem) que permite manter o fluxo gênico entre as populações das duas bacias formando uma única população.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 Coleta de amostras**

Amostras de nadadeira de *Piaractus brachypomus* provenientes de pescas artesanais foram coletadas em cinco localidades na bacia do Orinoco: 1- San José del Guaviare no rio Guaviare; 2-Puerto López no rio Meta; 3- Puerto Carreño no médio rio Orinoco; 4- San Fernando de Apure no rio Apure e 5-San Felix no baixo rio Orinoco, e quatro localidades da bacia do Amazonas: 1-Leticia, no rio Solimões, 2- Tefé, no rio Solimões, 3-Janauacá, no rio Solimões e 4- Santarém, no rio Amazonas que foram usadas para as análises com microssatélites. As localidades de 5- La Pedrera e 6- Japurá, no rio Japurá, 7-Itaituba, no rio Tapajós, 8- Guajará-Mirim, 9-Humaitá e 10-Borba no rio Madeira e 11-Boa Vista, no rio Parimé afluente do rio Branco foram acrescentadas para as análises com marcadores mitocondriais (Figuras 1 e 2).

As amostras foram preservadas em álcool 92,5%, enumeradas e integradas ao banco de dados de tecidos do laboratório de Evolução e Genética Animal – LEGAL, da Universidade Federal do Amazonas, Manaus (Amazonas, Brasil). Ao mesmo tempo, foram preservados dois exemplares de cada bacia com *voucher* para as análises morfológicas e depositados nas coleções de peixes do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia -INPA, Manaus, Brasil, e La Fundación La Salle, San Felix Venezuela.

### **2.2. Obtenção de dados**

#### **2.2.1. Extração de DNA, amplificação e genotipagem**

A extração de DNA foi realizada pelos métodos de CTAB 2% (Doyle & Doyle 1987) e Fenol Clorofórmio (Sambrook et al. 1989). A qualidade foi avaliada por comparação com um DNA padrão de concentração definida, em gel de agarose 0.8% corado com *GelRed (Biotium)*. A quantificação do DNA foi realizada por espectrofotometria em *Nanodrop 2000 Thermo-Scientific* e diluído a uma concentração final de 50 ng/ml.

Aplicou-se o método de transferibilidade a partir de microssatélites desenvolvidos para as espécies filogeneticamente próximas *Piaractus mesopotamicus* (Calcagnotto et al. 2001) e *Colossoma macropomum* (Santos et al. 2009). De um total de 16 microssatélites testados, foram escolhidos sete com características polimórficas. Os demais microssatélites apresentaram presença de alelos nulos em algumas localidades ou mostraram ser monomórficos, não sendo incluídos no estudo (Tabela 1).

A reação de cadeia de polimerase (PCR) foi usada para amplificação individual dos marcadores. Para microssatélites o volume total da reação foi de 10 µL com a seguinte condição: 2,3µL de ddH<sub>2</sub>O; 1,0µL de dNTP (2,5mM); 1,0µL MgCl (25mM); 1,0µL de Tampão 10X (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 1,0µL de *primer forward* (2mM); 1,5µL de *primer reverse* (2mM); 0,7µL de M13 (FAM); 0,5µL de Taq (1,0U) e 1,0µL de DNA (50ng).

As condições da PCR foram: ciclo primeiro de 30 repetições (10 s a 94°C, 30 s de temperatura de anelamento específico para cada *primer*, e extensão a 68°C por 40 s). Segundo ciclo de 20 repetições (10 s a 94°C, 30 s a 53°C e 30 s a 68°C), extensão final a 72°C por 30 minutos. O produto da PCR foi diluído em água deionizada conforme a concentração para uma melhor visualização. A amplificação foi verificada por o eletroforese através de gel de agarose 1%, usando 2,0µl do produto da PCR e 3,0µl de marcador *GelRed* (*Nucleic Acid Gel Stain*, de *Biotium*). A genotipagem foi realizada usando 1,0µl do produto da PCR diluído acrescentado 8,0µl de formamida e 1,0µl do padrão *ROX* (DeWoody et al. 2004) e aplicados no sequenciador automático *ABI 3130xl* (*Applied Biosystems, Inc., USA*). O tamanho dos alelos específicos para cada microssatélite foi estimado usando o programa *GeneMapper* versão 4.0 (*Applied Biosystems Inc., USA*).

Para análises dos genes mitocondriais usou-se os *primers* para *Dloop* mitocondrial (Sivasundar et al. 2001) e para COI (Ivanova et al. 2007) (Tabela 1).

A reação de amplificação teve um volume total de 15 µL com a seguinte condição: 6,2 µL de ddH<sub>2</sub>O, 1,5 µL de *cada primer* (2mM); 1,5 µ Tampão 10X (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 1,5 µL MgCl (25mM); 1,5 µL de dNTP (2,5mM); 0,3 µL de Taq (1,0U) e 1 µl de DNA (50ng). A reação de PCR consistiu de: 35 ciclos (60 s a 92°C, 35-50 s a temperatura de acordo ao *primer*, e 90-120 s a 68°C) e extensão final de 7 m a 72°C. O produto da PCR foi purificado usando *ExoSap-IT* (*USB Corporation*) seguindo as instruções do fabricante. O produto da PCR purificado foi sequenciado usando *Big Dye™ Terminator Kit V.3.1*.

(*Applied Biosystems*) de acordo ao fabricante, precipitação com EtOH/EDTA e carregado no sequenciador automático ABI 3130xl (*Applied Biosystems, Inc., USA*).

### **2.2.2. Dados morfométricos**

Com o objetivo de conhecer prováveis diferenças existentes entre os padrões morfológicos de indivíduos de cada bacia, realizou-se uma análise através da técnica de morfometria geométrica. Para isso, foram fotografados o perfil esquerdo de indivíduos de cada bacia pertencentes às coleções de peixes do Instituto Nacional de Pesquisas Amazônicas -INPA, Brasil e Instituto de Zoologia Tropical da Universidade Central de Venezuela -UCV.

Das fotografias digitais obteve-se uma imagem da vista lateral de 23 indivíduos da espécie com tamanho padrão entre 100 e 220 mm. Sobre cada imagem foram localizados 14 pontos homólogos (Figura 6) e transformados a coordenadas pelo programa *TPSDig* (Adams et al. 2004).

## **2.3. Análises de dados**

### **2.3.1. Verificação dos dados moleculares**

Inicialmente os resultados foram revisados através do programa *Micro-Checker* (Van Oosterhout et al. 2004) para verificar a ocorrência de alelos nulos, *stuttering* e *large allele dropout*. Posteriormente foram verificados uma segunda vez com o programa *FreeNA* (Chapuis & Estoup 2007), que estima a frequência dos alelos nulos para cada loco e população analisada de acordo com o algoritmo de Máxima Expectativa de Dempster et al. (1977), que estima o  $F_{ST}$  de Weir (1996) de qualquer conjunto de microssatélites que possam conter alelos nulos. O método usado para cada estimativa é chamado o método *ENA* (exclusão de alelos) (Chapuis & Estoup 2007) O método de correção por *ENA* corrige eficientemente o viés positivo induzido pela presença de alelos nulos na estimativa do  $F_{ST}$ . Os valores obtidos de  $F_{ST}$  com e sem a correção *ENA* permite realizar comparações estatísticas (diferenças significativas através do teste não paramétrico para amostras únicas de *Wilcoxon*) entre ambas as estimativas do estatístico  $F$ , para detectar o efeito deste tipo de alelos (viés das suas frequências) dentro de estimadores, o que em consequência poderá nos permitir identificar aqueles *loci* com alelos nulos cuja presença nas populações poderia afetar significativamente, portanto, devem ser excluídos das análises

Adicionalmente foi testado o desequilíbrio de ligação com ajuda do programa *Arlequin* 3.1 (Excoffier et al. 2005) aplicando 10000 permutações seguido da correção de *Bonferroni* (Rice 1989).

### **2.3.2. Análises de estrutura populacional de *Piaractus brachypomus***

Partindo do princípio que *Piaractus brachypomus* é uma população amplamente distribuída nas bacias do Orinoco e Amazonas, testamos a hipótese de existência de estruturação populacional na área geográfica que a espécie ocupa, a partir de dados moleculares de microssatélites e mitocondriais.

Com os dados de microssatélites, foi realizada a análise de estruturação populacional a partir da análise Bayesiana implementada no programa *Structure* 2.3.1. (Pritchard et al. 2000). Para isso foram realizadas dez corridas independentes usando o modelo de mistura (*admixture model*) que assume que as frequências alélicas em todas as localidades amostradas estão correlacionadas entre si, e Cadeia de Markov Monte Carlo (MCMC) com 50.000 permutações e 5.000 permutações de corte (*burnin*). O programa permite definir o número de *clusters* ou grupos biológicos existentes na população de acordo probabilidade de atribuição dos indivíduos em cada *cluster*. A observação dos resultados foi feita usando *Structure Harvester* (Earl & VonHoldt 2012) que adicionalmente permite determinar o *K* verdadeiro a partir do valor da máxima probabilidade (*log-likelihood*) (Falush et al. 2003).

Para o valor de *K* selecionado, estimou-se a proporção de atribuição (*Q*) das localidades amostradas dentro dos *clusters* detectados, e a proporção de atribuição individual *q* (proporção do genoma ancestral de cada indivíduo no *cluster*) usada como uma medida para a separação de cada grupo genético, obtidos no mesmo programa. Baseados na proposta de Barliani et al. (2007) usou-se como valor limite  $q \geq 0,90$  (90% de intervalo de probabilidade) que corresponderiam a indivíduos puros e  $q < 0,90$  menor indivíduos misturados.

Adicionalmente, por meio da Análise de Variância Molecular (AMOVA) testou-se a homogeneidade dos alelos na área de distribuição, determinando o grau de diferenciação a traves do índice de fixação *Fst* (Wright 1969) calculado no programa *Arlequin* 3.1 (Excoffier et al. 2005) com uma significância de 10.000 permutações.

As sequências dos genes da região controle (*Dloop*) e Citocromo Oxidase I (*COI*)

geradas foram visualizadas, alinhados por *ClustalW* (Thompson et al. 1996) e ajustados manualmente através do programa *BioEdit* (Hall 1999). Para o alinhamento usou-se como modelo as regiões equivalente de *Piaractus brachypomus* obtidas no *GenBank* (AF283960) e (JQ667515.1).

Com as sequências da região controle (*Dloop*) foi estimada as relações genealógicas entre os indivíduos. A estimativa genealógica entre os indivíduos das duas bacias se realizou a partir da reconstrução de uma árvore de máxima verossimilhança (*ML*) gerada no programa *Treefinder* (Jobb et al. 2004) usando o modelo evolutivo apropriado para os dados, estimado no mesmo programa. A topologia resultante foi visualizada no programa *Haploviewer* (Salzburger et al. 2011) que permite ter uma melhor observação do conjunto de haplótipos.

Além disso, com as sequências do gene Citocromo Oxidase I (*COI*) se fez uma reconstrução filogenética usando a metodologia de *Neighbor-Joining* (*NJ*) e modelo de *Kimura 2* parâmetros usando do programa *MEGA5* (Tamura et al. 2011).

### **2.3.3. Estimação de taxas de migração, efetivos populacionais e tempo de divergência**

A partir das sequências do gene *Dloop* foi aplicada uma análise de coalescência usando o programa *IMa2* (Hey & Nielsen 2007) que assume o modelo de isolamento com migração e opção migração entre populações amostradas a qual adota a panmixia na população ancestral (Hey & Nielsen 2007). O programa permite estimar os parâmetros: tamanho das populações descendentes ( $\theta$ ), taxa de imigração ( $m$ ) e tempo de separação das populações descendentes ( $t$ ). Sendo que o  $\theta$  ( $\theta$ ), é um parâmetro populacional relacionado com a quantidade de diversidade genética em uma população, pelo tamanho populacional e a taxa de mutação. Assim os valores obtidos resultaram de uma distribuição de probabilidade associada a cada parâmetro (diversidade, migração e tempo de compartilhamento ancestral), usados para explicar os padrões observados no presente. A análise de *Ima2* consistiu de 25 corridas independentes 10.000 MCMC e 1000 genealogias de corte (*burnin*). Para os cálculos foi assumido um tempo de geração da espécie de 3 anos (tempo de maturação das fêmeas) (Novoa 2002; Landines-Parra & Mojica-Benítez 2005) e taxa de evolução de  $1,1 \times 10^{-7}$  nucleotídeos por sítio por ano (Brown et al. 1993). Para a análise assumiu-se neutralidade molecular dos dados, ausência de estruturação em cada população e a não interação de outras populações

com a espécie de estudo.

#### **2.3.4. Análises morfométricas**

Com o fim de testar se existem diferenças morfológicas entre os indivíduos de cada bacia, analisou-se variáveis morfométricas de indivíduos das duas áreas geográficas utilizando a técnica de morfometria geométrica. Para este fim, foram empregados espécimens da coleção de peixes do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA, Brasil) e da coleção de peixes do *Instituto de Zoologia Tropical da Universidade Central de Venezuela (UVC)*.

Com base nos dados de morfometria, se fez a transformação de dados de coordenadas de pontos anatômicos a coordenadas *Procrustes* (Rohlf & Slice 1990) no programa *PAST 1.70* (Hammer et al. 2001), passando por eventos de translação, rotação e escalonamento com o fim de eliminar da análise morfométrica as diferenças na posição de cada exemplar na imagem e o efeito do tamanho (Zelditch et al. 2004).

Sobre os pontos homólogos construíram-se um padrão de marcas que corresponderam a 25 variáveis representativas da forma e contorno do peixe usando a alternativa geométrica *EDMA* (*Euclidean Distance Matrix Analysis*) (Tabela 5).

Cada uma das variáveis gerou uma distância entre um par de pontos homólogos que se incorporou numa análise de componentes principais (Blackith & Reyment 1971). Este tipo de análise quantifica a variação morfológica entre as populações e identifica a contribuição das variáveis na diferenciação.

#### **2.3.5. Perfil molecular**

Com o fim de realizar um perfil de cada população, foram tabulados os atributos moleculares identificados como variáveis diagnósticas dos indivíduos de cada bacia, a partir dos resultados obtidos dos genes mitocondriais.

Os perfis permitiram comparar e dividir os grupos de acordo com aqueles atributos, aplicando o método de Análises de Agregação Populacional (*Population Agregation Analysis* -PPA) (Davis & Nixon 1992). A detecção dos sítios variáveis foi realizada através do programa MEGA5 (Tamura et al. 2011).

### 3. RESULTADOS

#### 3.1. Verificação dos dados moleculares

Um total de 175 indivíduos foram analisados: 95 provenientes da bacia do Orinoco e 80 da bacia do Amazonas, usando sete *loci* de microssatélites. A verificação dos dados com o programa *Micro-Checker* (Van Oosterhout et al. 2004) sugeriu excesso de homozigotos provavelmente pela presença de alelos nulos nos locus: *Pme4*, *Pme5*, *Pme20* e *Cm1B8* na bacia do Orinoco, e *Pme2*, *Pme4*, *Pme21*, *Cm1G7* e *Cm1B8* na bacia do Amazonas. Mas ao comparar com os resultados verificados no *FreeNa*, não identificou-se a presença de alelos nulos. A correção de Chapuis & Estoup (2007) mostrou valores similares:  $F_{ST}=0,1638$  (CI95%: 0,1157 -0,20422) usando a correção e  $F_{ST}=0,1559$  (CI95%: 0,1095-0,1998) sem usá-la. Ao realizar a comparação estatística usando o teste não paramétrico para amostras únicas de *Wilcoxon*, não se achou diferenças significativas entre os dois valores de  $F_{ST}$  ( $W$ -valor=3  $p > 0,05$ ;  $n=7$ ), indicando que os dados obtidos neste estudo não apresentam alelos nulos.

O teste de desequilíbrio de ligação analisado para cada população depois da correção de *Bonferroni* ( $p > 0.0024$ ) não mostrou valores significativos nos *loci* estudados sugerindo que os *loci* são herdados independentemente.

#### 3.2. Análises de estrutura populacional de *Piaractus brachypomus*

A estruturação populacional realizada pela inferência Bayesiana no programa *Structure* (Pritchard et al. 2000) mostrou a formação de dois grupos ou unidades biológicas completamente diferenciadas como as mais prováveis que agrupa o conjunto de indivíduos ( $K=2$ ;  $LnProb$  media=-3741,0; 50000 réplicas MCMC; 5000 *burn-in period*; modelo *admixture*, dez simulações independentes com  $K=1$  a  $K=7$  agrupamentos) (Figura 3a).

O valor de atribuição ( $Q$ ) mostrou que cada *cluster* é integrado por indivíduos com alta proporção do genoma ancestral  $q > 0,98$  (Tabela 2). Assim teve um grupo que agrupa os indivíduos do Orinoco e outro os indivíduos do Amazonas, com baixa mistura entre eles (Figura 3b).

A Análise de Variância Molecular AMOVA mostrou um valor alto de estrutura genética com  $F_{ST}$  global de 0,2207 ( $p < 0.0001$ ). Sendo que a estrutura é explicada pela

variação entre as populações de cada bacia que a variação dos indivíduos dentro de cada população (Tabela 3).

Com o gene *Dloop* foram sequenciados 60 indivíduos da bacia do Orinoco e 85 indivíduos da bacia da Amazônia com um tamanho de sequência de 733 pb correspondentes ao segmento de 24 a 757 das 1100 pb da região *Dloop* em peixes (Meyer 1993). O modelo evolutivo que melhor se ajustou aos dados foi *HKY (Optimum, empirical):G(Optimums):5*. A construção da árvore filogenética de *ML* mostrou a formação de dois clados claramente definidos e separados por 35 passos mutacionais. Um clado é formado pelos indivíduos da população que habita a bacia do rio Orinoco e o outro pelos indivíduos que habitam na bacia do rio Amazonas (Figura 4).

Para o gene *COI* foi gerado um total de 22 sequências com tamanho de 647 pb. Igual que as análises anteriores, a árvore filogenética mostrou a formação de dois agrupamentos: um formado pelos indivíduos de *Piaractus brachypomus* da bacia do Orinoco e outro formado pelos indivíduos de *Piaractus brachypomus* da bacia do Amazonas (Figura 5).

### **3.3. Estimação de taxas de migração, efetivos populacionais e tempo de divergência**

A análise de coalescência implementada do programa *IMa2* estimou os parâmetros genéticos *tetha* ( $\theta$ ), taxa de imigração ( $M$ ) e tempo de divergência ( $t$ ) que posteriormente foram convertidos nos parâmetros demográficos: tamanho efetivo populacional ( $N_e$ ), número de imigrantes efetivos ( $m$ ) e tempo de divergência ( $T$ ) (Tabela 4).

A análise de *Ima2* indicou a não existência de migração entre os indivíduos das duas áreas geográficas. O tamanho efetivo populacional, medido em número de indivíduos fêmeas, mostrou-se quase o dobro na população da Amazônia ( $N_{e_0} = 800.080$ ) com relação a população do Orinoco ( $N_{e_1} = 370.907$ ) enquanto que a população ancestral foi 8 vezes menor ( $N_{e_A} = 95.214$ ) no Orinoco, ao comparado com a população do Amazonas. O tempo estimado de divergência entre as regiões geográficas foi de 95,740 anos (Tabela 4).

### **3.4. Análises morfológicas**

Com relação aos caracteres morfológicos, a análise permitiu observar

diferenciação entre as populações de cada bacia, e identificar a contribuição de cada variável na diferenciação explicada pelos componentes principais (Figura 7).

Nos primeiros componentes, a análise representou o 52% da variância do total. Na correlação que existe entre cada variável e os componentes 1 e 2 (Figura 8) foi possível identificar as tendências que diferenciam os indivíduos analisados, sendo cinco variáveis morfométricas as mais importantes.

Os indivíduos da bacia do Amazonas apresentaram forma mais alta e profunda (F, K, L, M, O, P, S), maior diâmetro do olho (Z), nadadeira anal mais longa (U), maior distância entre o extremo posterior da nadadeira dorsal e a origem da nadadeira adiposa, e maior distância entre a origem da nadadeira peitoral e a ponta do focinho.

Nas análises também foi possível observar que os indivíduos provenientes da bacia do Amazonas apresentam maior variação morfológica entre eles, que a exibida pelo conjunto de exemplares provenientes do rio Orinoco (Tabela 5).

### **3.5. Perfil molecular**

A Análises de Agregação Populacional -PAA, permitiu evidenciar diferenças moleculares entre as duas populações de *Piaractus brachypomus*. Assim com a região *Dloop*, *Piaractus brachypomus* (Orinoco) diferenciou-se por 21 sítios variáveis de *Piaractus brachypomus* (Amazonas), e com o gene *COI* diferenciou-se por 17 sítios variáveis respectivamente (Tabela 6 e 7).

## 4. DISCUSSÃO

### 4.1. Testando a panmixia de *Piaractus brachypomus*

*Piaractus brachypomus* conhecida como uma espécie migratória de ampla distribuição no sistema Amazônico apresentou uma forte estruturação populacional em sua área de distribuição associada aos dois grandes sistemas geográficos, o qual foi altamente suportado pelos marcadores moleculares e morfológicos.

Os marcadores nucleares mostraram na análise Bayesiana de *Structure* que a população está formada por dois *clusters* ou unidades biológicas bem definidas. Cada *cluster* está relacionado com indivíduos puros ( $q > 0,90$ ) pertencentes a cada bacia (Figura 3b), com alguns indivíduos intermediários com baixa probabilidade genotípica. Essa mistura genotípica é explicada segundo Engel et al. (2006) como uma evidência de polimorfismo ancestral resultado da separação recente entre as populações, ou que ainda está em processo de divergência genética, causado por barreiras reprodutivas ou se ela é fraca (isolamento reprodutivo pré-zigótico).

Da mesma maneira, a análise de Variância Molecular AMOVA mostrou que a estruturação genética da população é melhor explicada pela diferenciação genética entre as populações das duas áreas geográficas (22%) do que pela variabilidade dos indivíduos de uma mesma área (11%). Dentro da categorização de  $F_{ST}$  proposta por Wright (1978), menciona que valores entre 15% a 25% indicam elevada diferenciação genética e superiores a 25% muito elevada diferenciação entre as populações estudadas. O valor obtido neste estudo de  $F_{ST}$  (22%) altamente significativo, apontou à categorização da alta diferenciação (Tabela 3). Isto indica que a alta estruturação da população, pode estar associada ao baixo fluxo gênico entre as populações causada por alguma barreira geográfica ou mecanismo de isolamento populacional.

O diagnóstico com as regiões mitocondriais *Dloop* e *COI* apoiaram a presença dos dois *clusters* identificados com o marcador nuclear. Os dois marcadores mitocondriais agruparam em dois clados os indivíduos que representam cada bacia com valores de *bootstrap* bastantes significativos (Figuras 4 e 5).

A rede de haplótipos realizado a partir da região *Dloop* evidenciou uma separação bem definida das duas populações por numerosos passos mutacionais (35) sem nenhum compartilhamento de haplótipos, sugerindo que os grupos populacionais provavelmente

não estão conectados e por conseguinte não ocorre fluxo gênico.

Ao inferir a taxa de migração entre as populações das duas bacias a partir da região *Dloop* no programa *IMa2*, a análise mostrou ausência do fluxo gênico entre elas, provando a forte estruturação da população. Simulações teóricas realizadas com este programa por Strasburg & Rieseberg (2010), reportam que níveis de fluxo gênico menor que 0,1 entre populações de uma espécie é indicativo da alta estruturação, mencionando que mas do 90% das espécies têm um nível do fluxo gênico intraespecífico superior a 0,1.

O tempo de divergência da população, revelou que houve uma separação de aproximadamente 94.740 anos. No entanto, tem-se demonstrado que o programa *Ima2* não fornece uma estimativa precisa dos parâmetros demográficos como tempo de divergência e tamanhos populacionais, porque na análise infringe algumas premissas no sistema natural. Entre as premissas mais importantes são assumir: não recombinação dentro de cada loci, panmixia da população e taxa constante do fluxo gênico através da história (Strasburg & Rieseberg 2010; 2011). Contudo, pode-se usar o *IMa2* para pesquisar se o fluxo gênico entre as populações descendentes é recente ou histórico (Strasburg & Rieseberg 2010b; Palandacic et al. 2012).

Neste estudo, a análise indicou que houve uma separação recente entre as populações, que esta refletido na presença do polimorfismo ancestral em cada população e que é observável na análise de *Structure*.

Usando o mesmo programa Willis et al. (2010) pretenderam detectar o tempo de divergência e modo de especiação de três espécies do gênero *Cichla* nas bacias do Orinoco e Amazonas, simulando a divergências com e sem fluxo gênico. Eles detectaram valores variáveis entre 730 *Kya* a 40 *Kya* nas três espécies, os quais foram considerados errados por causa de várias deficiências durante a análises realizadas e possível violação nas premissas do método.

Embora programa de *IMa2* não detecte acuradamente o tempo de divergência, tanto o dado estimado neste trabalho como os inferidos por Willis et al. (2010), sugeriram que houve uma separação recente nas populações das duas bacias ao comparar com o evento de vicariância Orinoco/Amazonas proposto por Cooper et al. (1995) e Lundberg et al. (1998) de aproximadamente 10,5 *Ma*.

Por outro lado e de maneira análoga, as análises morfológicas sustentam a

separação dos grupos populacionais. Neste tipo de análises as variáveis relacionadas com altura do corpo, diâmetro do olho e longitude da nadadeira anal foram as que melhor explicaram as diferenças morfológicas entre os grupos considerados.

Em evolução, a adaptação dos indivíduos é consequência da mudança na composição genética de uma população (Hartl & Clark 1997). Além, é conhecido que indivíduos da mesma espécie expostos a condições ambientais variáveis ou a um habitat heterogêneo (tal como ocorre nos habitats deste estudo que são amplamente complexos e bem diferenciados) acrescenta também a variação dentro e entre as populações que em alguns casos se traduz em fenótipos diferentes (Schluter 2001; Andrade-López et al. 2010).

#### **4.2. Delimitando e Identificando Unidades Evolutivas Significantes -ESU de *Piaractus brachypomus***

Populações de uma espécie podem estar caminhando à especiação quando elas mostram diferenças genéticas e adaptativas significativas a diferentes habitats. Este processo em termos de biologia da conservação e gestão do recursos naturais, determinam que as populações merecem ter manejo diferenciado como Unidades Evolutivas Significantes (Frankham et al. 2008) o que permite que cada linhagem continue seu processo natural de evolução.

Definir Unidade Evolutiva Significante (*Evolutionary Significant Units* -ESU) em biologia da conservação tem sido controverso. Inicialmente era aplicado a “Populações com isolamento reprodutivo e histórico, e com características adaptativas distintas de outras populações da espécie” (Frankham et al. 2008), diferenciações que eram percebidas a partir de estudos morfológicos. Depois com a aparição dos marcadores moleculares Moritz (1994) as definiu como: “Populações com divergência significativa de frequência de alelos num *loci* ou mitocondriais, independente da distinção filogenética”. A partir destes dois conceitos a definição foi modificada por diferentes autores a logo do tempo.

Neste trabalho decidiu-se aplicar o conceito amplamente discutido e resumido por Funk et al. (2012) que definiram um *ESU* como: “uma população ou grupo de populações com isolamento reprodutivo substancial que leva a diferenças adaptativas de modo que a população representa um componente evolutivo significativo da espécie”. Esta delimitação

pode-se realizar com ajuda de diferentes tipos de marcadores moleculares e características adaptativas que permitam diferenciar as populações.

Baseados nos resultados obtidos neste estudo com os dados nucleares, mitocondriais e morfológicos, se revelam diferenças genéticas e morfológicas significativas nas populações de cada bacia, permitindo a delimitação de duas *ESUs para Piaractus brachypomus* em sua área de distribuição: uma na bacia do Orinoco e a outra na bacia do Amazonas. Esta delimitação esteve acompanhada da detecção do fluxo gênico restrito entre as duas populações, razão pela qual devem ser tratadas independentemente para fins de Manejo e Conservação.

Cada *ESU* foi identificada a partir dos sítios variáveis diagnósticos encontrados na região *Dloop* e gene *COI* de acordo a metodologia de Análises de Agregação Populacional -PAA (J. I. Davis & Nixon 1992) complementada pelo procedimento analítico descrito por Brower (1999) e Cook et al. (2010) com algumas modificações como segue:

### ***Piaractus brachypomus* (Orinoco)**

Localidade tipo para análises genéticas: Isla de Providencia, perto do Isla Fajardo, rio Orinoco. San Felix, Bolivar. Venezuela.

Diagnoses DNA: Esta população se pode distinguir de *P. brachypomus* (Amazonas) pela combinação dos seguintes caracteres nucleotídeos:

Região *Dloop*: 77C, 79T, 101C, 130A, 134A, 163G, 164A, 180T, 188G, 192T, 198G, 212A, 247T, 283A, 288A, 478A, 494T, 563A, 633T, 692G, 736A,

Gene *COI*: 47C, 194A, 197C, 212C, 233C, 269G, 281C, 335C, 381T, 386T, 398C, 416T, 482G, 500C, 503G, 569C, 617A.

Voucher análises genéticas: Coleção de Tecidos de Genética Animal, UFAM, Brasil

Região *Dloop*: CTGA12714 à CTGA12774.

Gene *COI*: CTGA12775 à CTGA12781.

Voucher análises morfológicas: 8121 Coleção de ictiologia. Fundación La Salle, San Felix, Bolívar. Venezuela. MBUCV-19186, MBUCV 23586, 23851. Colección de Ictiología, Centro Museo de Biología, Universidad Central de Venezuela.

Distribuição geográfica: Ocorrem normalmente em tributários de águas brancas, claras e ocasionalmente na interface águas brancas e pretas: rios Orinoco, Guaviare, Meta, Arauca, Cinaruco, Apure, Baixo Caura, Aro, Baixo Caroní e Delta do Orinoco (Figura 9).

### ***Piaractus brachypomus* (Amazonas)**

Localidade tipo para análises genéticas: lagos de Janauacá, rio Solimões, Brasil.

Diagnoses DNA: Esta espécie se pode distinguir de *P. brachypomus* (Orinoco) pela combinação dos seguintes caracteres nucleotídeos:

Região *Dloop*: 20A, 79C, 101T, 130T, 163A, 164G, 180C, 188A, 192C, 198A, 212G, 247C, 288G, 478G, 494A, 563T, 633C, 692A, 792A.

Gene *COI*: 47T, 194G, 197T, 212T, 233A, 269A, 281T, 335T, 381C, 386C, 398T, 416C, 482A, 500T, 503A, 569T, 617G.

Voucher análises genéticas: Coleção de Tecidos de Genética Animal, UFAM, Brasil.

Região *Dloop*: CTGA12782 à CTGA12867.

Gene *COI*: CTGA12868 à CTGA12878.

Voucher análises morfológicas: Instituto Nacional de Pesquisas Amazônicas -INPA, Brasil.

INPA 39118, INPA 22329, INPA 20122, INPA 5790, INPA 1098.

Distribuição geográfica: Ocorrem normalmente em tributários de águas brancas, claras e ocasionalmente na interface águas brancas e pretas: rios Caquetá-Japurá, Putumayo-Iça, Branco, Napo, Ucayalí, Solimões, Juruá, Purus, Madeira, Tapajós, Madre de Dios, Beni, Mamoré, Iténez, Guaporé, Araguaia-Tocantins e Amazonas,(Figura 9).

## 5. CONCLUSÃO

*Piractus brachypomus* evidenciou ter alta estruturação com a formação de duas unidades populacionais que correspondem a duas Unidades Evolutivas Significantes -*ESU*-, uma na bacia do Orinoco e outra na do Amazonas. Cada -*ESU*- mostrou ter características genéticas e morfológicas diferenciadas, o que implica que cada população reage de forma diferente a tensores ambientais e/ou antropogênicos.

Desta maneira, cada -*ESU*- deve responder parâmetros populacionais diferentes que merecem ser revisados para seu manejo pesqueiro independente em suas áreas de distribuição.

## **6. AGRADECIMENTOS**

Se agradece especialmente a colaboração pelas análises morfológicas a Antonio Machado-Allison e Francisco Provenzano do Instituto de Zoologia Tropical de la Universidad Central de Venezuela. O apoio no laboratório a Maria da Conceição Freitas Santos e José Gregório Martinez do Laboratório de Evolução e Genética Animal -LEGAL, da Universidade Federal do Amazonas. Pela colaboração nas coletas de campo a Nirson Gonzales, Aniello Barbarino, Rosa Elena Ajiaco Martinez, Maria da Conceição Pires, Luz Marina Rodrigues, Luis Francisco Cubillos, Henry Elias Yucuna Cubeo e Adam Leão. Pelos mapas Vinícius Verona Gonçalves Carvalho.

## 7. BIBLIOGRAFIA

- Adams, D.C., Slice, D.E. & Rohlf, F.J., 2004. Geometric morphometrics: Ten years of progress following the “revolution.” *Italian Journal of Zoology*, 71, pp.5–16.
- Aliaga, C., 2004. *Variabilidad genética de Colossoma macropomum y Piaractus brachypomus en la región de alto Madera (Amazonía Boliviana) Para el análisis del polimorfismo de la longitud de secuencias intrónicas (EPIC-PCR)*. Universidad mayor de San Andrés.
- Allendorf, F. & Ryman, N., 1987. Genetic management of hatchery stocks. In R. N & F. Utter, eds. *Population genetic and fishery management*. University of Washington Press, Seattle, pp. 141–159.
- Allendorf, F., Ryman, N. & Utter, F., 1987. Genetics and fishery management: past, present, and future. In N. Ryman & Fred Utter, eds. *Population genetic and fishery management genetics and fishery management*. University of Washington Press, Seattle, pp. 1–20.
- Andrade-López, J., Milani, N. & Machado-Allison, A., 2010. Diferenciación morfológica entre poblaciones de Jupiaha cf. polylepis (Characiformes: Characidae) del río Cuyuní y sub-cuencas del sur del río Orinoco (Venezuela). *Acta Biologica Venezolana*, 30(1-2), pp.1–10.
- Avice, J.C., 2000. *Phylogeography: The History and Formation of Species*, Cambridge, MA: Harvard University Press.
- Ballard, J.W.O. & Whitlock, M.C., 2004. The incomplete natural history of mitochondria. *Molecular Ecology*, 13, pp.729–744.
- Barliani, M. et al., 2007. Hybridisation with introduced chukars (*Alectoris chukar*) threatens the gene pool integrity of native rock (*A. graeca*) and red-legged (*A. rufa*) partridge populations. *Biological Conservation*, 137, pp.57–69.
- Blackith, R.E. & Reyment, R.A., 1971. *Multivariate Morphometrics* Academic Press, ed., London.
- Brower, A.V.Z., 1999. Delimitation of phylogenetic species with DNA sequences: A critique of Davis and Nixon’s population aggregation analysis. *Systematic Biology*, 48, pp.199–213.
- Brown, J.R., Beckenbach, A.T. & Smith, M.J., 1993. Intraspecific DNA Sequence Variation of the Mitochondrial Control Region of White Sturgeon. , 10(2), pp.326–341.
- Calcagnotto, D., Russello, M.A. & DeSalle, R., 2001. Isolation and characterization of microsatellite loci from *Piaractus mesopotamicus* and their applicability in other Serrasalminae fish. *Molecular Ecology Notes*, 1(1), pp.245–247.
- Calcagnotto, D., Schaefer, S.A. & DeSalle, R., 2005. Relationships among characiform fishes inferred from analysis of nuclear and mitochondrial gene sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 36, pp.135–153.
- CCI, C.C.I., 2008. *Pesca y Acuicultura de Colombia 2008.*,
- Chapuis, M.-P. & Estoup, A., 2007. Microsatellite null alleles and estimation of population differentiation. *Molecular Biology and Evolution*, 24(3), pp.621–631. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17150975>.
- Cook, L.G. et al., 2010. Need morphology always be required for new species

- descriptions? *Invertebrate Systematics*, 24(3), pp.322–326.
- Cooper, M.A. et al., 1995. Basin development and tectonic history of the Llanos Basin, Eastern Cordillera, and Middle Magdalena Valley, Colombia. *American Association of Petroleum Geologists Bulletin*, 79(10), pp.1421–1443.
- Davis, J. & Nixon, K., 1992. Populations, Genetic Variation, and the Delimitation of Phylogenetic Species. *Systematic Biology*, 41, pp.421–435.
- Davis, J.I. & Nixon, K.C., 1992. Populations, genetic variation, and the delimitation of phylogenetic species. *Systematic Biology*, 41(4), pp.421–435.
- Dempster, A.P., Laird, N.M. & Rubin, D.B., 1977. Maximum likelihood from incomplete data via the EM algorithm. *Journal of the Royal Statistical Society, Series B (Statistical Methodology)*, 39, pp.1–38.
- DeWoody, J.A. et al., 2004. Universal method for producing ROX-labeled size standards suitable for automated genotyping. *Biotechniques*, 37, pp.348–352.
- Doyle, J.J. & Doyle, J.L., 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin*, 19(1), pp.11–15.
- Dudgeon, C.L. et al., 2012. A review of the application of molecular genetics for fisheries management and conservation of sharks and rays. *Journal of Fish Biology*, 80, pp.1789–1843.
- Eigenmann, C.H. & Allen, W., 1942. *Fishes of Western South America* University., Lexington.
- Engel, C., Daguin, C. & Serrao, E., 2006. When is a hhybrid a hybrid? A reply to Wallece et al. *Molecular Ecology*, 15, pp.227–237.
- Excoffier, L., Laval, G. & Schneider, S., 2005. Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online*, 1(1), pp.47–50.
- Fowler, H.W., 1942. Lista de peces de Colombia. *Revista Academia Colombiana de Ciencias*, 5, pp.128–138.
- Frankham, R., Ballou, J.D. & Briscoe, D.A., 2008. *Fundamentos de Genética da Conservação* P. M. Galetti Jr., F. P. Rodrigues, & I. P. Farias, eds., Ribeirão Preto, SP, Brazil: Editora SBG.
- Funk, W. et al., 2012. Harnessing genomics for delineating conservation units. *Trends in Ecology and Evolution*, 27 (9), pp.489–496.
- Goulding, M., 1989. *Amazon: The Flooded Forest*, London, England: BBC Books.
- Goulding, M., 1979. *Ecologia de Pesca do Rio Madeira*, Manaus, Brazil: INPA.
- Hall, T., 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, 41(1), pp.95–98. Available at: <http://jwbrown.mbio.ncsu.edu/RNaseP/info/programs/BIOEDIT/bioedit.html>.
- Hammer, Ø., Harper, D.A.T. & Ryan, P.D., 2001. PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontologia Electronica*, 4(1), pp.1–9.
- Hartl, D.L. & Clark, A.G., 1997. *Principles of Population Genetics* 4th editio., Sunderland, MA: Sinauer Associates.

- Hey, J. & Nielsen, R., 2007. Integration with the Felsenstein equation for improved Markov chain Monte Carlo methods in population genetics. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(8), pp.2785–2790.
- Ivanova, N. V et al., 2007. Universal primer cocktails for fish DNA barcoding. *Molecular Ecology Notes*, 7(4), pp.544–548.
- Jobb, G., von Haeseler, A. & Strimmer, K., 2004. TREEFINDER: a powerful graphical analysis environment for molecular phylogenetics. *BMC Evolutionary Biology*, 4(1), p.e18.
- Landines-Parra, M. & Mojica-Benítez, H., 2005. Manejo y Reproducción de Carácidos. In P. . Daza, M. . Landines-Parra, & A. . Sanabria-Ochoa, eds. *Reproducción de peces en el trópico*. Bogotá, Colombia, pp. 91–103.
- Lasso, C. et al., 2011. *Catálogo de los recursos pesqueros continentales de Colombia* C. Instituto Humboldt, ed., Bogota, Colombia.
- Loubens, G. & Panfili, J., 2001. Biologie de *Piaractus brachypomus* (Teleostei: Serrasalminidae) dans le bassin du Mamoré (Amazonie bolivienne). *Ichthyology Exploration Freshwaters*, 12(0936-9902), pp.51–64.
- Lundberg, J. et al., 1998. The State for Neotropical Fish Diversification: A History of Tropical South American Rivers. In *Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes*. pp. 13–48.
- Machado-Allison, A., 1982. Estudios sobre la subfamilia Serrasalminae (Teleostei, Characidae). Parte 1. Estudio Comparado de los Juveniles de las “Cachamas” de Venezuela (Genero: *Colossoma* y *Piaractus*). *Acta Biologica Venezuelana*, 11 (3), pp.1–101.
- Meyer, A., 1993. Evolution of mitochondrial DNA in fishes. In P. W. Hochachka & T. P. Mommsen, eds. *Molecular Biology Frontiers: Biochemistry and Molecular Biology of Fishes*. Vol. 2. Amsterdam, Holland: Elsevier.
- Moritz, C., 1994. Defining “Evolutionarily Significant Units” for conservation. *Trends in Ecology and Evolution*, 9(10), pp.373–375.
- Novoa, D., 2002. Los recursos pesqueros del eje fluvial Orinoco – Apure: presente y futuro. , p.143.
- Oliveira, C. et al., 2011. Phylogenetic relationships within the speciose family Characidae (Teleostei: Ostariophysi: Characiformes) based on multilocus analysis and extensive ingroup sampling. *BMC Evolutionary Biology*, 11(1), p.275.
- Van Oosterhout, C. et al., 2004. MICRO-CHECKER: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes*, 4(3), pp.535–538.
- Ortí, G. & Meyer, A., 1997. The radiation of characiform fishes and the limits of resolution of mitochondrial ribosomal DNA sequences. *Systematic Biology*, 46(1), pp.75–100.
- Palandacic, A. et al., 2012. Fish migrate underground: the example of *Delminichthys adspersus* (Cyprinidae). *Molecular Ecology*, 21, pp.1658–1671.
- Pineda, H. et al., 2006. Evaluación del polimorfismo por microsatélites en individuos de *Piaractus brachypomus* (Characidae, Serrasalminae) provenientes do rio Meta, Colombia. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 19:1, pp.66–69.
- Pritchard, J.K., Stephens, M. & Donnelly, P., 2000. Inference of population structure using

- multilocus genotype data. *Genetics*, 155, pp.945–959.
- Reiss, H. et al., 2009. Genetic population structure of marine fish: mismatch between biological and fisheries management units. *Fish and Fisheries*, 10, pp.361–395.
- Rice, W.R., 1989. Analyzing tables of statistical tests. *Evolution*, 43(1), pp.223–225.
- Rohlf, F.J. & Slice, D.E., 1990. Extensions of the Procrustes method for the optimal superimposition of landmarks. *Systematic Zoology*, 39(1), pp.40–59.
- Salzburger, W., Ewing, G. & Von Haeseler, A., 2011. The performance of phylogenetic algorithms in estimating haplotype genealogies with migration. *Molecular Ecology*, 20, pp.1952–1963.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. & Maniatis, T., 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* 2nd ed., Cold Springs Harbor, NY: Cold Springs Harbor Laboratory Press.
- Santos, M. da C.F., Hrbek, T. & Farias, I.P., 2009. Microsatellite markers for the tambaqui (*Colossoma macropomum*, Serrasalminidae, Characiformes), an economically important keystone species of the Amazon River floodplain. *Molecular Ecology Resources*, 9(3), pp.874–876.
- Schlötterer, C., 2000. Evolutionary dynamics of microsatellite DNA. *Chromosoma*, 109, pp.265–371.
- Schluter, D., 2001. Ecology and the origin of species. *Trends in Ecology and Evolution*, 16(7), pp.372–380.
- Sivasundar, A., Bermingham, E. & Ortí, G., 2001. Population structure and biogeography of migratory freshwater fishes (*Prochilodus*: Characiformes) in major South American rivers. *Molecular Ecology*, 10(2), pp.407–417.
- Stepiens, C.A., 1995. Population Genetic Divergence and Geographic Patterns from DNA Sequences: Exemples from Marine and Freshwater Fishes. In *American Fisheries Society Symposium*. American Fisheries Society, pp. 263–287.
- Strasburg, J. & Rieseberg, L., 2011. Interpreting the estimated timing of migration events between hybridizing species. *Molecular Ecology*, 20, pp.2353–2366.
- Strasburg, J.L. & Rieseberg, L.H., 2010a. How robust are “Isolation with Migration” analyses to violations of the IM model? A simulation study. *Molecular Biology and Evolution*, 27(2), pp.297–310.
- Strasburg, J.L. & Rieseberg, L.H., 2010b. How robust are “isolation with Migration” analyses to violations of the IM model? A simulation study. *Molecular Biology and Evolution*, 27(2), pp.297–310.
- Tamura, K. et al., 2011. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution*, 28(10), pp.2731–2739.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G. & Gibson, T.J., 1996. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, 22(22), pp.4673–4680.
- Weir, B.S., 1996. *Genetic Data Analysis II: Methods for Discrete Population Genetic Data*, Sunderland, MA: Sinauer Associates.
- Willis, S.C. et al., 2010. The Casiquiare river acts as a corridor between the Amazonas

and Orinoco river basins: biogeographic analysis of the genus *Cichla*. *Molecular Ecology*, 19(5), pp.1014–1030.

Wright, S., 1969. *Evolution and the Genetics of Populations. Volume 2. The Theory of Gene Frequencies*, Chicago, IL: University of Chicago Press.

Wright, S., 1978. *Evolution and the Genetics of Populations. Volume 4. Variability within and among Natural Populations*, Chicago, IL: University of Chicago Press.

Zelditch, M.L. et al., 2004. *Geometric Morphometrics for Biologists: A Primer*, San Diego, CA: Elsevier Academic Press.

## TABELAS

Tabela 1. Marcadores moleculares usados nas análises da população de *Piaractus brachypomus*

Especie	Locus/No. acesso	Primer (5' a 3')	Ta (C°)
<i>Piaractus mesopotamicus</i>	Pme4 AF362446	F: CATGCTGCTGCAGATTAGAC R: CGCTTGCAATTTAACGCAGT	55
	Pme5 AF362447	F: CAGAGCATCTGGAGGGACAT R: TCTGAGACACTGATATCTAAACACACA	55
	Pme20 AF362449	F: CAGAGCTTTGAGGAACACGA R: CCCATCAGTTACGGGTCATT	57
	Pme21 AF362450	F: ATAATGCTGGCGTCAGTGGT R: GGACAGCTGGTCTCAAGCTC	55
<i>Colossoma macropomum</i>	Cm1F7 EU6853313	F-CCTATTGTGATGGCAGAGAGAG R-CACAGACGTGTACAGCTGGTT	62
	Cm1G7 EU 685314	F-CCCAGCCTACTACAGGGTCA R-CACACATCGCTCTTCTCTCC	62
	Cm1B8 EU685316	F-CACAACCCACCTGTTTGATT R-CTAATAACAAACCTACTTCCACTTCTC	60
Primeis <i>Dloop</i>	Chara_LDloop	5'CCCACCACTAACTCCCAAAG 3'	
	Chara_RDloop	5'GGTTTTGGGGTTTGAGAGG 3'	
	CMF2	5'CATCTGGTTCCTATTTTCAGG 3'	
	CMR2	5'GTGACCAAATGTCAGGTGGA 3'	
Coteis de primeis <i>COI</i>	VF2_t1	5'TGTAAAACGACGGCCAGTCAACCAAC CACAAAGACATTGGCAC3'	
	FishF2_t1	5'TGTAAAACGACGGCCAGTCGACTAATC ATAAAGATATCGGCAC3'	
	FishR2_t1	5'CAGGAAACAGCTATGACACTTCAGGGT GACCGAAGAATCAGAA3'	
	FRd_t1	5'CAGGAAACAGCTATGACACCTCAGGG TGTCCGAARAAACARAA3'	

Tabela 2. Valores de atribuição Q. Proporções de integrantes de cada população predefinida para cada *cluster* de acordo com a porcentagem de mistura gênica do indivíduo  $q$ .

<b>Localidade</b>	<b>Cluster 1 (Q)</b>	<b>Cluster 2 (Q)</b>	<b>Número indivíduos</b>
1-Meta	0,996	0,004	20
2-Orinoco	0,995	0,005	20
3-Apure	0,994	0,006	20
4-Guaviare	0,987	0,013	20
5-San Felix	0,989	0,011	15
6-Leticia	0,011	0,989	20
7-Santarem	0,008	0,992	21
8-Tefé	0,006	0,994	20
9-Janauacá	0,005	0,995	19

Tabela 3. Análise de Variância Molecular AMOVA para *Piaractus brachypomus* (Orinoco-Amazonas)

Fontes de variação	Componentes da variância	Porcentagem de variação
Entre populações	0.65412	22.07
Entre os indivíduos dentro das populações	0.32943	11.11
Dentro de indivíduos	1.98000	66.82
<i>FIS</i>		0.14261*
<i>FST</i>		0.22068*
<i>FIT</i>		0.33182*

Tabela 4. Estimacões de parâmetros demográficos de *Piaractus brachypomus*. Máxima estimacão (MLE) e intervalos de confiança.

Comparaçã	$\theta_0$	$\theta_1$	$\theta_A$	$M_{0>1}$	$M_{1>0}$	$t$	$Ne_0$	$Ne_1$	$Ne_A$	$T$ (anos)
MLE	281.5	130.5	33.5	0.005	0.005	25	800.080	370.907	95.214	94.740
Lo 95%	205.5	92.5	15.5	0.005	0.005	15	584.072	262.904	44.054	56.844
Hi 95%	406.5	202.5	898.5	0.035	0.055	25	1.155.355	575.545	25.53718	94.740

Tabela 5. Descrição das variáveis representadas no padrão de *cerchas* construído entre os pontos homólogos.

Variável	Distância	Descrição
B	1-2	Focinho e extremo posterior do supraoccipital
C	1-10	Focinho e origem da nadadeira pectoral
D	1-11	Focinho e extremo do maxilar
E	2-3	Extremo posterior do supraoccipital e origem da nadadeira dorsal
F	2-9	Extremo posterior do supraoccipital e origem da nadadeira pélvica
G	2-11	Extremo posterior do supraoccipital e extremo do maxilar
H	2-12	Extremo posterior do supraoccipital e origem do opérculo
I	3-4	Comprimento da nadadeira dorsal
J	3-8	Comprimento da nadadeira dorsal e origem da nadadeira anal
K	3-9	Origem da nadadeira dorsal e origem da nadadeira pélvica
L	3-10	Origem da nadadeira dorsal e origem aleta pectoral
M	4-5	Extremo posterior nadadeira dorsal e origem da nadadeira adiposa
N	2-12	Extremo posterior do supraoccipital e origem do opérculo
O	4-8	Extremo posterior nadadeira dorsal e origem nadadeira anal
P	4-9	Extremo posterior nadadeira dorsal e origem nadadeira pélvica
Q	5-6	Origem nadadeira adiposa e final complexo hipural
R	5-7	Origem nadadeira adiposa e final da base da nadadeira anal
S	5-8	Origem nadadeira adiposa e origem da nadadeira anal
T	6-7	Final do complexo hipural e final da base da nadadeira anal
U	7-8	Longitude da nadadeira anal
V	8-9	Origem nadadeira anal e origem nadadeira pélvica
W	9-10	Origem nadadeira pélvica e origem da nadadeira pectoral
X	10-11	Origem nadadeira pectoral e extremo do maxilar
Y	12-10	Origem do opérculo e origem da nadadeira pectoral
Z	13-14	Diâmetro do olho

Tabela 6. Análises de Agregação Populacional -PAA para a região *Dloop* em *Piaractus brachypomus*.

<i>ESU</i>	<b>Sítios variáveis <i>Dloop</i></b>											
	<b>020</b>	<b>077</b>	<b>079</b>	<b>101</b>	<b>130</b>	<b>134</b>	<b>163</b>	<b>164</b>	<b>180</b>	<b>188</b>	<b>192</b>	<b>198</b>
<i>P. brachypomus</i> (Amazonas)	A	-	C	T	T	-	A	G	C	A	C	A
<i>P. brachypomus</i> (Orinoco)	-	C	T	C	A	A	G	A	T	G	T	G

<i>ESU</i>	<b>Sítios variáveis <i>Dloop</i></b>										
	<b>212</b>	<b>247</b>	<b>283</b>	<b>288</b>	<b>478</b>	<b>494</b>	<b>563</b>	<b>633</b>	<b>692</b>	<b>736</b>	<b>792</b>
<i>P. brachypomus</i> (Amazonas)	G	C	-	G	G	A	T	C	A	-	A
<i>P. brachypomus</i> (Orinoco)	A	T	A	A	A	T	A	T	G	A	-

Tabela 7. Análises de Agregação Populacional -PAA do gene *COI* em *Piaractus brachypomus*.

<i>ESU</i>	Sítios variáveis <i>COI</i>								
	147	150	165	186	222	234	288	334	339
<i>P. brachypomus</i> (Amazonas)	G	T	T	A	A	T	T	C	C
<i>P. brachypomus</i> (Orinoco)	A	C	C	C	G	C	C	T	T

<i>ESU</i>	Sítios variáveis <i>COI</i>								
	351	369	435	453	456	522	570	575	576
<i>P. brachypomus</i> (Amazonas)	T	C	A	T	A	T	G	G	G
<i>P. brachypomus</i> (Orinoco)	C	T	G	C	G	C	A	A	G

## FIGURAS

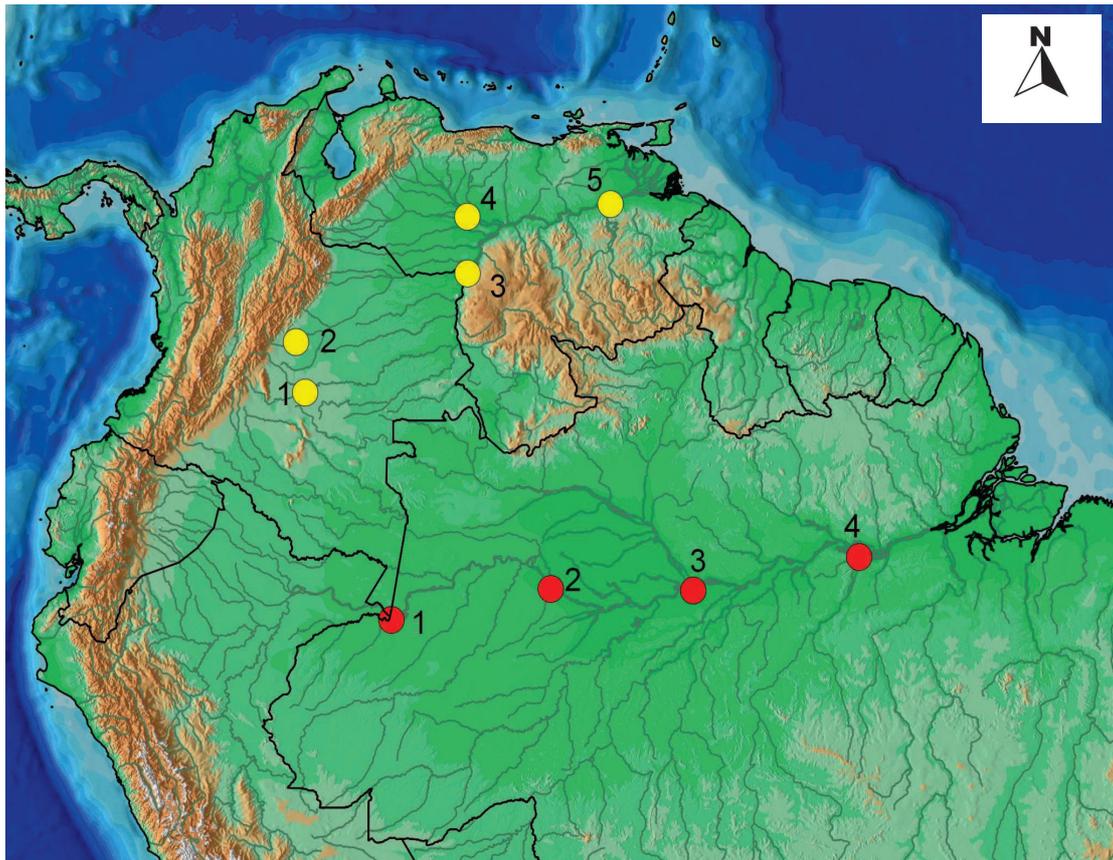


Figura 1. Localização das coletas para análises de microssatélites na área de distribuição de *Piractus brachypomus*. A cor amarelo indica as localidades na bacia do Orinoco: 1. San José del Guaviare, 2. Puerto Lopez, 3. Puerto Carreño, 4. San Fernando de Apure, 5. San Felix. A cor em vermelho indica as localidades na bacia do Amazonas: 1. Letícia, 2. Tefé, 3. Janauacá e 4. Santarém.

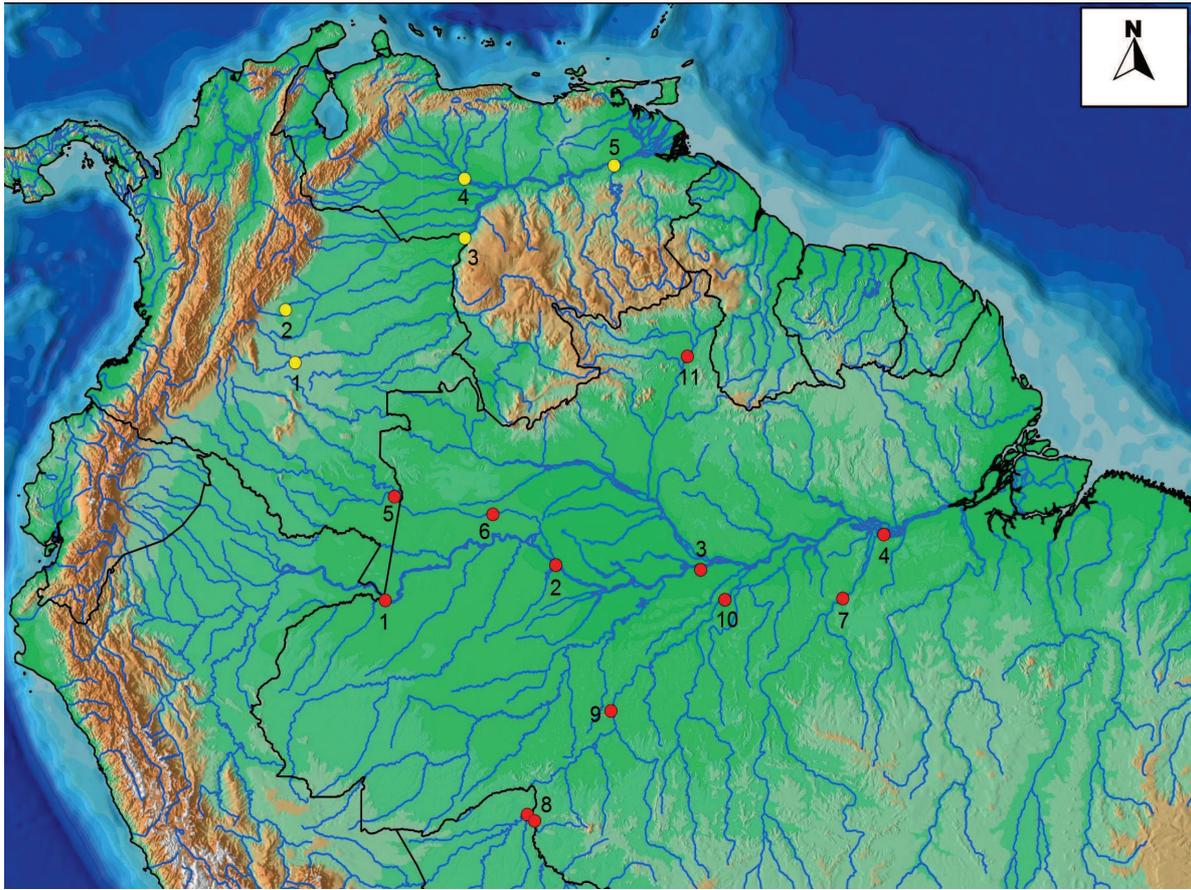
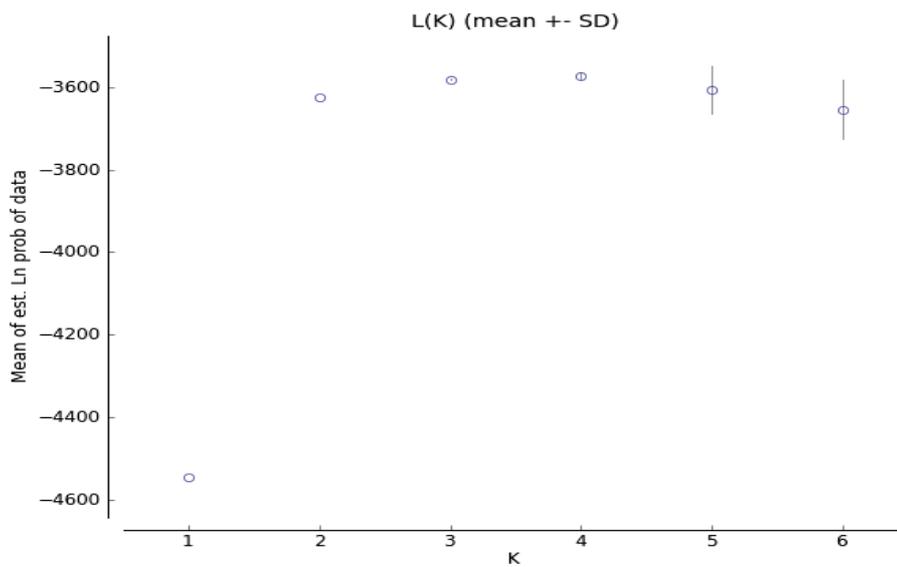
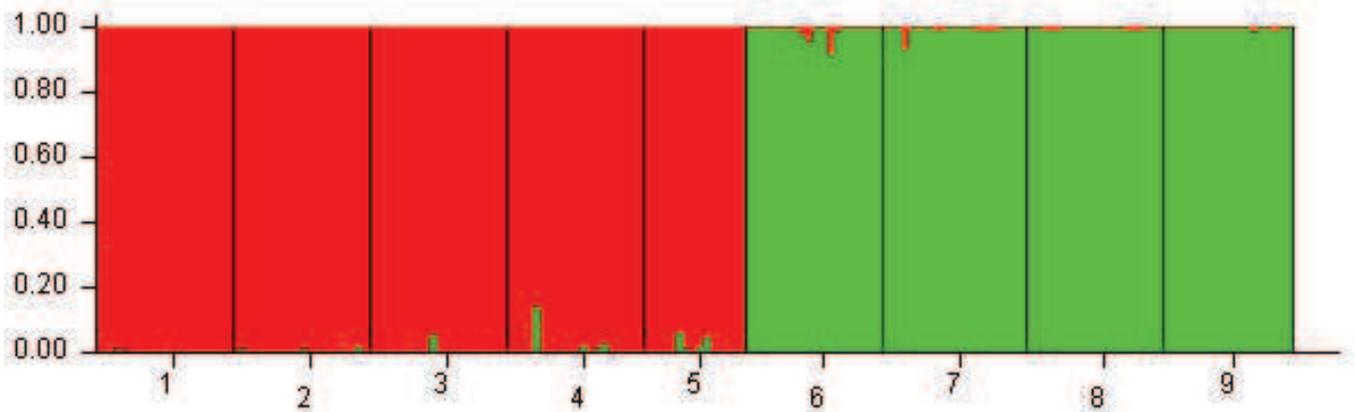


Figura 2. Localização das coletas para análises mitocondriais na área de distribuição de *Piractus brachypomus*. A cor amarelo indica as localidades na bacia do Orinoco: 1. San José del Guaviare, 2. Puerto Lopez, 3. Puerto Carreño, 4. San Fernando de Apure, 5. San Felix. A cor em laranja indica as localidades na bacia do Amazonas: 1. Letícia, 2. Tefé, 3. Janauacá, 4. Santarém, 5. La Pedrera, 6. Japurá, 7. Itaituba, 8. Guajará-Mirim, 9. Humaitá, 10. Borba e 11. Boa Vista.

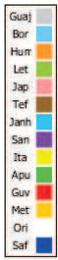


(a)



(b)

Figura 3. Resultados de *Structure* na área de distribuição de *Piaractus brachypomus*. a) A análise por máxima probabilidade, na vertical: medida da estimativa de distribuição de probabilidade dos dados, na horizontal: número de *clusters* testados. b) *Clusters* a cor vermelha representa os indivíduos da bacia do Orinoco: 1. San José del Guaviare, 2. Puerto Lopez, 3. Puerto Carreño, 4. San Fernando de Apure, 5. San Felix. A cor verde representa os indivíduos da bacia do Amazonas: 1. Letícia, 2. Tefé, 3. Janaucá e 4. Santarém.



**Bacia do Orinoco**

**Bacia do Amazonas**

Figura 4. Rede haplotípica da população de *Piaractus brachypomus* em sua área de distribuição a partir da região *Dloop*.

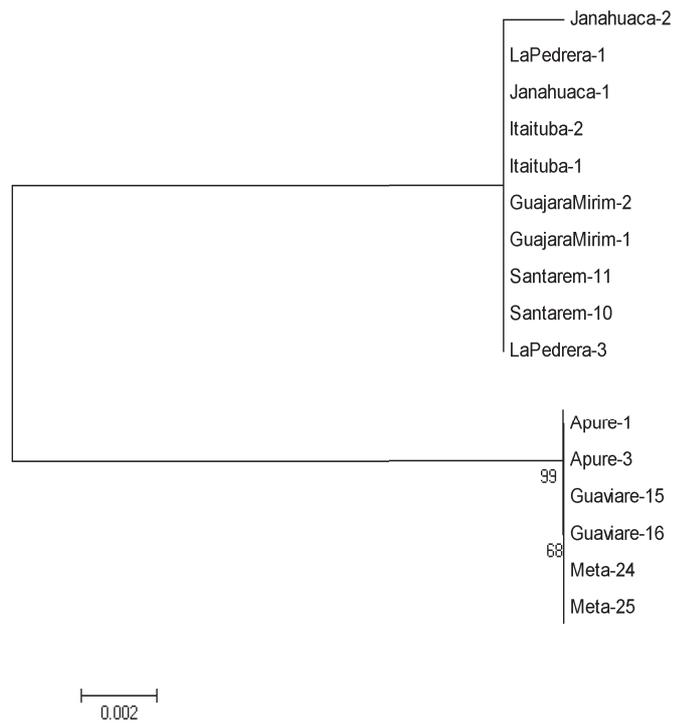


Figura 5. Árvore filogenética da população de *Piaractus brachypomus* a partir de o gene COI

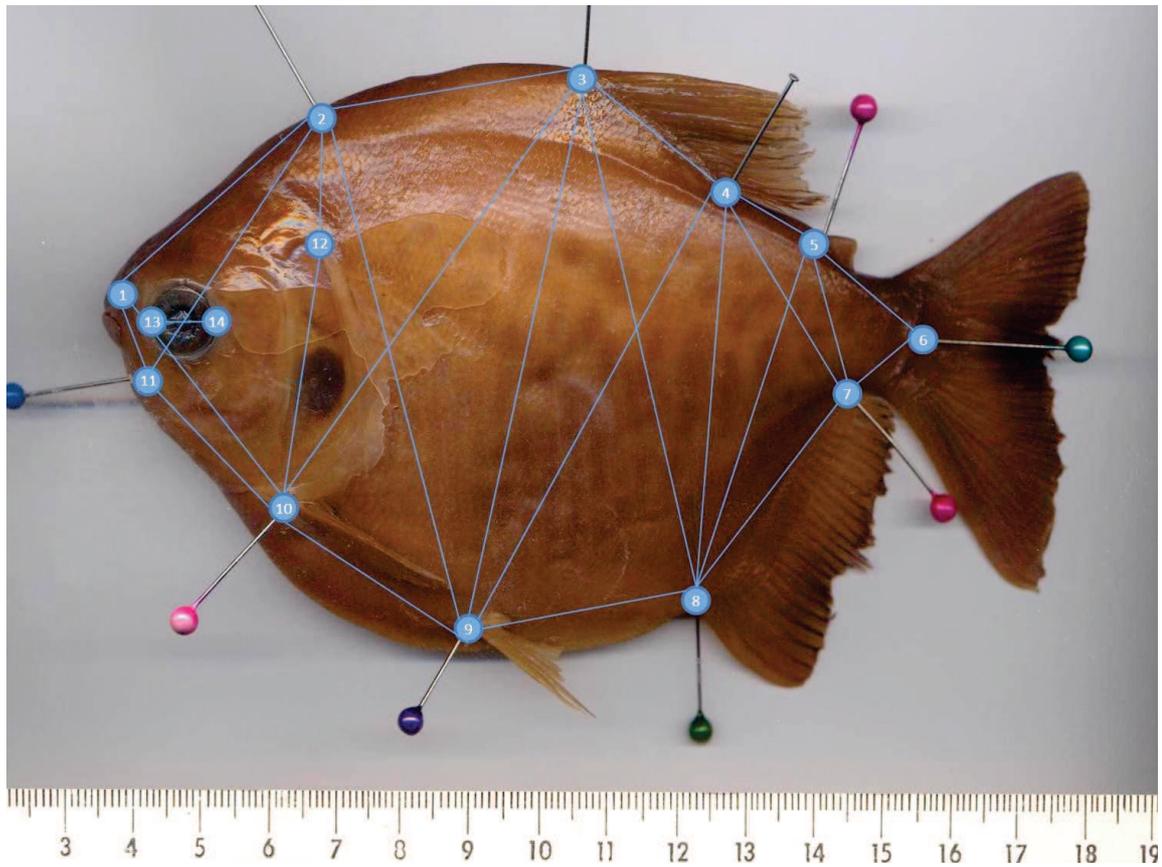


Figura 6. Localização dos pontos homólogos e distribuição do padrão de *cerchas*.

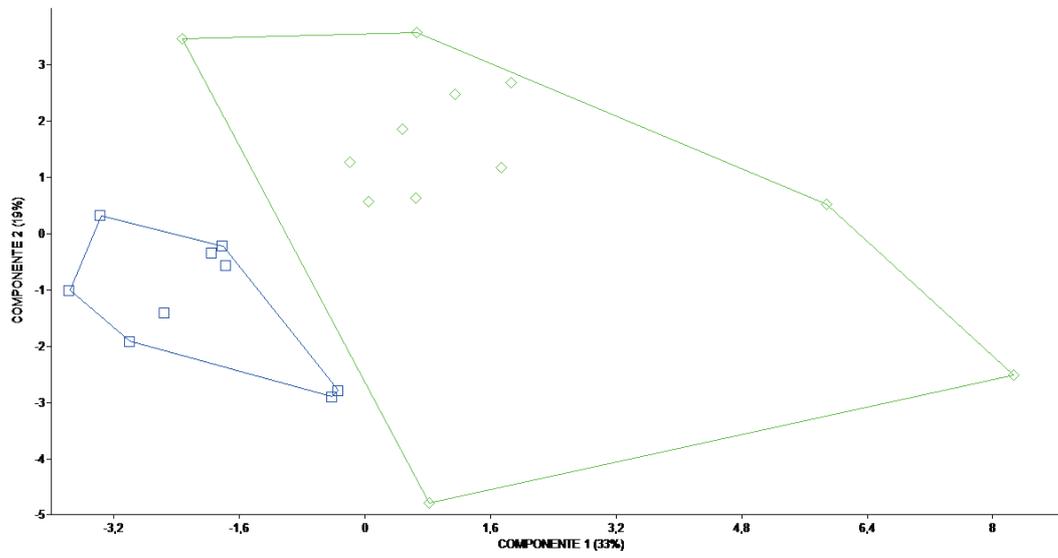


Figura 7. Análises de componentes principais que considera 25 variáveis do padrão de *cerchas* selecionadas para *P. brachypomus*, Orinoco (Azul) e Amazonas (Verde).

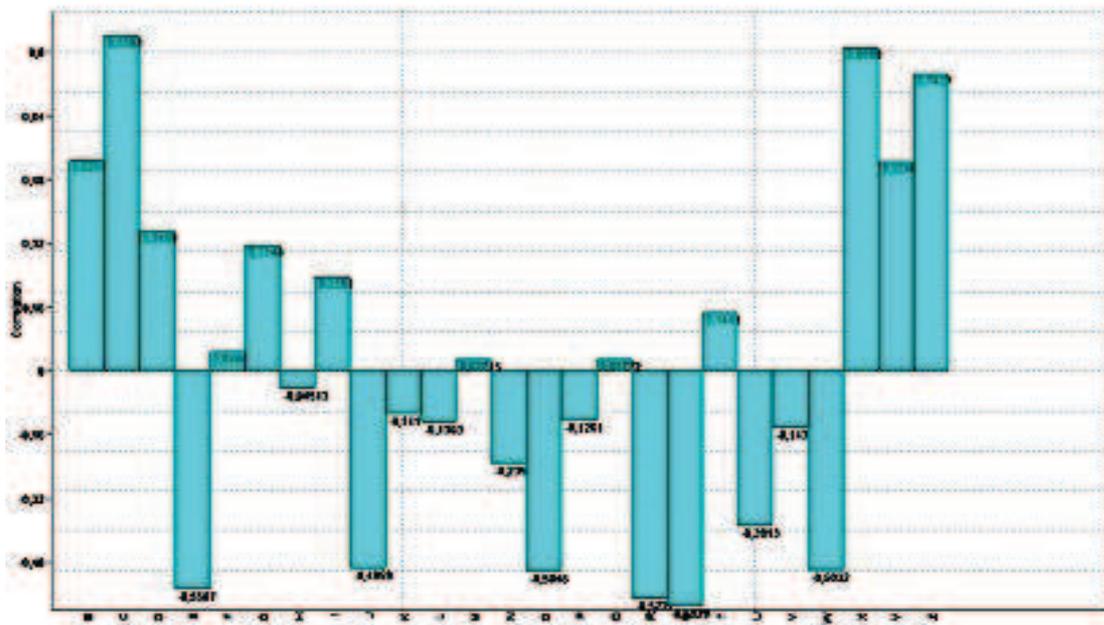
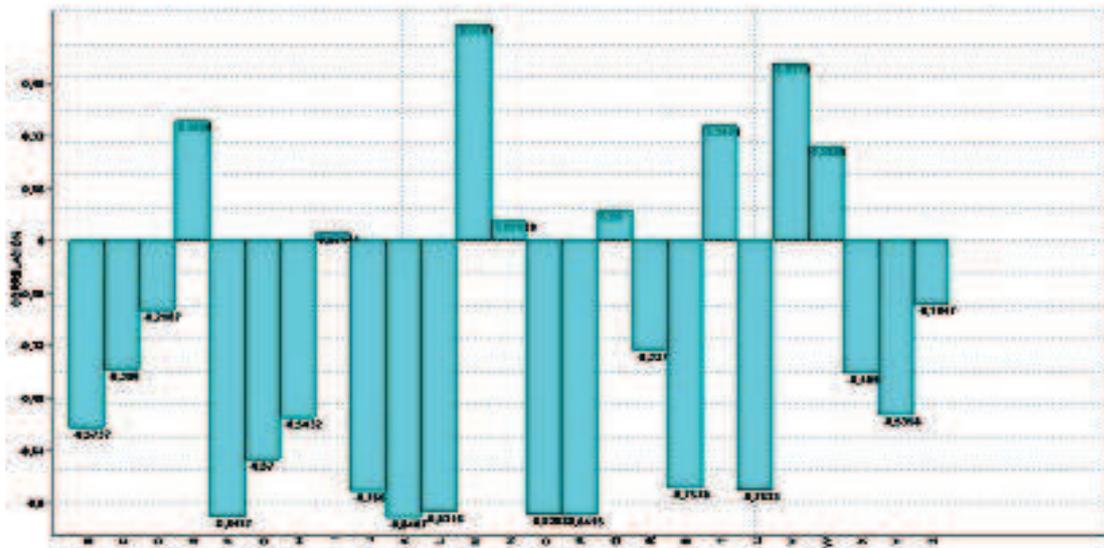


Figura 8. Histograma de correlação das variáveis morfológicas nos componentes



Figura 9. Área de distribuição para cada *ESU* de *Piractus brachypomus*. Em verde bacia do Orinoco e em laranja bacia do Amazonas.

## CAPITULO II



Foto: María Doris Escobar Lizarazo

San José del Guaviare, Guaviare, Colombia.

**CARACTERIZAÇÃO GENÉTICO- POPULACIONAL DA CACHAMA BLANCA OU MOROCO *Piaractus brachypomus* NA BACIA DO RIO ORINOCO**

María Doris Escobar L.<sup>1,2</sup>, Izeni P. Farias<sup>2</sup>, Tomas Hrbek<sup>1,2</sup>

1. Laboratório de Evolução e Genética Animal, Departamento de Biologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, AM, Brasil.
2. Pós-graduação em Diversidade Biológica, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, AM, Brasil.

Palavras-chave: Diversidade genética, fluxo gênico, microssatélites, panmixia.

## ABSTRACT

The population of *Piaractus brachypomus* from the Orinoco River basin was studied through different microsatellite markers. The results showed no population structure indicating the a panmictic behavior of the population ( $F_{ST}=0,044$ ). When compare with other populations of migratory fish in South America moderate genetic diversity and gene flow was detected ( $H_e=0,66$ ;  $Nm=2,03$  a  $7,21$ ). The waterfalls Atures and Maipures in the middle Orinoco did not constitute a physical barrier to the migration of the species or to their dispersion. The analysis of historical demography showed that the species underwent a strong population decline could be caused by strong climatic changes that have occurred in recent times. Currently the population is undergoing an expansion keeping the effective size to ensure the maintenance of the population.

## RESUMO

A população de *Piaractus brachypomus* foi estudada a través de marcadores de microsatélites na bacia do rio Orinoco. Foi detectada moderada diversidade genética na população ( $H_e=0,66$ ) com relação a outros peixes migratórios da América do Sul. A população não apresentou estruturação ( $F_{ST}=0,044$ ) se comportando como uma população panmíctica. O fluxo gênico da população foi de moderada magnitude ( $Nm=2,03$  a  $7,21$ ) comparado com outros peixes migratórios da América do Sul. As cachoeiras de Atures e Maipures no meio rio Orinoco não constituíram barreira física para as migrações da espécie nem para sua dispersão. A análise de demografia histórica mostrou que a espécie passou por um forte declínio populacional que poderia ser causado por fortes mudanças climáticas que aconteceram nos últimos tempos. Atualmente a população está passando por uma expansão mantendo ao tamanho efetivo ótimo para garantir a manutenção da população.

## 1. INTRODUÇÃO

Na América do Sul, um dos mais importantes sistemas hídricos tropicais é a bacia do rio Orinoco. Localizada ao Norte do continente, entre os territórios de Venezuela e Colômbia abrange uma área de 1 milhão de km<sup>2</sup> (Colonnello 1990; León 2005) que abriga cerca de 1000 espécies de peixes que ocupam diversos nichos ecológicos (Lasso et al. 2004; Maldonado-Ocampo et al. 2008). Esta fauna íctica, representada pelos principais grupos neotropicais (Characiformes e Siluriformes) contém a maior riqueza a nível mundial (Lowe-McConnell 1999; Reis et al. 2003) e constitui um recurso pesqueiro tropical importante para população ribeirinha.

A maioria das espécies que compõem esse recurso pesqueiro apresentam comportamentos migratórios (Welcomme & Halls 2004), viajando longas distâncias, se convertendo em um recurso compartilhado ou transfronteiriço.

Segundo Makrakis et al. (2012) e Barthem & Fabré (2004) as migrações dos peixes nos ambientes Sulamericanos são complexas. Assim, Barthem & Fabré (2004) classificam em dois grupos os peixes migratórios: migradores que usam ambientes lacustres e fluviais (ex. *Piaractus brachypomus*, *Pseudoplatystoma* spp) e migradores que usam principalmente a calha dos rios (ex. *Brachyplatystoma vailantii*, *Brachyplatystoma rousseauxii*).

Entender o padrão migratório e estrutura genética de uma população natural é um requerimento básico para o sucesso do manejo pesqueiro (Jungwirth et al. 2000) e a correta identificação das unidades de manejo (Olsson et al. 2011). No entanto, os detalhes sobre características das populações nas principais espécies ainda são escassas (Petrere 1985; Carolsfeld et al. 2003) o que se reflecte na sua lenta recuperação.

Dois fatores importantes pré-requisito para o manejo pesqueiro moderno são a manutenção da diversidade genética e a identificação das unidades de manejo, também conhecidas em biologia pesqueira como estoque pesqueiro (Allendorf et al. 1987). Entendendo como unidade de manejo: “populações demograficamente independentes com fluxo génico restrito entre eles”; ou seja, sua dinâmica populacional (taxa de crescimento) depende da taxa de nascimento e mortalidade e não da imigração (Funk et al. 2012).

A identificação dessas unidades é útil em conservação para manter ao longo prazo a persistência da espécie. Em biologia pesqueira permite metas de manejo a curto prazo como a definição de áreas pesqueiras, cotas pesqueiras, monitoramento e o conhecimento do estado de conservação da população (Funk et al. 2012). Estas unidades se caracterizam pelas formas próprias de variação genética, fisiológica e ecológica (Allendorf & Ryman 1987), características que permitem responder aos diversos fatores ambientais e/ou antropogênicos como: pressão pesqueira, degradação do habitat e competição com espécies invasoras (Allendorf et al. 1987; Stepiens 1995).

A variação genética é um dos principais atributos das populações, e avaliá-la é fundamental para sua aplicação em biologia da conservação. Ela é influenciada por múltiplos fatores como mutação, migração, seleção e deriva gênica, diminuindo-a ou acrescentando-a, e portanto, varia consideravelmente entre populações (Freeland 2005; Templeton 2011).

Em populações naturais, a diversidade genética normalmente têm níveis altos de variação, a qual esta relacionada com o grande tamanho populacional, ambientes heterogêneos e história de vida da espécie. Esta diversidade pode mudar dentro e entre populações e de espécie para espécie (Frankham et al. 2002).

Pelo contrário, a redução da diversidade genética é decorrente basicamente das modificações do ambiente e/ou da ação antrópica, cuja consequência tem efeitos genéticos como endogamia, efeito de “gargalo de garrafa” e alterações no padrão do fluxo gênico (Frankham et al. 2008).

Para detectar a variabilidade genética é importante escolher o marcador molecular, levando em consideração as taxas de mutação que variam dentro e entre o genoma (Freeland 2005). Marcadores do tipo microssatélites geralmente são amplamente utilizados porque que refletem altos níveis de variação genética com relação a outros marcadores, além de apresentarem herança mendeliana, serem codominantes, considerados não codificadores e abundantes no genoma (Schlötterer 2000).

Nesta pesquisa, estudou-se a população do *Piaractus brachypomus* conhecido como morocoto na Venezuela ou cachama blanca na Colômbia (Machado-Allison 1982). Reportada como espécie migratória transnacional, amplamente distribuída em toda a bacia (Usma et al. 2009), de importância pesqueira (Novoa 2002; Lasso et al. 2011) e aquícola nesta região (Landines-Parra & Mojica-Benítez 2005).

O *Piaractus brachypomus*, pertencente à família Serrasalminidae (Ortí et al. 2008; Oliveira et al. 2011), se caracteriza por seu corpo romboidal de cor parda cinza no dorso e lados do corpo e o abdômen esbranquiçado com manchas de cor alaranjada de tonalidade leve (Machado-Allison 1982). É um peixe oportunista que muda seu hábito alimentar conforme a disponibilidade no ambiente, na época de chuvas alimenta-se principalmente de variedade de frutos e na época da seca se torna carnívoro (Novoa 2002; Taphorn B. 2003).

É considerada como uma espécie migradora, com máximos deslocamentos de 400 a 500 km que realiza desde o baixo Orinoco aos afluentes de águas brancas em dois a três meses. O deslocamento não é contínuo, uma vez que os adultos de 4 a 8 kg muitas vezes param para recuperar parte do gasto energético produzido durante o percurso. Os adultos vão amadurecendo durante o trajeto, motivo pelo qual suas movimentações podem ser consideradas como migrações reprodutivas (Novoa 2002). A espécie tem elevada fecundidade, que varia de 200.000 a 1.500.000 ovócitos por fêmea (Novoa 2002; Landines-Parra & Mojica-Benítez 2005).

Estudos pesqueiros reportam que a população de *Piaractus brachypomus* sofre sobrepesca por crescimento, apresentando diminuição pesqueira nos últimos anos (CCI 2008; Machado-Allison 2010; Lasso et al. 2011)

Sobre estes argumentos e considerando que a população do Orinoco foi delimitada como uma Unidade Evolutiva Significante, o objetivo desta pesquisa foi conhecer as características genéticas (diversidade genética, estrutura populacional e fluxo gênico) da população de *Piaractus brachypomus* na bacia do rio Orinoco e identificar as unidades de manejo que nela existam, como um aporte científico que ajude no planejamento futuro das estratégias de manejo para a recuperação e aproveitamento sustentável da espécie nesta região.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1. Área de estudo**

A bacia do rio Orinoco tem uma extensão de 1,1 milhão de quilômetros quadrados compartilhados entre Venezuela (70%) e Colômbia (30%) (Colonnello 1990) com uma descarga anual de  $36 \times 10^3 \text{ m}^3/\text{s}$  (Hamilton & Lewis 1990). A bacia é caracterizada por Zink (1982) segundo a fisiografia do território em três porções: 1) Andina ou montanhosa, 2) Llanera ou de planície aluvial e 3) Guayanesa ou de altiplanície.

A bacia Andina é formada pelo sopé da cordilheira oriental dos Andes, na Colômbia e sua continuação na Venezuela, com variação de altitude de 4000 a 200 m. Caracteriza-se pelas águas transparentes com muitos nutrientes e riachos de grande inclinação. Dentro dos afluentes importantes estão os rios Upia, Humea, Guayuriba e Casanare que fluem para o rio Meta; o Uribante, Sarare, Santo Domingo e Masparro que fluem para o rio Apure.

A bacia Llanera, formada pelos rios que percorrem desde os contrafortes Andinos (200 m acima do nível do mar) até a confluência com o rio Orinoco (menos de 100 m acima do nível do mar), compreende rios que tem origem nos Andes como Guaviare, Meta, Arauca, Apure e Portuguesa e rios que se originam na mesma planície como Capanaparo e Cinaruco. São de águas barrentas, com pouca velocidade causada pela pequena inclinação que forma muitos meandros.

A bacia Guianesa é formada pelos rios mais torrentosos como Caroni, Caura, Cuyuní, Ventuari, Paragua que tem sua origem no escudo Guianês. Caracterizam-se por apresentar inclinações muito variáveis, desde caídas livres até cachoeiras com águas de cor escuro, transparentes e ácidas.

Segundo o curso, o rio Orinoco é chamado de alto Orinoco, desde seu nascimento na Serra de Parima (1047 m acima do nível do mar) até as cachoeiras de Guaharibos (a menos de 150 m acima do nível do mar) trajeto formado por um vale escarpado que desses quase 900 metros, com várias cachoeiras que fazem da topografia íngreme, sem formação de áreas alagadas e difícil para a navegação. As águas do rio são de cor clara pela carga moderada dos compostos orgânicos. Depois desta área e até as cachoeiras de Atures (perto de Puerto Ayacucho) é chamado médio Orinoco. A partir daí, o curso que tinha uma direção oeste e norte, agora se dirige para o leste. Nesta porção é chamado de

baixo Orinoco, caracterizado pelas pequenas inclinações, até o delta, que é formado por um complexo de ilhas e lagoas (Zink 1982).

## **2.2. Obtenção de dados**

### **2.2.1. Coleta de amostras**

O estudo foi realizado em cinco localidades na bacia Llanera, entre o médio Orinoco e baixo Orinoco: 1) San José del Guaviare no alto rio Guaviare; 2) Puerto López no alto rio Meta; 3) Puerto Carreño no médio rio Orinoco; 4) San Fernando de Apure no médio rio Apure e 5) San Felix no baixo rio Orinoco (Figura 1).

Em quatro localidades foram amostrados 20 indivíduos de *Piaractus brachypomus*, excepto o baixo Orinoco onde foram amostrados 15. As amostras foram a partir das pescas artesanais, coletando de cada indivíduo tecido da nadadeira adiposa que foi preservado em álcool 92,5%. Estas foram enumeradas e integradas ao banco de dados de tecidos do Laboratório de Genética e Evolução Animal –LEGAL da Universidade Federal do Amazonas na cidade de Manaus (Amazonas, Brasil).

### **2.2.2. Extração de DNA, amplificação e genotipagem**

A extração de DNA foi realizada pelos métodos de CTAB 2% (Doyle & Doyle 1987) e Fenol Clorofórmio (Sambrook et al. 1989). A qualidade foi avaliada em comparação com um DNA padrão de concentração definida, em gel de agarose 0.8% corado com *GelRed (Biotium)*. A quantificação foi realizada por espectrofotometria através do *Nanodrop 2000 Thermo-Scientific*. O DNA foi diluído em uma concentração final de 50 ng/ml.

As análises genético populacionais foram realizadas usando o marcador molecular tipo microssatélites através do procedimento de transferibilidade de sete marcadores desenvolvidos para duas espécies filogeneticamente próximas: *Piaractus messopotamicus* (Calcagnotto et al. 2001) e *Colossoma macropomum* (Santos et al. 2009) (Tabela 1).

A reação de cadeia de polimerase (PCR) foi realizada num termociclador *AppliedBiosystem* com volume total de 10 µL. O protocolo usado para os *primers* Pme4, Pme5, Pme21, Cm1F7 teve as seguintes condições de reação: 2,9 µL de água *milliQ*, 1,0 µL de dNTP (10mM), 1,0 µL MgCl (25mM), 1,0 µL de *Buffer* 10X (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0,7 µL de

*primer forward*, 1,0 µL de *primer reverse*, 0,3 µL de M13 (FAM), 0,8 µL BSA e 0,5 µL de Taq (1,0U). Do *mix* da reação foi usado 9 µL e 1 µL de DNA. Para os *primers* Pme20, Cm1G7 e Cm1B8 foi realizada a seguinte reação: 2,3 µL de água milliQ, 1,0 µL de dNTP (10mM), 1,0 µL MgCl (25mM), 1,0 µL de *Buffer* 10X (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 1,0 µL de *primer forward*, 1,5 µL de *primer reverse*, 0,7 µL de M13 (FAM), 0,5 µL de Taq (1,0U) e 1 µL de DNA.

As condições da amplificação para o primeiro grupo de *primers* foram as seguintes: primeiro ciclo de 30 repetições: desnaturação a 94°C por 10 segundos, temperatura de anelamento específico para cada *primer* de 30 segundos e extensão a 72°C por 45 segundos. Segundo ciclo de 25 repetições: desnaturação a 94°C por 10 segundos, temperatura de anelamento do *primer* M13 a 53°C por 15 segundos e extensão a 72°C por 45 segundos; extensão final a 72°C por 25 minutos. As condições da amplificação para o segundo grupo de *primers* foi: primeiro ciclo de 30 repetições: desnaturação a 94°C por 10 segundos, temperatura de anelamento específico para cada *primer* de 30 segundos e extensão a 68°C por 40 segundos. Segundo ciclo de 20 repetições: desnaturação a 94°C por 10 segundos, temperatura de anelamento do *primer* M13 a 53°C por 30 segundos e extensão a 68°C por 30 segundos; extensão final a 72°C por 30 minutos.

A amplificação foi verificada por eletroforese através do gel de agarose 1% usando 2 µl do produto da PCR e 3 µl de marcador *GelRed* (*Biotium*). O produto da PCR foi diluído em água deionizada conforme a concentração para uma melhor visualização.

A genotipagem foi realizada usando 1µl do produto da PCR diluído acrescentado com 8µl de formamida e 1µl do padrão ROX (DeWoody et al. 2004) e aplicados no sequenciador automático ABI 3130xl (*Applied Biosystems, Inc., USA*). O tamanho dos alelos específicos para cada microssatélite foi estimado usando o programa *GeneMapper* versão 4.0 (*Applied Biosystems Inc., USA*).

## **2.3. Análises de dados**

### **2.3.1. Verificação dos resultados moleculares**

Os dados obtidos foram revisados através dos programas *FreeNA* (Chapuis & Estoup 2007) que permite estimar a frequência dos alelos nulos para cada loco e população analisada de acordo com o algoritmo de Máxima Verossimilhança de Dempster et al. (1977). Ele estima o  $F_{ST}$  de Weir (1996) desde qualquer conjunto de microssatélites

que possam conter alelos nulos. O método usado para cada estimaco   chamado o método *ENA* (excluso de alelos) (Chapuis & Estoup 2007). O método de correcco por *ENA* corrige eficientemente o viés positivo induzido pela presenca de alelos nulos na estimaco do  $F_{ST}$ . Os valores obtidos de  $F_{ST}$  com e sem a correcco *ENA* permite realizar compara ces estatísticas (diferenca significativas através do teste no paramétrico para amostras únicas de *Wilcoxon*) entre ambas as estimaces para detectar o efeito deste tipo de alelos, o que em consequência permite identificar aqueles *locus* com alelos nulos cuja presenca nas popula ces poderia afetar significativamente nas análises, e que portanto devem ser excluídos da matriz de dados

Adicionalmente, com o programa Arlequin 3.1 (Excoffier et al. 2005) foi testado o desequilíbrio de liga co entre os locus usando 10000 permuta ces seguido da correcco de *Bonferroni* (Rice 1989).

### **2.3.2. Diversidade genética e estrutura populacional**

A estimativa da diversidade genética (número de alelos, riqueza alélica e heterozigocidade observada e esperada) e estimativa do equilíbrio de *Hardy & Weinberg* (H&W) foi realizada no programa Arlequin 3.1 (Excoffier et al. 2005) usando o método *Markov Chain Monte Carlo* (MCMC) e correcco de *Bonferroni* (Rice 1989)

Partindo da premissa que *Piaractus brachypomus* tem uma popula co amplamente distribuída e de comportamentos migratórios formando uma única popula co, verificou-se a existência ou no de estrutura co populacional na bacia do Orinoco.

A identifica co de grupos biológicos foi realizada pela análise *Bayesiana* no programa *Structure* (Pritchard et al. 2000), que agrupa os indivíduos de acordo com suas frequências alélicas de cada locus dentro de um *cluster* definindo o número de grupos que existem na popula co. Para o cálculo, usou-se 50.000 MCMC e 5.000 permuta ces de corte (*burn-in*). A varia co de *cluster* posteriori foi de  $K=1$  a  $K=7$  com 10 repeti ces para cada  $K$ . Usou-se o modelo de *admixture* ou modelo de frequências correlacionadas, que assume que cada indivíduo pode ter ancestrais oriundos de mais de uma popula co, e frequências alélicas correlacionadas, favorecendo a melhor identifica co de popula ces sub-estruturadas. A observa co dos resultados foi feita usando *Structure Harvester* (Earl & VonHoldt 2012) que adicionalmente permite determinar o  $K$  verdadeiro a partir do valor máximo estimado (*Falush et al. 2003*).

Adicionalmente, foi verificada a homogeneidade genética entre todas as localidades amostradas, usando a Análise de Variação Molecular (AMOVA) a qual é baseada na variação de frequência gênica, determinando o grau de diferenciação através da estimativa dos índices  $F$  de Wright (1969). O cálculo foi realizado pelo programa Arlequin 3.1 (Excoffier et al. 2005) com uma significância de 10.000 permutações.

A conectividade genética entre as localidades amostradas foi realizada através do teste de Mantel (Mantel 1967) implementado no programa Arlequin 3.1 (Excoffier et al. 2005), que avalia a correlação entre os valores  $F_{ST}$  par a par e distâncias geográficas. A análise foi realizada com 10.000 permutações e intervalo de confiança de 95%. As comparações par a par de  $F_{ST}$  foram ajustadas com a correção de *Bonferroni* (Rice 1989). A distância geográfica entre os pontos de coleta foram obtidos no programa *Google Earth* (Google 2013) seguindo o curso dos rios entre cada par de localidades.

### **2.3.3. Fluxo gênico, tamanho populacional e demografia histórica**

A análise do fluxo gênico entre as localidades e tamanho efetivo populacional foram calculados usando inferência de máxima verossimilhança e Bayesiana para estimar os parâmetros  $\theta$  ( $\Theta$ ) e taxa de imigração ( $M$ ) obtidos no programa *Migrate* Ver 3.2 (Beerli & Palczewski 2010), os quais foram utilizados para a conversão dos dados demográficos. A taxa de mutação que se assumiu para microssatélites foi de  $10^{-4}$  (Chistiakov et al. 2006)

Com o fim de conhecer se a população tem experimentado possíveis efeitos de redução no tamanho populacional em diferentes tempos, os dados foram analisados através do programa *Msva* 1.3 (Beaumont 1999; Storz & Beaumont 2002) baseado na análise coalescente e modelo mutacional SMM (*Stepwise Mutation Model*) para estimar a história demográfica. A estimativa do tamanho populacional foi realizada usando o modelo exponencial, que na versão atual de *Msva* é ajustado para datar as mudanças no tamanho das populações em períodos de tempo relativamente grandes (Storz & Beaumont 2002; Storz et al. 2002). Foram realizadas 10 corridas independentes usando MCMC com 100.000 permutações e 20.000 permutações de corte e tempo generacional de 3 anos (Landines-Parra & Mojica-Benítez 2005). A direção da mudança demográfica foi determinada de acordo com o valor de  $r$  (raio da distribuição posterior do tamanho populacional atual e ancestral ( $r=N_0/N_1$ )) onde  $r=1$  significa uma população estável,  $r<1$  declínio populacional, e  $r>1$  população em expansão (Beaumont 1999). O valor de tempo

desde que o tamanho populacional começa mudar ( $tf$ ), o tamanho efetivo populacional ancestral ( $N_1$ ) e atual ( $N_0$ ) foram obtidos a partir da conversão dos valores a escala  $\log$ .

Adicionalmente, foi usado o programa *Bottleneck* (Cornuet & Luikart 1996) que permite detectar recentes gargalos populacionais usando os modelos mutacionais: modelo de alelos infinitos (IAM) e modelo mutacional a passos (SMM). O programa calcula cada população amostrada para cada loco, a distribuição de heterozigocidade esperada ( $Heq$ ) desde o número de alelos observados ( $k$ ) dado um tamanho amostral ( $n$ ). *Bottleneck* trabalha sobre a premissa, que população está em equilíbrio entre mutação e deriva gênica (o tamanho efetivo é constante no passado).

Em uma população que não passa por um gargalo e que está perto do equilíbrio mutação-deriva, a heterozigocidade esperada ( $Heq$ ) é igual a heterozigocidade em equilíbrio de *Hardy-Weinberg* ( $He$ ). Mas se uma população tem passado pelo recente gargalo, o equilíbrio mutação-deriva é transitoriamente perturbado e a medida de heterozigocidade ( $He$ ) poderia exceder a heterozigocidade ( $Heq$ ), calculada pelo número de alelos amostrados (Luikart & Cornuet 1998). A significância das análises foi testada pelo *Wilcoxon signed-rank test*.

### 3. RESULTADOS

Um total de 95 indivíduos procedentes de cinco localidades da natureza foram analisados usando sete *loci* de microssatélites. Nos dados obtidos não foi observada a presença de alelos nulos, uma vez testado com o programa *FeeNa* e a correção de (Chapuis & Estoup 2007). A análise mostrou valores similares:  $F_{ST}=0,042$  (CI95%: 0,015-0,077) usando a correção e  $F_{ST}=0,043$  (CI95%: 0,013-0,084) sem a correção. Ao realizar a comparação estatística usando o teste paramétrico para amostras únicas de *Wilcoxon*, não mostrou diferenças significativas entre elas ( $W$ -valor=3  $p \leq 0,05$ ;  $N=7$ ) o que indicou que os dados obtidos neste estudo não apresentam alelos nulos.

O teste de desequilíbrio de ligação analisado para cada população depois da correção de *Bonferroni* ( $p < 0,00238$ ) não mostrou valores significativos nos locos estudados, sugerindo que estes são herdados independentemente.

#### 3.1. Diversidade genética

Neste estudo encontrou-se um total de 62 alelos na população com número médio total de 9 alelos por locus. Do total de alelos achados, 12 foram exclusivos distribuídos em todos os locos, sendo o locus Cm1B8 que apresentou maior número de alelos (três) (Tabela 2).

Analisando o conjunto de locos por localidades, o menor número de alelos foi encontrado no Puerto Carreño com 39 alelos, e maior número no Guaviare com 48 alelos. Entre as localidades amostradas Guaviare teve o maior número de alelos exclusivos (sete) enquanto que Apure não apresentou nenhum (Tabela 2).

A diversidade alélica calculada como o número médio de alelos por locus teve uma variação de 5,57 (meio Orinoco) a 6,86 (Guaviare) (Tabela 3).

A diversidade genética calculada como Heterozigocidade esperada teve um valor médio de 0,66 para toda a população, e manifestou-se homogênea em todas as localidades amostradas com uma leve variação de 0,61 em baixo Orinoco a 0,70 em Apure (Tabela 3). Desvios significativos de *Hardy-Weiberg* depois da correção de *Bonferroni* foram achadas em alguns locos de quatro localidades: Meta e médio Orinoco (Cm1B8), Guaviare (Pme20, Pme21) e baixo Orinoco (Pme4, Pme21, Cm1F7) motivo pelo qual a hipótese de equilíbrio para a população foi rejeitada ( $p < 0,00714$ ) (Tabela 3).

A estimativa global para o coeficiente de endogamia  $F_{IS}=0,166$  ( $p<0,0001$ ) variou entre  $F_{IS} =0,06916$  em Apure a  $F_{IS}=0,321$  em Baixo Orinoco, mostrando uma deficiência de heterozigotos significativa na população(Tabela 3).

### 3.2. Estrutura populacional

A análise de estruturação populacional realizada pela inferência Bayesiana no programa *Structure* (Pritchard et al. 2000), considerou só um *cluster* ou uma unidade biológica como a mais provável que congrega o conjunto de indivíduos da população estudada ( $K=1$ ; LnProb meia=-2125,3; 50000 replicas MCMC; 5000 *burn-in period*; modelo *admixture*) de um total de cinco simulações independentes com  $K=1$  a  $K=6$  agrupamentos (Figura 2).

A Análise de Variância Molecular AMOVA mostrou um valor baixo de estrutura genética com  $F_{ST} = 0,044$  ( $p<0,0001$ ), sugerindo que a fonte da variação está relacionada com a diferenciação das frequências alélicas entre os indivíduos (Tabelas 4).

A relação par a par dos valores de  $F_{ST}$  entre as localidades depois da correção de *Bonferroni* mostrou que o baixo Orinoco apresentou maior diferenciação genética com relação às outras localidades como Meta, Apure e Guaviare; e em segundo lugar o Guaviare com relação ao meio Orinoco, Apure e Baixo Orinoco (Tabela 6).

Realizando o teste de Mantel, encontrou-se que não existe relação significativa par a par entre a distância genética e a distância geográfica ( $r=0,365120$ ;  $p= 0,196100$ ; 10000 permutações).

### 3.3. Fluxo gênico e tamanho efetivo populacional

A análise de fluxo gênico estimada como taxa de imigrantes por geração a nível mutacional variou de 0,925 de Meta para Guaviare até 2,825 do médio Orinoco para Apure. Entanto que o tamanho efetivo populacional a nível mutacional foi de  $\Theta = 1,02$  no Meta a  $\Theta =2,27$  em Guaviare (Tabela 7).

Depois da transformação dos parâmetros a partir do máximo valor, o tamanho efetivo populacional para a população no Orinoco teve uma média de 1675 indivíduos efetivos, com um intervalo entre 1208 indivíduos efetivos por geração no Meta a 2500 indivíduos efetivos por geração no Guaviare. O fluxo gênico apresentou-se bidirecional e

assimétrico ao longo da população, com variação mínima de 2,033 imigrantes efetivos de Apure para o baixo Orinoco até 7,215 imigrantes efetivos do médio Orinoco para Apure. Considerando o número de imigrantes acumulados o Meta foi quem recebeu o menor número de imigrantes efetivos (13,70) enquanto que Apure foi a localidade que recebeu mais indivíduos (21,59) (Tabela 8).

### 3.4. Demografia histórica

A análise de demografia histórica da população de *Piaractus brachypomus* (Orinoco) exibiu sinais de redução dramática do tamanho populacional, indicado pelo valor de  $r$  menor de um ( $r = 6,14 \cdot 10^{-5}$ ). A população atual representou só uma pequena fração do tamanho efetivo populacional da população ancestral com 62 indivíduos vs 1.009.190 indivíduos, respetivamente (Figura 3a).

A estimativa do tempo de início do decrescimento populacional foi datada há 690 anos que em termos geracional equivale aproximadamente 184 gerações atrás (Figura 3b).

A análise realizada por *Bottleneck*, assumindo o modelo de SMM ( $p = 0,00000$ ) mostrou deficiência de  $He$  ( $p = 0,00781$ ) indicando que a população está passando por uma recente expansão do tamanho populacional.

## 4. DISCUSSÃO

### 4.1. Diversidade gênica e estrutura populacional

A diversidade genética é um atributo importante dentro de uma população, constitui a capacidade que a espécie tem de suportar as pressões do ambiente. Sua avaliação e quantificação é fundamental em genética de populações e em biologia da conservação. Pode ser medida em termos de riqueza alélica ( $A$ ), polimorfismo ( $P$ ) e heterozigocidade esperada ( $He$ ), sendo a última a mais comumente usada para comparar quantidades entre populações porque não é influenciada pelo tamanho populacional e é a medida que melhor representa o potencial adaptativo da espécie.

O nível de diversidade gênica para a espécie *Piaractus brachypomus* calculada como riqueza alélica foi baixo (média de 6,11) comparado com o valor geral para peixes de águas doces (7,5) (DeWoody & Avise 2000) e outros peixes da América do Sul como *Colossoma macropomum* (21,4) (Santos-Freitas 2010), *Arapaima gigas* (12,4) (Leão 2009), *Brachyplatystoma rousseauxii* (11,3) (Batista 2010), *Brachyplatystoma vaillantii* (9,2) (Rodriguez 2009) e *Piaractus mesopotamicus* (8,5) (Calcagnotto & DeSalle 2009).

Mas em termos de heterozigocidade esperada, em *Piaractus brachypomus* foi moderado (0,66) comparado com peixes de águas doces em geral e moderado com relação aos peixes da América do Sul como *Colossoma macropomum* (0,78), *Brachyplatystoma vaillantii* (0,75), *Arapaima gigas* (0,65), *Brachyplatystoma rousseauxii* (0,61) e *Piaractus mesopotamicus* (0,58) (Tabela 5).

Esta característica indica que a espécie do Orinoco pode responder a fatores adversos estocásticos (variação climática, catástrofes ambientais) e/ou determinísticos (pressão pesqueira, fragmentação do habitat, introdução de espécies) que lhe permitem manter a população.

Já dentro da população de *Piaractus brachypomus* na bacia encontrou-se que a diversidade genética medida como heterozigocidade esperada ( $He$ ) se apresentou relativamente homogênea em todas as localidades amostradas. No entanto pequenas diferenças se evidenciaram no Meta e baixo Orinoco com valores um pouco menores com relação Apure, médio Orinoco e Guaviare, o que indica que nestas áreas os indivíduos da espécie são mais susceptíveis a fatores que altere sua sobrevivência (Tabela 3).

Encontrou-se na população em desequilíbrio *Hardy-Weinberg* (H&W) em alguns locais de quatro localidades das cinco amostradas. Este desequilíbrio também se manifestou no índice  $F_{IS}$ , indicando excesso de homocigotos na população com probabilidade significativa nas localidades de Meta, médio Orinoco, Guaviare e baixo Orinoco (Tabela 3).

A análise de variância molecular AMOVA mostrou um valor moderado de estrutura genética com  $F_{ST} = 0,044$  ( $p < 0,001$ ) atribuída à diferenciação dos indivíduos dentro da população. Apesar de que o índice  $F_{ST}$  apresentou um valor significativo, na categoria proposta por Wright (1978) é considerada para populações como baixa estruturação. A relação par a par manifestou que as diferenças apresentam-se nas localidades de baixo Orinoco e Guaviare com relação às demais localidades. Justamente baixo Orinoco e Guaviare representam as localidades mais distantes amostradas dentro da bacia, embora o teste de Mantel tenha indicado que não existe relação significativa de isolamento por distância.

Complementando estas análises, a inferência Bayesiana realizada com *Structure*, constatou a existência de só um grupo biológico na população o que levou a aceitar a hipótese nula que indicava que a população de *Piaractus brachypomus* não é estruturada e por tanto é considerada uma unidade panmíctica na bacia do Orinoco.

#### 4.2. Fluxo gênico e tamanho efetivo populacional de *Piaractus brachypomus*

Em uma população, o fluxo gênico é uma força evolutiva que permite a troca de genes (Templeton 2011) mantendo a conectividade e aumentando sua variabilidade genética (Allendorf & Luikart 2006; Templeton 2011). Neste estudo, a estimativa com inferência Bayesiana indicou que o fluxo gênico histórico para a população de *Piaractus brachypomus* é de forma assimétrica e de alta magnitude entre as localidades amostradas, se comportando como um modelo de ilhas com interações complexas (Wright 1943; Primack 2001) (Tabela 7 e Figura 4).

Fatores intrínsecos como vagilidade e estratégia reprodutiva são considerados os que mais contribuem na homogeneidade genética da população. Na maioria dos characiformes como *Piaractus brachypomus*, as migrações reprodutivas estão associadas as mudanças no nível das águas do rio (Winemiller & Jepsen 1998). O comportamento migrador inicia com as chuvas que sobem o nível das águas e conectam as áreas alagáveis com o canal principal do rio. Os cardumes de jovens e adultos de *P. brachypomus* em estados iniciais de maturação que ali se encontram, saem das áreas alagadas ao canal principal e percorrem entre 400 a 500 km durante dois a três meses de forma descontínua enquanto vão amadurecendo (Lasso & Sanchez-Duarte 2006; Novoa 2002) em direção dos tributários andinos para se reproduzir durante a enchente (Taphorn B. 2003).

Uma vez que se reproduzem, a estratégia reprodutiva tipo  $r^2$  (Winemiller & Taphorn 1989) que caracteriza a espécie pela alta fecundidade (200.000 a 1.500.000 ovócitos/fêmea) (Landines-Parra & Mojica-Benítez 2005) permite que os ovos semi-pelágicos e larvas sejam liberados e dispersos pela correnteza para dentro das áreas alagadas onde encontram alimento e proteção (Machado-Allison 1983)

No médio Orinoco acontece um fenômeno que afeta a estabilidade normal dos rios llaneros (aluviais) causados pela pequena inclinação. Os rios são interconectados durante a época de chuvas formando uma planície alagada, chamada por Zink (1982) “delta interior” que se caracteriza pela alta produtividade. Esta grande planície se estende aproximadamente 70.000 Km<sup>2</sup> de um total estimado de 97.000 Km<sup>2</sup> da planície aluvial do Orinoco. Os alagamentos no delta interior podem manter-se por 4 a 6 meses conectando áreas dos rios Apure e Arauca entre Colômbia e Venezuela com canal principal do rio Orinoco estendendo-se até a confluência com o rio Meta (Hamilton & Lewis 1990). Neste

estudo, a área de alagamentos estão representada pelas localidades de Apure, médio e baixo Orinoco, enquanto que as cabeceiras dos afluentes andinos pelas localidades nos rios Meta e Guaviare.

Para maior entendimento do nível do fluxo gênico dentro da população, este foi categorizado em três magnitudes: baixa ( $Nm=3,0-4,4$ ), moderada ( $Nm= 4,5-5,7$ ) e alta ( $Nm=5,8-7,2$ ) taxa de imigrantes efetivos por geração.

Baseado no esquema do fluxo gênico (Figura 4 e 5) pode-se encontrar que existe troca gênica na população do Orinoco com diferentes magnitudes e orientações, que são compatíveis com as migrações de reprodução e dispersão da espécie como foi descrita acima. Neste sentido, acontece fluxo gênico de alta magnitude e mediana magnitude desde a cabeceira dos tributários (rios Guaviare e Meta) para as áreas alagadas (baixo, médio Orinoco e Apure) que podem estar influenciadas pela dispersão das larvas e alevinos logo da reprodução. No sentido inverso o fluxo gênico pode ser de alta, mediana e baixa magnitude. Aquele de alta e mediana magnitude ocorre entre as localidades que representam as áreas alagáveis (Apure, médio Orinoco e baixo Orinoco) o qual é interconectada durante a época de enchente, e este com afluentes próximos como Meta produzindo a formação do “delta interno” que aumenta a área para dispersão de juvenis e adultos imaturos. O fluxo gênico de baixa magnitude representa-se entre as localidades das áreas alagadas (Apure, médio e baixo Orinoco) com os afluentes (Guaviare e Meta) e entre os afluentes, o qual está associado com a migração dos adultos maduros para se reproduzir nas áreas altas dos tributários.

O tamanho efetivo de uma população é entendido como o tamanho de uma população idealizada que perderia diversidade genética (ou se tornaria endogâmica) na mesma taxa da população atual (Frankham et al. 2008) ou em outros termos é o número de indivíduos reprodutivos que contribuem para geração seguinte em termos demográficos e genéticos (Moreno-Letelier 2007; Dudgeon et al. 2012).

Se determinou que o tamanho efetivo populacional para *Piaractus brachypomus* é mais ou menos homogêneo para toda a população. No entanto, no Guaviare achou-se que  $N_e$  é quase duas vezes o tamanho que o resto das localidades, e constitui a principal fonte de migrantes para as demais áreas da bacia do Orinoco.

O tamanho populacional efetivo pode dar uma indicação do estado de saúde gênica da população (Dudgeon et al. 2012). Neste sentido, o tamanho populacional no Guaviare, mostrou ser a localidade com maior número de indivíduos pode estar associado com o estado de conservação dos recursos naturais naquela área, causado pela complexidade da ordem pública que atravessa Colômbia desde há um pouco mais de meio século, enquanto que as demais localidades estão mais afeitadas pelas pesqueiras e mudanças na paisagem.

Argumentos teóricos e empíricos indicam que o tamanho populacional utilizado como meta de recuperação para as espécies protegidas é de aproximadamente 1550 indivíduos (Frankham et al. 2008). Neste estudo se determinou que o tamanho médio da população de *Piaractus brachypomus* é de 1675 indivíduos, indicando que a população está no limite de conservação tornando-se vulnerável com ao incremento das capturas pesqueiras, as quais estão sendo refletidas nas estatísticas pesqueiras nos últimos anos.

De outro lado a Figura 5, reflete a dinâmica da população na bacia do Orinoco. As barreiras geográficas presentes no médio Orinoco (Atures e Maipures) não representam obstáculos que impedem o fluxo gênico entre as áreas altas e baixas da bacia. Os afluentes andinos são a fonte importante de indivíduos para manter a população atribuída a reprodução que acontece nestas, e posteriormente a dispersão das larvas e alevinos. Enquanto que as áreas baixas principalmente o “delta interno” concentram toda a diversidade da população devido aos alagamentos anuais que aumentam a cobertura do habitat aquático oferecendo alimento e proteção aos juvenis e descanso aos adultos da população.

### **4.3. Demografia histórica**

A análise de demografia histórica realizado com *Msvr* sugeriu um forte declínio populacional datado aproximadamente 690 anos correspondente ao Holoceno, em outras palavras 184 gerações atrás.

O Holoceno, é um período que tem se caracterizado pelo clima relativamente estável, até mais ou menos 5500 anos atrás, logo vieram os ciclo de aquecimento/esfriamento que causam variações climáticas provocando reduções dos ambientes naturais (Rapp 2008) e com ele das populações de fauna que nele habitam.

Além disso estudos do paleo-*ENSOs* (fenômeno de “El Niño”) mostram fortes variações do clima registrando nos últimos milênios, mesmo tenha-se incertezas das datas exatas de ocorrência. Estudos históricos no Peru tem associado desaparecimentos de grandes civilizações com a ocorrência dos paleo-*ENSOs*, sendo as mais conhecidas as chamadas “*Chimu flood*” uma enorme inundação ocorrida em 1100 d.C e “*Nyamlap flood*” datada para 1330 d.C aproximadamente (Macharé & Ortlieb 1993).

Nos últimos tempos é bem conhecido que o fenômeno do “*El Niño*” afeta as populações pesqueiras entre outras coisas. No norte de América do Sul (Colômbia, Venezuela, Guianas e o Norte do Brasil) produzem-se grandes secas e diminuição do volume da água dos rios (UNEP 2013), afetando os habitats naturais principalmente o aquático.

É provável que o gargalo da população tenha sido causado por uma das variações fortes no ambiente a curto tempo, talvez durante a ocorrência do *paleo-ENSO Chimu flood* sendo que suas datas são coincidentes.

Em termos genéticos, um gargalo populacional leva a perda da diversidade genética se esta passa por reduções prolongadas no tamanho populacional. Gargalos severos e de curto tempo, tem baixo impacto sobre a heterozigotidade, a qual também depende do tamanho da população. Assim em uma população com um tamanho de  $N_e=100$  reduz a heterozigotidade somente 0,5% enquanto que uma população  $N_e=25$  a reduz 2% (Frankham et al. 2002). Populações grandes e exogâmicas naturalmente possuem alta diversidade genética que permitem responder as diversas pressões, e sua recuperação também está muito ligada a biologia da espécie e a disponibilidade de habitat que ele ocupa (Frankham et al. 2002; Allendorf & Luikart 2006).

Neste contexto, a população de *Piaractus brachypomus* antes da redução contava com uma população extremamente grande e pôr em alta diversidade genética, suas características migratórias, ampla distribuição na bacia, tempo de longevidade e alta diversidade genética favoreceram a manutenção da população até o presente, superando o gargalo populacional que passou.

A análise demográfica recente usando *Bottleneck* indicou que a população está em expansão. Estado que também foi reforçado pela detecção de alelos privados na maioria

das localidades amostradas da população que são um indicativo de um rápido crescimento aumentando o acúmulo de novas mutações (Rogers & Harpending 1992).

Argumentos teóricos propõem que um tamanho de população de  $N_e=500$  é adequado para manter o potencial evolutivo a longo prazo das populações silvestres, mas tem-se comprovado que o tamanho necessário não é universal, esse depende da história de vida da espécie, do ambiente que ocupa e dos tipos de ameaças que enfrentam (Frankham et al. 2008). Embora outros autores estimem que para evitar o acúmulo de alelos deletérios requerer-se  $N_e > 1000$ , e para evitar a depressão endogâmica  $N_e > 50$  (Dudgeon et al. 2012).

Apoiada neste contexto teórico, pode-se afirmar que *Piaractus brachypomus* foi reduzida a 62 indivíduos efetivos durante o gargalo populacional, número que conseguiu aumentar para manter a espécie devido à pouca perda de heterozigocidade, alto tamanho efetivo populacional ancestral, as características de história de vida da espécie e área espacial que ela ocupa na bacia do Orinoco.

## 5. CONCLUSÕES E SUGESTÕES DE MANEJO

A população de *Piaractus brachypomus* na bacia hidrográfica do Orinoco apresenta moderada variabilidade genética e magnitude de fluxo gênico ao comparado com outras espécies da bacia Amazônica. Mesmo assim, o fluxo gênico é suficiente para manter a conectividade e panmixia da população. Esta variabilidade confere a espécie capacidade gênica para reagir às condições adversas do ambiente e da ação humana.

O tamanho efetivo populacional de *Piaractus brachypomus* apresentou valores baixos, se comparados com outras espécies migratórias Amazônicas e mais ou menos homogêneos ao longo da bacia, exceto no Guaviare onde o tamanho foi duas vezes maior. Apesar disso a população está manifestando uma expansão, que está principalmente evidenciada nas áreas protegidas como Guaviare.

A área do médio Orinoco, conhecido como o “delta interno” abriga a maioria de indivíduos da bacia e porém a maior diversidade genética da população, fator que deve-se considerar na priorização de unidades de conservação para a fauna aquática.

Na bacia do Orinoco, é possível manter uma só normatividade com relação as épocas de defeso e tamanho mínimo de captura, dado que trata-se de uma única população. Esta última pode ser definida segundo estudos biológicos pesqueiros atuais obtido da área de Apure - Arauca (delta interno), que congrega a maioria de indivíduos dos diferentes afluentes.

Os afluentes andinos da bacia do Orinoco, principalmente o rio Guaviare, deveria ter um tratamento especial de conservação por ser a fonte de migrantes e da variação genética da população. A extração pesqueira nestas localidades podem ser orientadas por o manejo da pressão de pesca, assim como o cumprimento da época de defeso.

Com relação ao aspecto aquícola, a espécie deveria ser criada e mantida na mesma bacia, e não ser translocada a bacia do Amazonas para evitar erosão genética por possíveis vazamentos ao ambiente natural.

Sugere-se ter como fonte de reprodutores para a aquicultura os indivíduos provenientes do sistema Apure - Arauca, por ser onde se apresenta a maior diversidade genética, no entanto o Guaviare também pode ser considerado por ter uma diversidade

similar e riqueza alélica maior devido ao maior número de alelos privados o que pode conferir a espécie melhor adaptação ao confinamento.

As ações de recuperação local com repovoamento podem ser realizadas a partir de indivíduos provenientes de qualquer localidade da bacia dada a panmixia na população. No entanto, é aconselhável realizar estas ações entre as localidades mais próximas.

## **6. AGRADECIMIENTOS**

Em campo a Nirson Gonzales, Aniello Barbarino, Rosa Elena Ajiaco Martinez, Luz Marina Rodrigues e Luis Francisco Cubillos pela colaboração da coleta das amostras no Orinoco colombiano. A Vinícius Verona pelo apoio com os mapas.

Este trabalho foi apoiado financeiramente pela CAPES; CNPQ N° 554057/2006-9; CNPQ N° 53/2010.

## 7. BIBLIOGRAFIA

- Allendorf, F. & Ryman, N., 1987. Genetic management of hatchery stocks. In R. N & F. Utter, eds. *Population genetic and fishery management*. University of Washington Press, Seattle, pp. 141–159.
- Allendorf, F., Ryman, N. & Utter, F., 1987. Genetics and fishery management: past, present, and future. In N. Ryman & Fred Utter, eds. *Population genetic and fishery management genetics and fishery management*. University of Washington Press, Seattle, pp. 1–20.
- Allendorf, F.W. & Luikart, G., 2006. *Conservation and the Genetics of Populations*, New York, NY: Blackwell Publishing.
- Barthem, R.B. & Fabr e, N.N., 2004. Biologia e diversidade dos recursos pesqueiros da Amazônia. In M. L. Ruffino, ed. *A Pesca e os Recursos Pesqueiros na Amazônia Brasileira*. Manaus, Brazil: Ibama/ProV rzea, pp. 11–55.
- Batista, J. da S., 2010. Caracteriza o genética de estoques pesqueiros da Dourada - *Brachyplatystoma rousseauxii* (SILURIFORMES-PIMELODIDAE) na Amazônia utilizando marcadores moleculares mitocondriais e micros telites. *Genética, Conserva o e Biologia Evolutiva*, Ph.D., p.175.
- Beaumont, M.A., 1999. Detecting population expansion and decline using micros telites. *Genetics*, 153(4), pp.2013–2029.
- Beerli, P. & Palczewski, M., 2010. Unified framework to evaluate panmixia and migration direction among multiple sampling locations. *Genetics*, 185(1), pp.313–326.
- Calcagnotto, D. & DeSalle, R., 2009. Population genetic structuring in pacu (*Piaractus mesopotamicus*) across the Paraná-Paraguay basin: evidence from micros telites. *Neotropical Ichthyology*, 7(4), pp.606–616.
- Calcagnotto, D., Russello, M.A. & DeSalle, R., 2001. Isolation and characterization of micros telite loci from *Piaractus mesopotamicus* and their applicability in other Serrasalminae fish. *Molecular Ecology Notes*, 1(1), pp.245–247.
- Carolsfeld, J. et al., 2003. Migratory Fishes of South America: Biology, Fisheries and Conservation Status. *BC: World Fisheries Trust*.
- CCI, C.C.I., 2008. *Pesca y Acuicultura de Colombia 2008*.
- Chapuis, M.-P. & Estoup, A., 2007. Micros telite null alleles and estimation of population differentiation. *Molecular Biology and Evolution*, 24(3), pp.621–631.
- Chistiakov, D., Hellemans, B. & Volckaert, F., 2006. Micros telites and their genomic distribution, evolution, function and applications: A review with special reference to fish genetics. *Aquaculture*, 255, pp.1–29.
- Colonnello, G., 1990. A Venezuela floodplain study on the Orinoco River. *Forest Ecology and Management*, 33/34, pp.103–124.

- Cornuet, J.M. & Luikart, G., 1996. Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data. *Genetics*, 144(4), pp.2001–2014.
- Dempster, A.P., Laird, N.M. & Rubin, D.B., 1977. Maximum likelihood from incomplete data via the EM algorithm. *Journal of the Royal Statistical Society, Series B (Statistical Methodology)*, 39, pp.1–38.
- DeWoody, J.A. et al., 2004. Universal method for producing ROX-labeled size standards suitable for automated genotyping. *Biotechniques*, 37, pp.348–352.
- DeWoody, J.A. & Avise, J.C., 2000. Microsatellite variation in marine freshwater and anadromous fishes compared with other animals. *Journal of Fish Biology*, 56, pp.461–473.
- Doyle, J.J. & Doyle, J.L., 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin*, 19(1), pp.11–15.
- Dudgeon, C.L. et al., 2012. A review of the application of molecular genetics for fisheries management and conservation of sharks and rays. *Journal of Fish Biology*, 80, pp.1789–1843.
- Earl, D.A. & VonHoldt, B., 2012. Structure Harvester. *Conservation Genetic Resources*, 4(2), pp.359–361.
- Excoffier, L., Laval, G. & Schneider, S., 2005. Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online*, 1(1), pp.47–50.
- Falush, D., Stephens, M. & Pritchard, J.K., 2003. Inference of population structure using multilocus genotype data: linked loci and correlated allele frequencies. *Genetics*, 164(4), pp.1567–1587.
- Frankham, R., Ballou, J.D. & Briscoe, D.A., 2008. *Fundamentos de Genética da Conservação* P. M. Galetti Jr., F. P. Rodrigues, & I. P. Farias, eds., Ribeirão Preto, SP, Brazil: Editora SBG.
- Frankham, R., Ballou, J.D. & Briscoe, D.A., 2002. *Introduction to Conservation Genetics*, Cambridge, UK: Cambridge University Press.
- Freeland, J.R., 2005. *Molecular Ecology*, Chichester, England: John Wiley and Sons.
- Funk, W. et al., 2012. Harnessing genomics for delineating conservation units. *Trends in Ecology and Evolution*, 27 (9), pp.489–496.
- Hamilton, S. & Lewis, W.M., 1990. Physical Characteristics of the Fringing Floodplain of the Orinoco River, Venezuela. *Interciencia*, 15(6), pp.491–500.
- Jungwirth, M., Muhar, S. & Schmutz, S., 2000. Fundamentals of fish ecological integrity and their relation to the extended serial discontinuity concept. *Hydrobiologia*, 422/423, pp.85–97.

- Landines-Parra, M.. & Mojica-Benítez, H., 2005. Manejo y Reproducción de Carácidos. In P. . Daza, M. . Landines-Parra, & A. . Sanabria-Ochoa, eds. *Reproducción de peces en el trópico*. Bogotá, Colombia, pp. 91–103.
- Lasso, C. et al., 2011. *Catálogo de los recursos pesqueros continentales de Colombia*. C. Instituto Humboldt, ed., Bogota, Colombia.
- Lasso, C.A. et al., 2004. Biodiversidad ictiológica continental de Venezuela. Parte I. Lista de especies y distribución por cuencas. *Memoria de la Fundación La Salle de Ciencias Naturales*, 159-160, pp.105–196.
- Lasso, C.A. & Sanchez-Duarte, P., 2006. *Peces del Delta del Orinoco*,
- Leão, A.S. de A., 2009. *Análise da variabilidade genética das populações de pirarucu (Arapaima gigas, schinz 1822) dos principais tributários do rio Amazonas através do uso de marcadores microssatélites*. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazonia e Universidade Federal do Amazonas.
- León, G.S., 2005. La cuenca del río Orinoco : visión hidrográfica y balance hídrico. *Revista Geográfica Venezolana*, 46(1), pp.75–108.
- Lowe-McConnell, R.H., 1999. *Estudos Ecológicos de Comunidades de Peixes Tropicais*, São Paulo, Brazil: Edusp.
- Luikart, G. & Cornuet, J.-M., 1998. Empirical evaluation of a test for identifying recently bottlenecked populations from allele frequency data. *Conservation Biology*, 12(1), pp.228–237.
- Machado-Allison, A., 1983. Estudios sobre la sistematica de la subfamilia Serrasalmidae (Teleostei, Characidae). Parte 2: discusion sobre la condicion monofiletica de la subfamilia. *Acta Biologica Venezolana*, 11(4), pp.145–195.
- Machado-Allison, A., 1982. Estudios sobre la subfamilia Serrasalminae (Teleostei, Characidae). Parte 1. Estudio Comparado de los Juveniles de las “Cachamas” de Venezuela (Genero: Colossoma y Piaractus). *Acta Biologica Venezolana*, 11 (3), pp.1–101.
- Machado-Allison, A., 2010. Pesquería continental en riesgo (I). *TalCual*, p.23.
- Macharé, J. & Ortlieb, L., 1993. Registros del Fenómeno del Niño en el Perú. *Bull. Inst. Fr. études andines*, 22, pp.35–52.
- Makrakis, M.. et al., 2012. Diversity in migratory patterns among Neotropical fishes in a highly regulated river basin. *Journal of Fish Biology*, 81(2), pp.866–881.
- Maldonado-Ocampo, J.A., Vari, R.P. & Usma, J.S., 2008. Checklist of the freshwater fishes of Colombia. *Biota Colombiana*, 9(2), pp.143–237.
- Mantel, N., 1967. The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Research*, 27(2), pp.209–220.
- Moreno-Letelier, A., 2007. Tamaño efetivo de la población. In L. E. Eguiarte, V. Souza, & X. Aguirre, eds. *Ecología Molecular*. México, D.F., p. 608.

- Novoa, D., 2002. Los recursos pesqueros del eje fluvial Orinoco – Apure: presente y futuro. , p.143.
- Oliveira, C. et al., 2011. Phylogenetic relationships within the speciose family Characidae (Teleostei: Ostariophysi: Characiformes) based on multilocus analysis and extensive ingroup sampling. *BMC Evolutionary Biology*, 11(1), p.275.
- Olsson, J. et al., 2011. Genetic population structure of perch *Perca fluviatilis* along the Swedish coast of the Baltic Sea. *Journal of Fish Biology*, 79, pp.122–137.
- Ortí, G. et al., 2008. Phylogeny of the Serrasalminidae (Characiformes) based on mitochondrial DNA sequences. *Genetics and Molecular Biology*, 31(1(suppl)), pp.343–351.
- Petriere, M., 1985. Migraciones de peces de agua dulce en América Latina: algunos comentarios. *COPESCAL*, pp.1–17.
- Primack, R., 2001. Aplicaciones de la biología de Poblaciones. In R. Primack et al., eds. *Fundamentos de Conservación Biológica, Perspectivas Latinoamericanas*. Mexico City, Mexico: Fondo de Cultura Económica de Mexico, p. 783.
- Pritchard, J.K., Stephens, M. & Donnelly, P., 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, 155, pp.945–959.
- Rapp, D., 2008. *Assessing Climate Change: Temperatures, Solar Radiation, and Heat Balance*, California, USA: Praxis Publishing.
- Reis, R.E., Kullander, S.O. & Ferraris, C.J., 2003. Check List of the Freshwater Fishes of South and Central America. , p.734.
- Rice, W.R., 1989. Analyzing tables of statistical tests. *Evolution*, 43(1), pp.223–225.
- Rodriguez, F., 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*. INPA & UFAM.
- Rogers, A.R. & Harpending, H.C., 1992. Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences. *Molecular Biology and Evolution*, 9, pp.552–569.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. & Maniatis, T., 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* 2nd ed., Cold Springs Harbor, NY: Cold Springs Harbor Laboratory Press.
- Santos, M. da C.F., Hrbek, T. & Farias, I.P., 2009. Microsatellite markers for the tambaqui (*Colossoma macropomum*, Serrasalminidae, Characiformes), an economically important keystone species of the Amazon River floodplain. *Molecular Ecology Resources*, 9(3), pp.874–876.
- Santos-Freitas, M., 2010. *Caracterização da diversidade genética de populações naturais de tambaqui (Colossoma macropomum) através de marcadores moleculares: uma contribuição para conservação da espécie*. Universidade Federal do Amazonas, UFAM.

- Schlötterer, C., 2000. Evolutionary dynamics of microsatellite DNA. *Chromosoma*, 109, pp.265–371.
- Stepiens, C.A., 1995. Population Genetic Divergence and Geographic Patterns from DNA Sequences: Exemples from Marine and Freshwater Fishes. In *American Fisheries Society Symposium*. American Fisheries Society, pp. 263–287.
- Storz, J.F. & Beaumont, M.A., 2002. Testing for genetic evidence of population expansion and contraction: an empirical analysis of microsatellite DNA variation using a hierarchical Bayesian model. *Evolution*, 56(1), pp.154–166.
- Storz, J.F., Beaumont, M.A. & Alberts, S.C., 2002. Genetic evidence for long-term population decline in a savannah-dwelling primate: inferences from a hierarchical bayesian model. *Molecular Biology and Evolution*, 19(11), pp.1981–1990.
- Taphorn B., D.C., 2003. The Characiform fishes of the Apure River drainage, Venezuela. *Biollania*, special ed, pp.1–124.
- Templeton, A.R., 2011. *Genética de Populações e Teoria Microevolutiva* 1º ed., Riberão Preto, SP, Brazil: Sociedade Brasileira da Genética.
- UNEP, P. de las N.U. para el M.A., 2013. Repercusiones climáticas del fenómeno El Niño en América Latina y el Caribe. <http://www.grida.no/publications/vg/lacsp/page/2792.aspx>, p.12.
- Usma, J.S. et al., 2009. Peces dulceacuícolas migratórios en Colombia. In L. Germán Naranjo & J. D. Amaya Espinel, eds. *Plan Nacional de las Especies Migratorias*. Bogotá, Colombia: Ministro de Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial and World Wildlife Fund Colombia, pp. 103–131.
- Weir, B.S., 1996. *Genetic Data Analysis II: Methods for Discrete Population Genetic Data*, Sunderland, MA: Sinauer Associates.
- Welcomme, R.L. & Halls, A., 2004. Dependence of tropical river fisheries on flow. In R. L. Welcomme & T. Petr, eds. *Proceedings of the Second International Symposium on the Management of Large Rivers for Fisheries: Volume 2*. Bangkok, Thailand: FAO Regional Office for Asia and the Pacific, RAP Publication 2004/17, pp. 267–284.
- Winemiller, K.O. & Jepsen, D.B., 1998. Effects of seasonality and fish movement on tropical river food webs. *Journal of Fish Biology*, 53 (Suppl.), pp.267–296. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/B6WJF-45V7Y5V-N/2/747f5669561fd5a10e95859cbfbd0a96>.
- Winemiller, K.O. & Taphorn, D.C., 1989. La Evolución de las estrategias de vida de los peces de los llanos occidentales de Venezuela. *Biollania*, 6, pp.77–122.
- Wright, S., 1969. *Evolution and the Genetics of Populations. Volume 2. The Theory of Gene Frequencies*, Chicago, IL: University of Chicago Press.
- Wright, S., 1978. *Evolution and the Genetics of Populations. Volume 4. Variability within and among Natural Populations*, Chicago, IL: University of Chicago Press.

Wright, S., 1943. Isolation by distance. *Genetics*, 28, pp.114–138.

Zink, A., 1982. *Ríos de Venezuela Cuadernos* ., Caracas, Venezuela.

## TABELAS

Tabela 1. Marcadores moleculares usados nas análises da população de *Piaractus brachypomus* na bacia do Orinoco.

Especie	Locus/No. acesso	Primer (5' a 3')	Ta (C°)
<i>Piaractus mesopotamicus</i>	Pme4 AF362446	F: CATGCTGCTGCAGATTAGAC R: CGCTTGCAATTTAACGCAGT	55
	Pme5 AF362447	F: CAGAGCATCTGGAGGGACAT R: TCTGAGACACTGATATCTAAACACACA	55
	Pme20 AF362449	F: CAGAGCTTTGAGGAACACGA R: CCCATCAGTTACGGGTCATT	57
	Pme21 AF362450	F: ATAATGCTGGCGTCAGTGGT R: GGACAGCTGGTCTCAAGCTC	55
<i>Colossoma macropomum</i>	Cm1F7 EU6853313	F-CCTATTGTGATGGCAGAGAGAG R-CACAGACGTGTACAGCTGGTT	62
	Cm1G7 EU 685314	F-CCCAGCCTACTACAGGGTCA R-CACACATCGCTCTTCTCTCC	62
	Cm1B8 EU685316	F-CACAACCCACCTGTTTGATT R- CTAATAACAAACCTACTTCCACTTCTC	60

Tabela 2. Alelos privados, representados por tamanho e entre parênteses a frequência.

Local/locus	Meta	Meio Orinoco	Guaviare	Baixo Orinoco	Total
Pme4					0
Pme5			204 (0,050)		1
Pme20			284 (0,075)		1
Pme21	240 (0,025)	216(0,025)		218 (0,025) 222 (0,025)	4
Pm1F7				233 (0,005)	1
Cm1G7			130 (0,025) 171 (0,025)		2
Cm1B8			132 (0,025) 136 (0,025) 150 (0,025)		3
Total	1	1	7	3	12

Tabela 3. Caracterização genética de *Piaractus brachipomus*: A= Riqueza alélica,  $H_o$ =Heterozigosidade observada,  $H_e$ = Heterozigosidade esperada,  $F_{is}$ =Coeficiente de endogamia,  $p$ =significância para H&W e  $F_{is}$ , \*Nível de significância após correção de Bonferroni ( $p < 0.00714$ ).

Locus	Meta				Meio Orinoco				Apure				Guaviare				Baixo Orinoco				FIS
	A	$H_o$	$H_e$	$p < 0,05$	A	$H_o$	$H_e$	$p < 0,05$	A	$H_o$	$H_e$	$p < 0,05$	A	$H_o$	$H_e$	$p < 0,05$	A	$H_o$	$H_e$	$p < 0,05$	
Pme4	7	0.40	0.50	0.09	7	0.60	0.76	0.33	8	0.75	0.80	0.25	7	0.50	0.56	0.15	7	0.20	0.49	0.00*	0.22
Pme5	9	0.65	0.84	0.04	8	0.750	0.79	0.64	9	0.90	0.86	0.41	10	0.95	0.87	0.22	10	0.65	0.85	0.01	0.07
Pme20	2	0.40	0.38	1,00	3	0.45	0.40	0.49	3	0.20	0.31	0.09	4	0.15	0.39	0.00*	4	0.40	0.35	1,00	0.13
Pme21	6	0.50	0.60	0.12	5	0.55	0.74	0.00	4	0.65	0.65	0.93	5	0.25	0.72	0.00*	7	0.35	0.80	0.00*	0.35
Cm1F7	7	0.70	0.76	0.25	4	0.70	0.68	0.62	7	0.80	0.75	0.23	6	0.85	0.76	0.03	6	0.65	0.78	0.00*	0.00
Cm1G7	7	0.80	0.79	0.09	8	0.85	0.86	0.17	7	0.65	0.85	0.05	9	0.95	0.87	0.79	6	0.53	0.80	0.05	0.09
Cm1B8	3	0.15	0.54	0.00*	4	0.35	0.59	0.00*	5	0.55	0.66	0.27	7	0.50	0.64	0.41	3	0.15	0.23	0.03	0.37
Meia	5.86	0.51	0.63		5.57	0,61	0,69		6.14	0.64	0.70		6.86	0.59	0.69		6.14	0.42	0.61		0.17
FIS	0.18861				0.12037				0.06968				0.14037				0.32059				
$P < 0,05$	0.00				0.01				0.09				0.00				0.00				

Tabela 4. Análise de Variância Molecular AMOVA para *Piaractus brachypomus*

Fontes de variação	Componentes da variância	Porcentagem de variação
Entre populações	0.10702	4.40
Entre os indivíduos dentro das populações	0.38513	15.83
Dentro das populações	1.94000	79.76
$F_{IS}$		0.16564*
$F_{ST}$		0.04400*
$F_{IT}$		0.20235*

\*nível de significância ( $p < 0,05$ )

Tabela 5. Diversidade genética para peixes de águas doces.

<b>Especie</b>	<b>No. locus</b>	<b>A</b>	<b>He</b>	<b>Referencia bibliográfica</b>
Peixes águas doces geral	75	7,5	0,46	DeWoody & Avise (2000)
<i>Piaractus brachypomus</i> (Orinoco)	6	6,1	0,66	Neste estudo
<i>Piaractus mesopotamicus</i>	8	8,5	0,58	Calcagnotto & DeSalle (2005)
<i>Colossoma macropomum</i>	12	21,4	0,78	Santos MC (2010)
<i>Brachyplatystoma vaillantii</i>	6	9,2	0,75	Rrodriguez F (2009)
<i>Brachyplatystoma rousseauxii</i>	8	11,3	0,61	Batista J (2010)
<i>Arapaima gigas</i>	11	12,4	0,65	Leão A (2009)

Tabela 6. Relação par a par de  $F_{ST}$  entre as localidades amostradas com dados de microssatélites. Correção de Bonferroni.

<b>Localidades</b>	<b>Meta</b>	<b>Meio Orinoco</b>	<b>Apure</b>	<b>Guaviare</b>	<b>Baixo Orinoco</b>
Meta	0.00000				
Meio Orinoco	0.04812*	0,00000			
Apure	0,01552	0,01500	0,00000		
Guaviare	0,02683	0,05757*	0,03718*	0,00000	
Baixo Orinoco	0,09674*	0,03196	0,06297*	0,08697*	0,00000

\*nível de significância depois da correção de Bonferroni ( $p < 0,005$ )

Tabela 7. Taxa de imigração ( $M = m/\mu$ ) e  $theta \Theta (4Ne\mu)$  por localidade na bacia do Orinoco. Valores da media e intervalos de confiança (97,5%), X= fonte da migração.

<b>X</b>	<b>Theta</b>	<b><math>M1 \leftarrow X</math></b>	<b><math>M2 \leftarrow X</math></b>	<b><math>M3 \leftarrow X</math></b>	<b><math>M4 \leftarrow X</math></b>	<b><math>M5 \leftarrow X</math></b>
1. Meta	1,02501 (0,600-1,450)		1,575 (0,50-2,70)	1,275 (0,15-1,27)	0,925 (0,25-1,45)	1,725 (0,65-2,50)
2. Meio Orinoco	1,32501 (0,850-1,750)	1,325 (0,06-2,50)		2,825 (1,80-3,70)	1,025 (0,30-1,025)	1,425 (0,60-2,50)
3. Apure	1,27501 (0,650-1,950)	1,975 (1,10-3,05)	1,775 (1,05-2,65)		1,225 (0,60-1,90)	1,075 (0,35-1,07)
4. Guaviare	2,27501 (1,400-3,000)	1,275 (0,45-2,1)	1,475 (0,65-2,25)	1,425 (0,65-2,70)		2,275 (1,30-2,27)
5. Baixo Orinoco	1,37501 (0,900-1,900)	1,075 (0,35-1,8)	1,425 (0,60-2,50)	2,125 (0,85-3,40)	1,025 (0,45-1,650)	

Tabela 8. Fluxo gênico  $Nm$  ( $4N_e*m$ ) acima e abaixo da diagonal e tamanho efetivo populacional  $N_e$  ( $\Theta/4\mu$ ) na diagonal, a partir do máximo valor do intervalo de confiança.  $\mu$  = taxa de mutacional para microsatélites  $10^{-4}$

	<i>Nm1</i>	<i>Nm2</i>	<i>Nm3</i>	<i>Nm4</i>	<i>Nm5</i>
1. Meta	<b>1208</b>	4,725	2,476	4,350	4,750
2. Meio Orinoco	3,625	<b>1458</b>	7,215	3,075	4,750
3. Apure	4,422	4,637	<b>1625</b>	5,700	2,033
4. Guaviare	3,045	3,937	5,265	<b>2500</b>	4,313
5. Baixo Orinoco	2,61	4,375	6,630	4,950	<b>1583</b>
Total	13,70	17,67	21,59	18,075	15,85

## FIGURAS

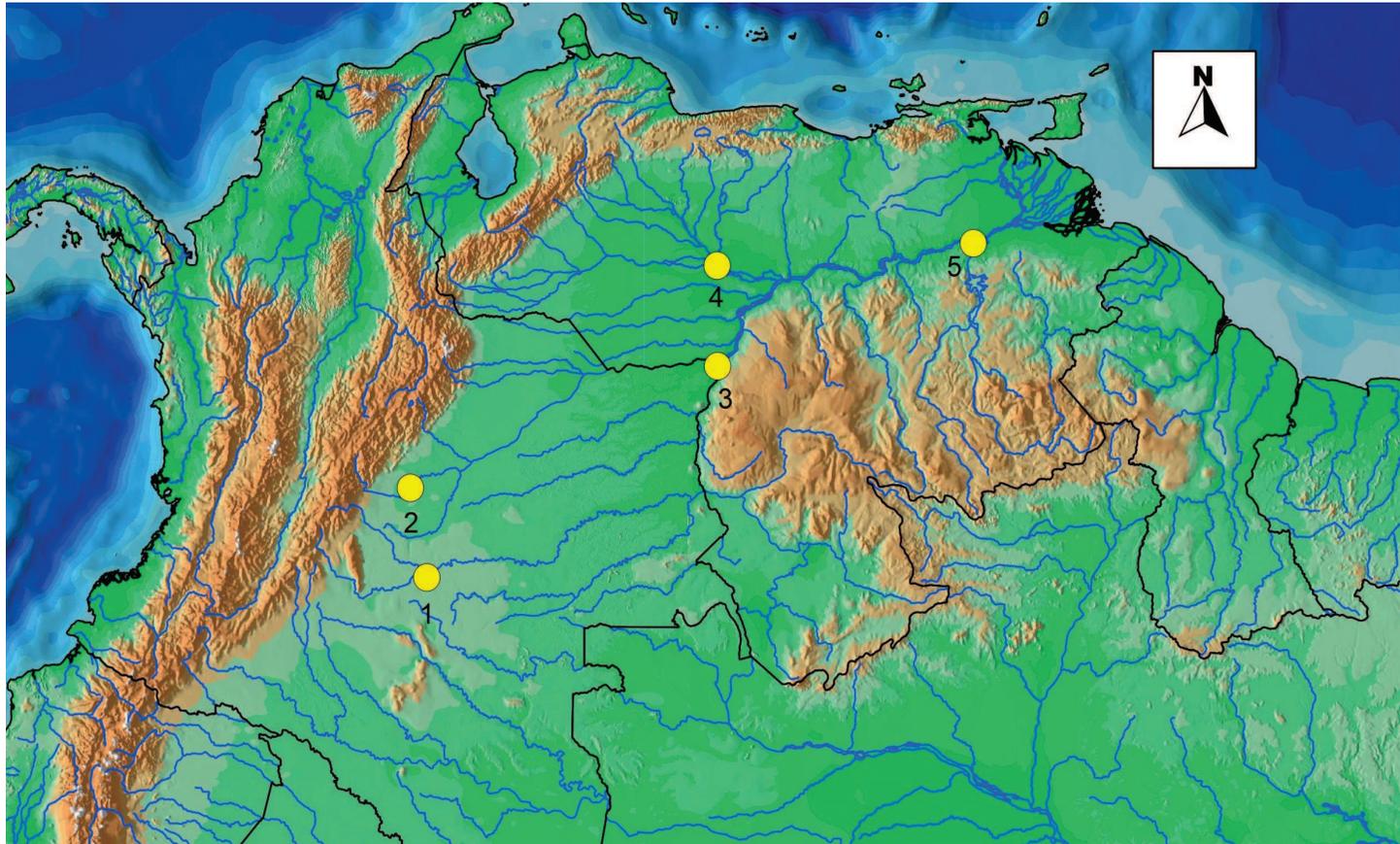


Figura 1. Localização das coletas na bacia do rio Orinoco. 1. San José del Guaviare no rio Guaviare, 2. Puerto López, no rio Meta, 3. Puerto Carreño no rio Orinoco, 4. San Fernando de Apure, no rio apure, 5. San Felix, no rio Orinoco.

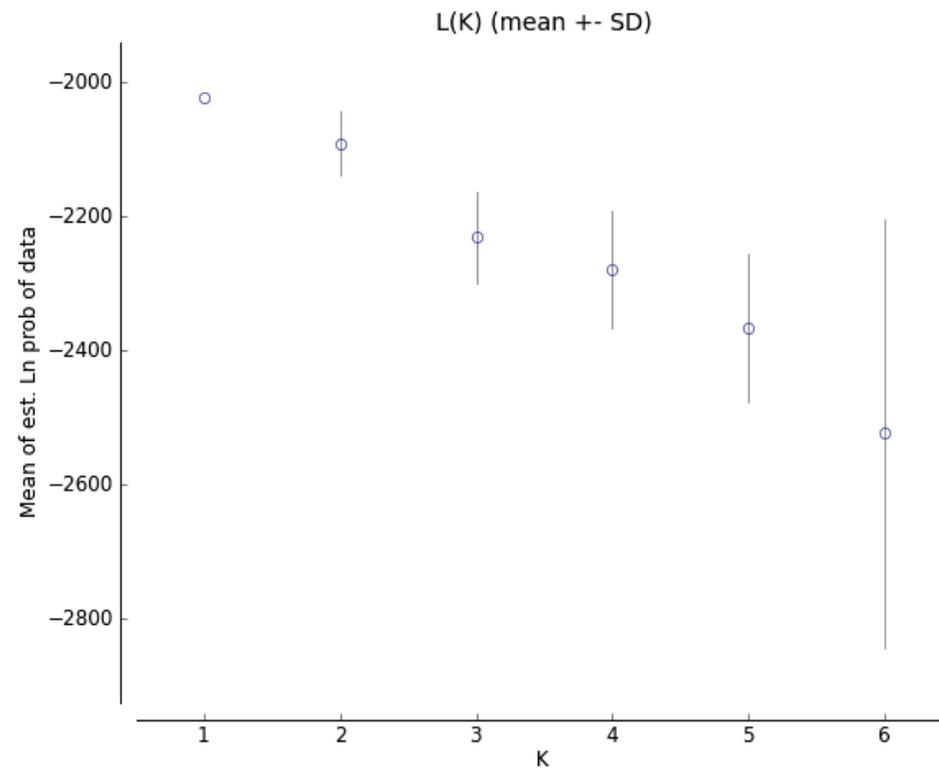
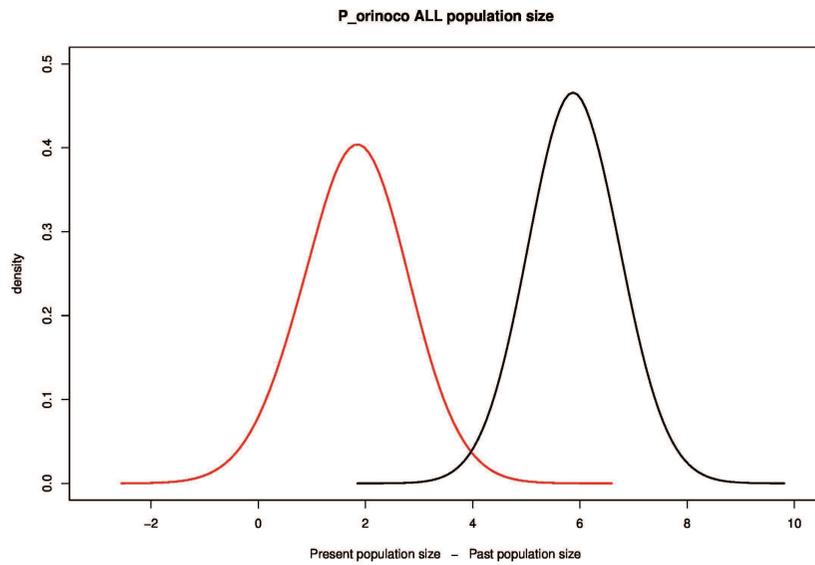
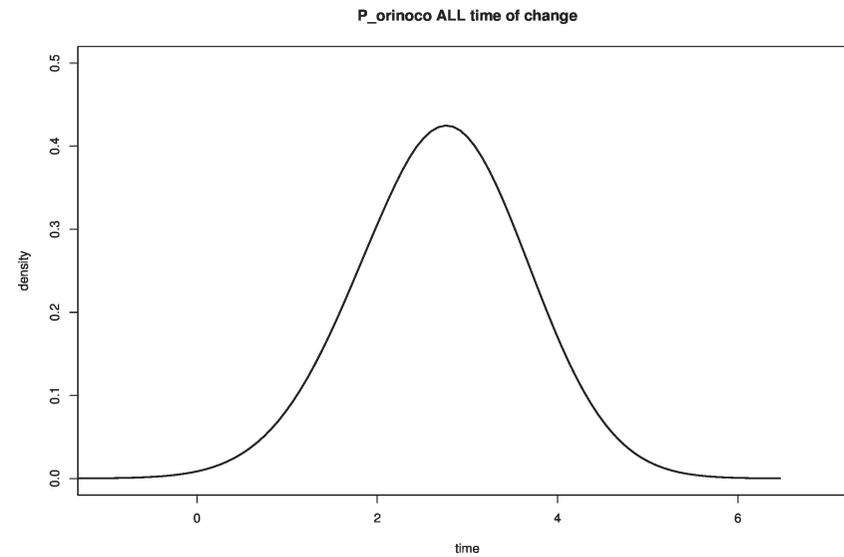


Figura 2. Resultados de *Structure* para bacia do Orinoco. A análise por máxima probabilidade, na vertical: medida da estimativa de distribuição de probabilidade dos dados, na horizontal: número de *clusters* testados.



a



b

Figura 3. Demografia histórica de *Piaractus brachypomus* na bacia do Orinoco. a) Tamanhos efetivos populacionais em vermelho a população recente, em preto a população ancestral. b) O tempo de inicio de decrescimento populacional.

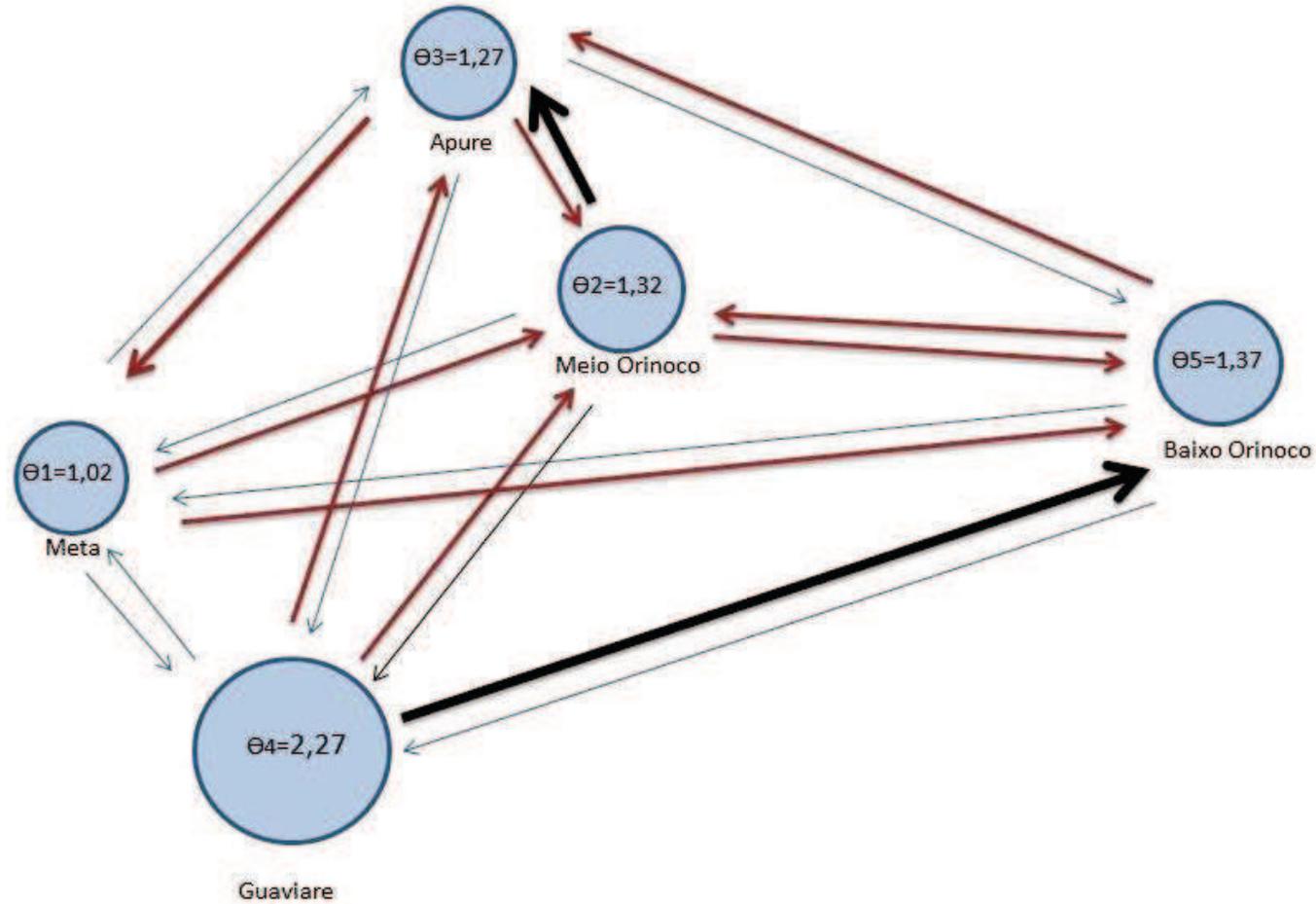


Figura 4. Diagrama de fluxo gênico da população de *Piaractus brachypomus* na bacia do rio Orinoco. Linhas azul indica baixo fluxo gênico, linha marrom indica moderado fluxo gênico e linha preta indica alto fluxo gênico.

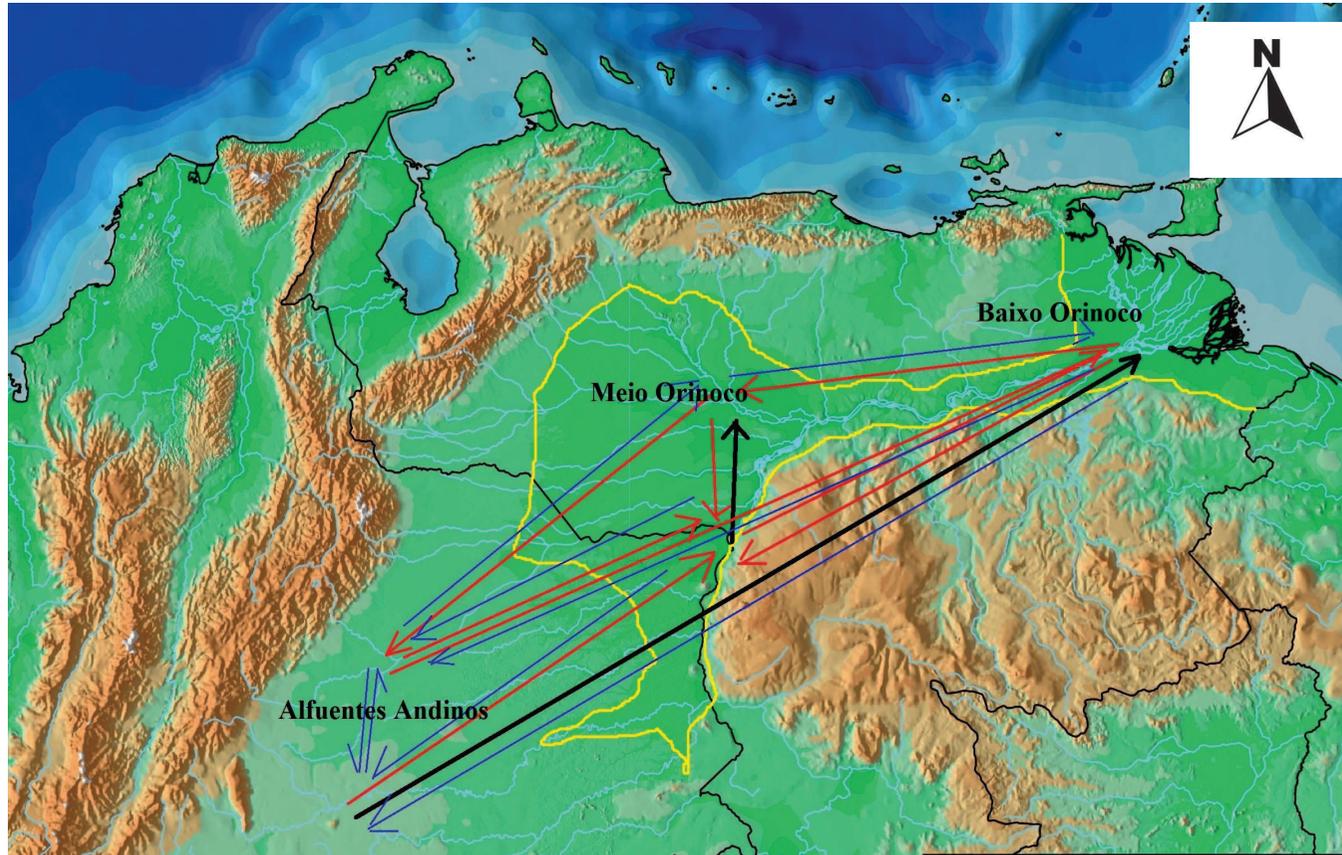


Figura 5. Fluxo gênico da população de *Piaractus brachypomus* na bacia do rio Orinoco. Linhas azul indica baixo fluxo gênico, linha marrão indica moderado fluxo gênico e linha preta indica alto fluxo gênico.

## CAPITULO III



Foto: Associação de pescadores Guajará-Mirim  
Guajará-Mirim, Rondônia, Brasil

**CARACTERIZAÇÃO GENÉTICO-POPULACIONAL DA PIRAPITINGA *Piaractus  
brachypomus* (Cuvier, 1818) NA BACIA DO RIO AMAZONAS**

María Doris Escobar L<sup>1,2</sup>, Izeni P. Farias<sup>2</sup>, Tomas Hrbek<sup>1,2</sup>

1. Laboratório de Evolução e Genética Animal, Departamento de Biologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, AM, Brasil.
2. Pós-graduação em Diversidade Biológica, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, AM, Brasil.

Palavras-chave: Diversidade genética, fluxo gênico, microssatélites, unidade de manejo.

## ABSTRACT

The population of *Piaractus brachypomus* was studied through different microsatellite markers in the Amazon River basin. High genetic diversity was detected in the population ( $H_e=0,72$ ) with respect to all other fish of the Amazon. It was possible to detect population structuring ( $F_{ST}=0,057$ ) in the identification of two Biological Units ( $K=2$ ) corresponding to two Management Units highly associated to the geomorphology of the Amazon basin. Gene flow of the population was of low magnitude ( $Nm=0,850-4,750$  effective migrants for generation) compared to other migratory fish from the Amazon, but enough to keep the connection in the population. The waterfalls in rivers Madeira, Caquetá-Japurá, Tapajós River and Branco did not constitute a physical barrier to the migration of the species or to their dispersion. The analysis of historical demography showed that the species underwent a strong population decline could be caused by strong climatic changes that have occurred in recent times. Currently the population is undergoing an expansion without even reaching the optimal effective size to ensure full recovery of the population.

## RESUMO

A população de *Piaractus brachypomus* foi estudada através de marcadores de microssatélites na bacia do rio Amazonas. A diversidade genética da população detectada foi alta ( $H_e=0,72$ ) em relação a outros peixes da Amazônia. A população mostrou ser estruturada ( $F_{ST}=0,057$ ) com a identificação de duas unidades biológicas ( $K=2$ ) correspondentes a duas unidades de manejo que estão altamente associadas à geomorfologia da bacia Amazônica. O fluxo gênico da população foi assimétrico e de baixa magnitude ( $Nm=0,850-4,750$  imigrantes efetivos por geração) quando comparado com outros peixes migratórios da Amazônia, mas suficiente para manter a conexão da população. As cachoeiras dos rios Madeira, Caquetá - Japurá, Tapajós e rio Branco não constituíram barreiras físicas para as migrações da espécie nem para sua dispersão. A análise da demografia histórica mostrou que a espécie passou por um forte declínio populacional que poderia ser causado pelas fortes mudanças climáticas que aconteceram nos últimos tempos. Atualmente a população está passando por uma expansão, sem ainda chegar ao tamanho efetivo ótimo para garantir a recuperação da espécie.

## 1. INTRODUÇÃO

Os numerosos rios de águas doces do Neotrópico, são habitat da maior riqueza de peixes do mundo ( James & Reis 2011; Myers et al. 2000). O núcleo desta biodiversidade localiza-se na Amazônia, representada principalmente pelo grupo dos Ostariophysi que representa o 77% das espécies que ali ocorrem, sendo à ordem Characiformes o 43% e à ordem Siluriformes o 39% (Lowe-McConnell 1999; Albert et al. 2011). Este mesmo grupo de peixes são os que sustentam grande parte da população local e regional através da extração pesqueira.

A maioria das espécies que compõem o recurso pesqueiro apresentam comportamento migratório (Welcomme & Halls 2004), entendido-se este, como deslocamento sincronizado que ocorrem em momentos específicos durante o ciclo de vida (Lucas et al. 2001). Em peixes amazônicos, as migrações respondem a épocas sazonais complexas ecologicamente, ainda não bem conhecidas. No entanto Barthem & Fabré (2004) classificam em dois grupos os peixes migratórios da Amazônia: migradores que usam ambientes lacustres e fluviais (ex. *Piaractus brachypomus*, *Pseudoplatystoma* spp) e migradores que usam principalmente a calha dos rios (ex. *Brachyplatystoma vailantii*, *Brachyplatystoma rousseauxii*).

Pela grande área que ocupa a bacia do Amazonas (40% da área de América do Sul) as migrações implicam deslocamentos em dois ou mais territórios nacionais, convertendo-se em um recurso compartilhado ou transfronteiriço, com manejo complexo que deve ser baseado no conhecimento integral e contexto da bacia (Barletta et al. 2010).

*Piaractus brachypomus*, é um exemplo de peixes migradores, um dos maiores Characiformes da Amazônia com ampla distribuição nos diferentes países que integram a região (Barthem & Goulding 2007). Conhecida como pirapitinga ou caranha no Brasil, cachama blanca ou paco na Colômbia, paco em Peru, cachama no Equador e tambaqui na Bolívia (Barthem & Goulding 2007; Carvajal-Vallejos & Zeballos-Fernández 2011; Lasso et al. 2011) é uma espécie de importância pesqueira e econômica na bacia Amazônica (Barthem & Fabré 2004). Estudos biológicos pesqueiros pontoais tem mostrado que nas últimas décadas a espécie vem sofrendo sobre exploração (Goulding 1979; CCI 2008).

Biologicamente, a espécie caracteriza-se por ter corpo de forma romboidal, alto e comprimido lateralmente, coloração cinza arroxeada uniforme nos adultos e cinza com

manchas alaranjadas nos jovens com uma pequena mancha escura no opérculo, devido a seus hábitos alimentares (onívoros com preferência a sementes) é considerada uma espécie que ajuda no equilíbrio da floresta (dos Santos et al. 2006). Têm estratégia reprodutiva tipo  $r^2$  (Winemiller 1989), habita tanto ambientes lacustres como fluviais, com tendência ao alto fluxo gênico entre grupos de diferentes sistemas fluviais (Barthem & Fabr e 2004). Devido a suas características biológicas   categorizada como uma espécie de grande porte, migratória de planície que se desloca entre 100 a 1500 km (Van Damme et al. 2011).

Em geral, a maioria das espécies importantes da pesca comercial são bem conhecidas, mas pouco se sabe se os indivíduos estão agrupados em um único estoque ou em vários (Bayley & Petrere Jr. 1989), aspecto que   fundamental para o manejo adequado do recurso pesqueiro.

Nas últimas décadas, análises moleculares baseadas em DNA tem sido utilizadas como ferramenta para conhecer o potencial adaptativo de uma espécie e identificar as unidades biológicas existentes na popula o, também conhecidas como unidades de manejo ou estoques pesqueiros (Allendorf et al. 1987).

Funk et al. (2012) definem unidade de manejo -*UM*- como uma popula o local com unidades diferentes por causa de sua independência demográfica, com taxa de crescimento depende da taxa nascimento e mortalidade local mais do que a imigra o.

Devido que um *UM* representa unidades isoladas demograficamente,   preciso delimita-las para inferir as subpopula es que fazem parte dela. O critério mais comum foi proposto por Mortiz quem indicou que popula es com diferença significativa de frequências alélicas de loci nucleares ou mitocondriais, levam a rejeitar estatisticamente a panmixia de uma popula o (Palsb ll et al. 2007).

E assim que identificar unidades de manejo, ajuda a definir as metas de gestão a curto prazo, as áreas pesqueiras, cotas pesqueiras locais, monitoramento e condi o da popula o (Funk et al. 2012).

De outro lado, determinar a varia o genética em uma popula o   fundamental em biologia da conserva o, porque   um dos principais atributos que está influenciado por fatores como muta o, migra o, sele o e deriva gênica, diminuindo-a ou acrescentando-a, pelo que difere consideravelmente entre popula es (Freeland 2005; Templeton 2011).

Em populações naturais, a diversidade genética normalmente têm níveis altos de variação, a qual está relacionada com o grande tamanho populacional, a heterogeneidade ambiental e história de vida da espécie. Esta variação pode mudar dentro e entre populações e de espécie para espécie (Frankham et al. 2002).

Para detectar a variabilidade genética é importante escolher o marcador molecular que vai-se usar, levando em consideração as taxas de mutação dentro e entre o genoma (Freeland 2005). Marcadores do tipo microssatélites geralmente são utilizados para estudos populacionais, eles refletem altos níveis de variação genética em relação a outros marcadores, além de apresentarem herança mendeliana, serem codominantes, considerados não codificadores e abundantes no genoma (Schlötterer 2000).

Partindo da premissa que *Piaractus brachypomus* é uma população panmítica na Amazônia, o objetivo deste trabalho foi conhecer as características genético-populacionais da espécie e sua dinâmica na bacia, como aporte aos planejamentos futuros nas estratégias de manejo para a recuperação e aproveitamento sustentável deste recurso natural na região.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1. Área de estudo

A região Amazônica integrada por nove países (Brasil, Peru, Colômbia, Bolívia, Equador, Guiana, Venezuela, Suriname e Guiana Francesa) cobre uma área de sete milhões de km<sup>2</sup> (Lowe-McConnell 1999). Geologicamente a bacia Amazônica esta definida por três estruturas: 1) a Cordilheira dos Andes, a oeste; 2) Escudos da Guiana ao norte, e do Brasil ao sul; e 3) a planície sedimentar, na porção central (IBGE 1999).

Os Andes, geologicamente mais recentes, são importantes para os ecossistemas aquáticos devido aos nutrientes que eles transportam a planície sedimentar e estuário, provocados pelas fortes chuvas que erodem os vales da cordilheira (Barthem & Fabr e 2004). Os rios que tem origem nesta forma o geológica são classificados como águas brancas pela alta quantidade de material em suspensão que carregam e o *pH* próximo ao neutro (Sioli 1984). Os rios mais importantes que fazem parte do sistema Solimões Amazonas são: pela margem direita: rios Napo, Mara on, Juruá, Purus e Madeira, e pela margem esquerda: rios Putumayo-I a, Caquetá-Japura.

Os escudos de Guiana e do Brasil são forma es antigas do pré-cambriano (Wesseling & Hoorn 2011). O escudo das Guianas ao norte do rio Amazonas, se estende desde a Guiana Francesa, Suriname, Guiana, sul e leste de Venezuela e oeste de Colômbia, limitando com a bacia do Amazonas pelo sul, e o rio Orinoco ao norte (Hammond 2005). O escudo do Brasil se estende ao sul do rio Amazonas, e delimita os maiores tributários do sudeste do rio Amazonas e cabeceiras dos rios que fluem para o rio Paraná, até a metade do rio Madeira que   interrompido por numerosas cachoeiras (Lujan & Armbruster 2011). Os rios que se originam nos escudos são classificados de águas claras e pretas com pouco material em suspensão, alta transparência e *pH* quase neutro a ácido, respetivamente (Sioli 1984). Rios importantes que fluem para a bacia do Amazonas são: Tapajós e Xingu pela margem direita e Trombetas pela margem esquerda. O rio Negro um dos mais importantes afluentes   margem esquerda origina-se numa região mais ou menos plana entre os Andes e o Escudo das Guianas (Mendes & Ferreira 1999).

A planície sedimentar possui cerca de 2 milhões de km<sup>2</sup> com superfície plana (20 mm/km)   formada pelos sedimentos carregados dos Andes e dos escudos cristalinos que se depositaram no vale Amazônico, que junto com a descarga de água favorece a

formação de um ambiente conhecido como várzea (Mendes & Ferreira 1999; Barthem & Fabré 2004). A planície Amazônica pode ser dividida em três porções: 1) Alto rio Amazonas, também conhecido como rio Solimões: vai dos sop s dos Andes até a confluência com o rio Negro, caracterizado por ser uma planície uniforme com inúmeros meandros, a maioria dos rios deste trecho tem origem Andina. 2) Médio rio Amazonas: situa-se entre os escudos, desde a confluência do rio Negro até o rio Xingu e 3) Baixo rio Amazonas:   a parte mais baixa e oriental da bacia, cont m a zona do estuário ou delta, dominado pela influência das marés (Mendes & Ferreira 1999).

Na bacia sedimentar, a várzea, ocupa a maior área na Amazônia central com cerca de 35% da área total da bacia (Mendes & Ferreira 1999; Goulding et al. 2003). Sua formação   produto do pulso de alagamento monomodal do rio Amazonas e seus tributários em resposta aos períodos de seca e chuvas (Junk et al. 2007). A amplitude do alagamento anual flutua entre 4 – 15 m, sendo que as descargas máximas dos tributários do sul acontecem três meses antes do que os tributários do norte (Goulding et al. 2003; Junk et al. 2007). Ecologicamente, o pulso de alagamento   considerado por Junk et al. (1989) como a força controladora da biota entre o rio e área alagada, devido a que fornece grande parte da energia que sustenta a cadeia trófica aquática, além, que   a área pesqueira mais importante da bacia amazônica onde concentra-se a maior atividade pesqueira (Barthem & Fabré 2004).

## **2.2. Obtenção de dados**

### **2.2.1. Coleta de amostras**

O estudo foi realizado em quinze localidades que representam a bacia do Amazonas: 1) Leticia no alto rio Solimões; 2) La Pedrera no alto rio Japurá; 3) Japurá, no meio Japurá; 4) Juruá no meio Juruá, 5) Tef  no meio Solimões; 6) Beruri no baixo Purus; 7) Boca do Acre, no alto Purus; 8) Janauacá, no baixo rio Solimões, 9) Boa Vista no rio Branco (Roraima); 10) Oriximiná, baixo rio Trombetas; 11) Borba, no baixo rio Madeira; 12) Humaita, no meio rio Madeira; 13) Guajará-Mirim, no alto rio Madeira; 14) Santarém no baixo rio Amazonas; 15) Itaituba, no médio rio Tapajós (Figura 1).

Em cada localidade foram amostrados pelo menos 20 indivíduos de *Piaractus brachypomus* provenientes das pescas artesanais e preservadas em  lcool 92,5%. As amostras foram enumeradas e integradas ao banco de dados de tecidos do Laboratório

de Genética e Evolução Animal – LEGAL da Universidade Federal do Amazonas (Manaus, Amazonas, Brasil).

### 2.2.2. Extração de DNA, amplificação e genotipagem

A extração de DNA foi realizada pelos métodos de CTAB 2% (Doyle & Doyle 1987) e Fenol Clorofórmio (Sambrook et al. 1989). A qualidade foi avaliada em comparação com um DNA padrão de concentração definida, em gel de agarose 0.8% corado com *GelRed* (*Biotium*). A quantificação foi realizada por espectrofotometria através do *Nanodrop 2000 Thermo-Scientific* e diluído a uma concentração final de 50 ng/ml.

Aplicou-se o método de transferibilidade a partir de microssatélites desenvolvidos para as espécies filogeneticamente próximas: *Piaractus mesopotamicus* (Calcagnotto et al. 2001) e *Colossoma macropomum* (Santos et al. 2009). De um total de 16 microssatélites testados, foram escolhidos seis com características polimórficas, já que os demais microssatélites apresentaram dificuldades pela presença de alelos nulos em algumas localidades ou mostraram ser monomórficos, estes não foram incluídos no estudo (Tabela 1).

A reação de cadeia de polimerase (PCR) foi realizada num termociclador *AppliedBiosystem* com volume total de 10  $\mu$ L. O protocolo usado para os *primers* Pme4, Pme5, Pme21, Cm1F7 teve as seguintes condições de reação: 2,9  $\mu$ L de água *milliQ*, 1,0  $\mu$ L de dNTP (10mM), 1,0  $\mu$ L MgCl (25mM), 1,0  $\mu$ L de Tampão 10X (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0,7  $\mu$ L de *primer forward*, 1,0  $\mu$ L de *primer reverse*, 0,3  $\mu$ L de M13 (FAM), 0,8  $\mu$ L BSA e 0,5  $\mu$ L de Taq (1,0U). Do *mix* da reação foi usado 9  $\mu$ L e 1  $\mu$ L de DNA. Para os *primers* Cm1G7 e Cm1B8 foi realizada a seguinte reação: 2,3  $\mu$ L de água *milliQ*, 1,0  $\mu$ L de dNTP (10mM), 1,0  $\mu$ L MgCl (25mM), 1,0  $\mu$ L de Tampão 10X (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 1,0  $\mu$ L de *primer forward*, 1,5  $\mu$ L de *primer reverse*, 0,7  $\mu$ L de M13 (FAM), 0,5  $\mu$ L de Taq (1,0U) e 1  $\mu$ L de DNA. Do *mix* da reação foi usado 9  $\mu$ L e 1  $\mu$ L de DNA.

As condições da amplificação para o primeiro grupo de *primers* foram as seguintes: primeiro ciclo de 30 repetições: desnaturação a 94°C por 10 segundos, temperatura de anelamento de 30 segundos com temperatura específica para cada *primer* e extensão a 72°C por 45 segundos. Segundo ciclo de 25 repetições: desnaturação a 94°C por 10 segundos, temperatura de anelamento do *primer* M13 a 53°C por 15 segundos e extensão a 72°C por 45 segundos; extensão final a 72°C por 25 minutos. As condições da

amplificação para o segundo grupo de *primers* foi: primeiro ciclo de 30 repetições: desnaturação a 94°C por 10 segundos, temperatura de anelamento específico para cada *primer* de 30 segundos e extensão a 68°C por 40 segundos. Segundo ciclo de 20 repetições: desnaturação a 94°C por 10 segundos, temperatura de anelamento do *primer* M13 a 53°C por 30 segundos e extensão a 68°C por 30 segundos; extensão final a 72°C por 30 minutos.

A amplificação foi verificada por eletroforeses através do gel de agarose 1% usando 2µl do produto da PCR e 3µl de marcador *GelRed (Biotium)*. O produto da PCR foi diluído em água deionizada conforme a concentração para uma melhor visualização.

A genotipagem foi realizada usando 1µl do produto da PCR diluído, acrescentado 8µl de formamida e 1µl do padrão *ROX* (DeWoody et al. 2004) e aplicados no sequenciador automático *ABI 3130xl (Applied Biosystems, Inc., USA)*. O tamanho dos alelos específicos para cada microssatélite foram estimados usando o programa *GeneMapper* versão 4.0 (*Applied Biosystems Inc., USA*).

## **2.3. Análises de dados**

### **2.3.1. Verificação dos dados moleculares**

Os dados obtidos foram revisados através dos programas *FreeNA* (Chapuis & Estoup 2007) que estima a frequência dos alelos nulos para cada loco e população analisada de acordo com o algoritmo de Máxima Expectativa de Dempster et al. (1977). Ele estima o  $F_{ST}$  de (Weir 1996) desde qualquer conjunto de microssatélites que possuam alelos nulos. O método usado para cada estimativa é chamado o método *ENA* (exclusão de alelos) (Chapuis & Estoup 2007) O método de correção por *ENA* corrige eficientemente o viés positivo induzido pela presença de alelos nulos na estimação do  $F_{ST}$ . Os valores obtidos de  $F_{ST}$  com e sem a correção *ENA* permitiram realizar comparações estatísticas (diferenças significativas através do teste não paramétrico para amostras únicas de *Wilcoxon*) entre ambas as estimações para detectar o efeito deste tipo de alelos, o que em consequência poderá nos permitir identificar aqueles locos com alelos nulos cuja presença nas populações poderiam afetar significativamente nas análises, e que por tanto devem ser excluídos da matriz de dados.

Adicionalmente foi testado o desequilíbrio de ligação com ajuda do programa *Arlequin 3.1* (Excoffier et al. 2005) usando 10000 permutações seguido da correção de

*Bonferroni* (Rice 1989).

### 2.3.2. Diversidade genética e estrutura populacional

Partindo do princípio que *Piaractus brachypomus* trata-se de uma população amplamente distribuída, testou-se a existência ou não de estruturação populacional na área geográfica que a espécie ocupa, a partir de dados moleculares de microssatélites.

A estimativa da diversidade genética (número de alelos, riqueza alélica e heterozigocidade observada e esperada) e estimativa do equilíbrio de *Hardy & Weinberg* (H&W) foi realizada no programa Arlequin 3.1 (Excoffier & Lischer 2010) usando o método de MCMC (*Markov chain Monte Carlo*) e correção de *Bonferroni* (Rice 1989).

A identificação de grupos biológicos foi realizada pela análise de estruturação populacional a partir da análise Bayesiana implementada no programa *Structure* 2.3.1. (Pritchard et al. 2000) que agrupa os indivíduos de acordo com as frequências alélicas de cada *locus* dentro de um *cluster* definido na população. Para o cálculo, usou-se 50.000 MCMC e 5.000 permutações de corte (*burn-in*). A variação de *cluster posteriori* foi de  $K=1$  a  $K=7$  com 10 repetições para cada  $K$ . Usou-se o modelo de *admixture* ou modelo de frequências correlacionadas, que assume que cada indivíduo pode ter ancestrais oriundos de mais de uma população, e frequências alélicas correlacionadas, favorecendo a melhor identificação de populações sub-estruturadas (Falush et al. 2003). A observação dos resultados foi feita usando *Structure Harvester* (Earl & VonHoldt 2012) que adicionalmente permite determinar o  $K$  verdadeiro a partir do valor máximo estimado (Falush et al. 2003).

Para o valor de  $K$  selecionado se estimou a proporção de agrupamento ( $Q$ ) das localidades amostradas dentro dos *clusters* detectados e a proporção de agrupamento individual  $q$  (proporção do genoma ancestral de cada indivíduo nos *clusters*) usada como medida de separação de cada grupo genético. A predição do valor limite pode afetar à acuracidade da identificação dos híbridos. Baseados na proposta de Oliveira et al. (2008) usou-se como valor limite  $q \geq 0,80$  para definir indivíduos puros; em quanto que para os genótipos misturados a proporção foi menor que 80%.

Por meio da Análises de Variança Molecular (AMOVA) testou-se a homogeneidade da distribuição dos alelos na área de distribuição determinando o grau de diferenciação através da estimativa dos índices  $F$  de Wright (1969). O cálculo foi realizado pelo

programa Arlequin 3.1 (Excoffier & Lischer 2010) com uma significância de 10.000 permutações.

A conectividade genética entre as localidades amostradas foi provada através do teste de Mantel (Mantel 1967) implementado no programa Arlequin 3.1 (Excoffier & Lischer 2010), que avalia a correlação entre os valores  $F_{ST}$  par a par e as distâncias geográficas. A análise foi realizada com 10.000 permutações e intervalo de confiança de 95%. As comparações par a par de  $F_{ST}$  foram ajustadas com a correção de *Bonferroni* (Rice 1989). A distância geográfica entre os pontos de coleta foram obtidos no programa *Google Earth* (Google 2013) seguindo o curso dos rios entre cada par de localidades.

#### **2.3.4. Fluxo gênico, tamanho populacional e demografia histórica**

A análise de fluxo gênico entre as localidades e tamanho efetivo populacional foram calculadas a partir dos parâmetros  $\theta$  ( $\Theta$ ) e a taxa de imigração ( $M$ ) obtida no programa *Migrate* Ver 3.2 (Beerli & Palczewski., 2010), os quais foram utilizados para a conversão dos dados demográficos. A taxa de mutação que se assumiu para microssatélites foi de  $10^{-4}$  (Chistiakov et al. 2006).

Com o fim de conhecer se a população tem experimentado possíveis efeitos de redução no tamanho populacional em diferentes tempos, os dados foram analisados através do programa *Msva* 1.3 (Beaumont 1999; Storz & Beaumont 2002) baseado na análise coalescente e modelo mutacional a passos *SMM* (*Stepwise Mutation Model*) para avaliar a demografia histórica. Para estimação do tamanho populacional foi usado o modelo exponencial, que na versão atual de *Msva* é ajustado para datar as mudanças de tamanho populacional em períodos de tempo relativamente grandes (Storz et al. 2002; Storz & Beaumont 2002). Foram realizadas 10 corridas independentes usando MCMC com 100.000 permutações e 20.000 permutações de corte e tempo generacional de 3 anos (Landines-Parra & Mojica-Benítez 2005).

Para definir se a população passou por um gargalo de garrafa foi usado o valor de  $r = N_0/N_1$ , onde  $N_0$  é o tamanho populacional no tempo  $0$  e  $N_1$  o tamanho populacional ancestral em um tempo  $tf$ . Se  $r < 1$  a população está em declínio; se  $r = 1$  a população está estável; se  $r > 1$  a população está em expansão (Beaumont 1999). O valor de tempo desde que o tamanho populacional começa mudar ( $tf$ ), o tamanho efetivo populacional ancestral ( $N_1$ ) e atual ( $N_0$ ) foram obtidos a partir da conversão dos valores da escala  $\log$ .

Adicionalmente, foi usado o programa *Bottleneck* (Cornuet & Luikart 1996) que permite detectar recentes reduções no tamanho efetivo populacional usando o modelo de alelos infinitos (*IAM*) e modelo mutacional a passos (*SMM*). O programa calcula para cada população amostrada e para cada *loco* a distribuição de heterozigocidade esperada (*Heq*) desde o número de alelos observados (*k*), dado um tamanho amostral (*n*), sobre a premissa que a população está em equilíbrio entre mutação e deriva gênica (o tamanho efetivo é constante no passado).

Em uma população que não passa por um gargalo e que está perto do equilíbrio mutação-deriva, a heterozigocidade esperada (*Heq*) é igual a heterozigocidade em equilíbrio de *Hardy-Weinberg* (*He*). Mas se uma população tem passado pelo recente gargalo, o equilíbrio mutação-deriva é transitoriamente perturbado e a medida de heterozigocidade num *loco* (*He*) poderia exceder a heterozigocidade (*Heq*) calculada pelo número de alelos amostrados (Luikart & Cornuet 1998). A significância das análises foi testada pelo *Wilcoxon signed-rank test*.

### 3. RESULTADOS

Um total de 303 indivíduos procedentes de 15 localidades da natureza foram analisados usando seis *loci* de microssatélites (Tabela 1). Nos dados obtidos não encontrou-se presença de alelos nulos. A correção de Chapuis & Estoup (2007) mostrou valores similares:  $F_{ST}=0,052$  (CI95%: 0,023-0,104) usando a correção, e  $F_{ST}=0,053$  (CI95%: 0,022-0,108) sem a correção. Ao realizar a comparação estatística usando o teste paramétrico para amostras únicas de *Wilcoxon*, não foi encontrado diferenças significativas entre elas ( $W$ -valor=2  $p \leq 0,05$ ;  $N=6$ ), o que indicou que os dados obtidos neste estudo estão livres de alelos nulos.

O teste de desequilíbrio de ligação analisado para cada população depois da correção de *Bonferroni* ( $p < 0.003$ ) não mostrou valores significativos nos loci estudados, sugerindo que estes são herdados independentemente.

#### 3.1. Diversidade genética

Neste estudo encontrou-se um total de 79 alelos na análise geral da população, com número meio de 13 alelos por locus. Considerando cada locus, o número variou de seis alelos no locus *Pme21* até 17 no locus *Cm1G7* (Tabela 2). Analisando o conjunto de locus por localidades, Boca do Acre mostrou o menor número com 31 alelos, em quanto que Japurá a maior número com 47 alelos.

Do total de alelos encontrados, 19 foram exclusivos distribuídos em todos os loci, sendo o locus *Cm1G7* que apresentou o maior número (cinco) (Tabela 2). Entre as 15 localidades amostradas, 12 evidenciaram a presença de alelos privados, sendo Japurá e Itaituba as que tiveram o maior número de alelos privados (três) seguida por Juruá e Janauacá e Beruri (dois), Letícia, Santarém, Tefé, Borba, Humaitá, Guajará-Mirim e Boca do Acre (um) (Tabela 2).

A diversidade alélica calculada como o número meio de alelos por locus teve uma variação de 5,2 (Boca de Acre) a 7,8 (Japurá) (Tabela 3).

A diversidade genética calculada como Heterozigocidade esperada teve um valor médio de 0,72 para toda a população, manifestando uma variação entre 0,62 em Boa Vista e 0,79 em Itaituba (Tabela 3).

Desvios significativos do equilíbrio de *Hardy–Weiberg* (H&W) depois da correção de *Bonferroni* foram encontradas em alguns locus de seis localidades: Juruá e Itaituba

(Cm1G7), Beruri, Humaitá, Borba (Cm1F7) e Janauacá (Pme21) motivo pelo qual a hipótese de equilíbrio para população foi rejeitada ( $p < 0,0083$ ) (Tabela 3).

A estimativa global para o coeficiente de endogamia teve um valor de  $F_{IS} = 0,064$  ( $p < 0,0001$ ) variando entre  $F_{IS} = -0,028$  em Japurá a  $F_{IS} = 0,117$  em Itaituba, mostrando uma deficiência de heterozigotos significativa na população (Tabela 3).

### 3.2. Estrutura populacional

A estruturação populacional realizada pela inferência no programa *Structure* (Pritchard et al. 2000), considerou a formação de dois *clusters* ou duas unidades biológicas como as mais prováveis que congregam o conjunto de indivíduos da população estudada ( $K=2$ ;  $LnProb$  média=-6119,4; 50000 replicas MCMC; 5000 *burn-in period*; modelo *admixture*) de um total de sete simulações independentes com  $K=1$  a  $K=7$  agrupamentos (Figura 2).

A análise de Variância Molecular AMOVA mostrou um valor moderado de estrutura com  $F_{ST}=0,053$  ( $p < 0,0001$ ) (Tabela 6). Segundo a categorização de  $F_{ST}$  proposta por Wright (1978), indica que valores entre 0,00-0,05 é fraca estruturação, 0,05-0,15 moderada estruturação e entre 0,15 a 0,25 elevada diferenciação genética entre as populações estudadas.

A relação par a par dos valores de  $F_{ST}$  entre as localidades depois da correção de *Bonferroni* indicou diferenças significativas entre algumas localidades amostradas principalmente Boa Vista, Guajará-Mirim, Boca do Acre, Humaitá e Borba com relação ao resto da população (Tabela 7).

Realizando o teste de Mantel para avaliar se a estruturação populacional está correlacionada com a distância geográfica, constatou-se que não existe relação significativa ( $r=0,307966$ ;  $p= 0,07050$ ; 10000 permutações) nas localidades amostradas, desmentindo esta possibilidade.

### 3.3. Fluxo gênico e tamanho efetivo populacional

A taxa de imigrantes efetivos variou de 0,525 de Boa Vista para Letícia até 1,825 de Beruri para La Pedrera. No entanto, os limites de confiança tiveram uma ampla variação de zero no limite inferior até 2,50 no limite superior. O tamanho populacional ( $\Theta$ )

estimado a maior intervalo de confiança foi de 1,00 em Boca do Acre e Janauacá até 1,90 em Japurá (Tabela 7).

Depois da transformação dos parâmetros a partir do valor máximo do intervalo de confiança, o fluxo gênico apresentou-se assimétrico na população, com variação mínima de 0,850 imigrantes efetivos para Boca do Acre desde Santarém, até valores máximos de 4,750 imigrantes efetivos para Japurá desde Beruri.

Considerando o número de imigrantes total que recebe cada localidade, algumas receberam mais imigrantes efetivos como Japurá (43,3), Itaituba (38,3) e Humaitá (36,4); enquanto que Boca do Acre (20,1) foi a menos sustentada. Com relação ao tamanho efetivo populacional, os valores também flutuaram de 833,3 indivíduos por geração em Boca do Acre e Janauacá, até 1583,3 indivíduos por geração em Japurá (Tabela 8 e 9).

### **3.4. Demografia histórica**

A análise da demografia histórica indicou que a população de *Piaractus brachypomus* exibiu sinais de redução dramática no tamanho populacional, indicado pelo valor de  $r$  menor de um ( $r = 1,19 \cdot 10^{-3}$ ). A população depois do gargalo representou só uma pequena fração do tamanho efetivo populacional ancestral com 636 indivíduos vs 535316 indivíduos respectivamente (Figura 5a).

A estimativa do tempo de início do decréscimo populacional foi datada há 2507 anos que em termos geracional equivale aproximadamente 835 gerações atrás (Figura 5b).

Por outro lado, a análise realizada por *Bottleneck*, indicou que os dados se adequaram ao modelo de *SMM* ( $p=0,0001$ ) com deficiência de heterozigotes  $H_e$  ( $p=0,00781$ ), indicando que a população atual está passando por uma recente expansão do tamanho populacional.

## 4. DISCUSSÃO

### 4.1. Diversidade gênica e análises de estrutura populacional

A diversidade genética é um atributo importante dentro de uma população, pois constitui a capacidade da espécie de suportar pressões do ambiente, envolvendo-se e adaptando-se a novas situações (Freeland 2005). Sua avaliação e quantificação é fundamental em genética de populações e em biologia da conservação porque permite orientar a gestão do manejo responsável dos recursos naturais.

A diversidade genética pode ser medida em termos de diversidade alélica ( $A$ ), polimorfismo ( $P$ ) e heterozigocidade observada ( $H_o$ ) e heterozigocidade esperada ( $H_e$ ), sendo a última a mais comumente usada para a comparar quantidades entre populações porque é a que melhor representa o potencial adaptativo de uma espécie (Allendorf & Luikart 2006; Frankham et al. 2008).

Na espécie *Piaractus brachypomus*, a diversidade genética em termos de riqueza alélica foi baixa (média de 6,4) comparado com o valor geral para peixes de águas doces (7,5) (DeWoody & Avise 2000) e outros peixes Neotropicais como *Colossoma macropomum* (21,4) (Santos-Freitas 2010), *Arapaima gigas* (12,4) (Leão 2009), *Brachyplatystoma rousseauxii* (11,3) (Batista 2010), *Brachyplatystoma vaillantii* (9,2) (Rodriguez 2009) e *Piaractus mesopotamicus* (8,5) (Calcagnotto & DeSalle 2009) (Tabela 11).

A Heterozigoticidade foi alta (0,72) sendo depois de *Colossoma macropomum* (0,78) (Santos-Freitas 2010) e *Brachyplatystoma vaillantii* (0,75) (Rodriguez 2009) a terceira espécie com maior valor dentro dos peixes estudados na bacia do Amazonas. Com relação às espécies do mesmo gênero *Piaractus brachypomus* (Orinoco) (0,66) e *Piaractus mesopotamicus* (0,58) (Calcagnotto & DeSalle 2009) também apresentou um valor superior (Tabela 11).

A característica da  $H_e$  indicou que *Piaractus brachypomus* tem alto potencial adaptativo para responder aos diversos fatores estocásticos (variação climática, catástrofes ambientais) e/ou determinísticos (pressão pesqueira, fragmentação do habitat, introdução de espécies). Esta característica está associada ao comportamento migratório da espécie, à alta complexidade do ecossistema Amazônico onde ela habita, ao tamanho populacional e outros fatores biológicos e ecológicos próprios da espécie que favorecem

sua adaptação.

Encontrou-se desequilíbrio de *Hardy-Weinberg* (H&W) em três locus de seis localidades das 15 localidades analisadas. Este desequilíbrio também se manifestou no índice de endogamia ( $F_{is}$ ) da população indicando excesso de homocigotos com probabilidades significativas nas localidades de Letícia, Boca do Acre, Oriximiná, Guajará-Mirim, Humaitá, Borba, Santarém e Itaituba (Tabela 3,4,5).

Antes de analisar a diversidade gênica dentro da população estudada, decidiu-se analisar primeiro a hipóteses de panmixia da população. Neste caso, a inferência Bayesiana realizada pelo programa *Structure*, constatou a existência de duas unidades biológicas ( $K=2$ ) que foram bem definidas pela proporção de assinatura  $Q$ . Uma unidade biológica foi formada pelos indivíduos do rio Branco, Boca do Acre, Guajará-Mirim e Humaitá e outra pelos indivíduos de Letícia, Trombetas e Santarém, cada uma agrupando indivíduos com proporções do genoma  $q > 80$ . Da mesma maneira, foi evidenciada uma área de mistura principalmente na calha principal do rio Solimões-Amazonas e áreas associadas que tiveram valores de  $q < 80$  (Tabela 12).

A AMOVA mostrou que a variação na distribuição dos alelos é atribuída a diferença dos indivíduos dentro das populações (6,1%) como a variação entre as populações (5,3%). O valor do índice de  $F_{ST}$  (0,0527) altamente significativo mostrou uma moderada estruturação genética da população. Esta também foi evidenciada na relação par a par de  $F_{ST}$  entre as localidades, mostrando que as diferenciações estão atribuídas principalmente às localidades do rio Madeira (Guajará-Mirim, Humaitá e Borba), alto rio Purus (Boca do Acre) e rio Branco (Boa Vista) com relação as outras dez amostradas na bacia.

A estruturação populacional pode ter ocorrido por causas intrínsecas ou extrínsecas na população. Inicialmente testou-se o isolamento pela distância pensando na grande área que a espécie ocupa na região Amazônica, para isso se realizou a análise de Mantel o qual não evidenciou relação significativa entre a distância genética e a distância geográfica, e indicou que a formação dos grupos ou unidades biológicas não é atribuída a este fator, rejeitando esta hipótese.

Outra causa que pode ter provocado a estruturação da população pode ter sido o surgimento de barreiras extrínsecas (ecológicos ou geomorfológicos) que causam a

separação da população sem limitação total do fluxo gênico. Este fator é considerado neste estudo como o maior causador da divisão da população. Primeiramente se avaliou o fator ecológico, na várzea o pulso de alagamento é assíncrono, produzido inicialmente pelos tributários do sul e três meses depois pelos tributários do norte; não entanto, se achou que este fator não podia ser o possível causante da estruturação da população, porque que tanto no sul como no norte os indivíduos de *Piaractus brachypomus* se deslocam na mesma época para se reproduzir. Se fosse este tipo de fator o causante da estruturação, se houvesse detetado as unidades biológicas associadas a este assincronismo, formando unidades uma no sul e a outra no norte, o qual não foi observado neste estudo.

Por outro lado, se avaliou os fenômenos geomorfológicos complexos que formaram a bacia Amazônica ao longo do tempo como outro dos fatores extrínsecos. Neste estudo considerou-se como o verdadeiro causante da estruturação da população de *Piaractus brachypomus*. É conhecido que este processo levou a transformação da paisagem, modificando os ambientes físicos e influenciando no padrão de distribuição dos organismos que nele habitam.

Várias são as hipóteses que tentam explicar a evolução da biota Amazônica, mas para o caso deste estudo considera-se compatível com a hipótese dos arcos propostos por Patton et al (1997). Esta hipótese, sugere a existência de estruturas geológicas arqueadas presentes no subsolo que subdividem a bacia Amazônica em diversas sub-bacias estruturais, as quais desempenham um papel importante como barreiras na estruturação da biota Amazônica (Haffer & Prance 2002; Wesseling & Hoorn 2011; Leite & Rogers 2013).

Geologicamente a metade do Amazonas está formada por duas áreas antigas conhecidas como escudos de Guiana e Brasileiro, as quais estão separadas pelo rio Amazonas. O resto da Amazônia é principalmente uma bacia sedimentar que foi formada a partir da era Cenozóica por sedimentos depositados no vale Amazônico carreados dos antigos escudos e durante o processo de formação dos Andes durante o Terciário e Quaternário (Goulding et al. 2003).

Pressupõe-se que durante o Paleoceno, um dos principais arcos formados na no vale Amazônico foi o Arco de Purus que separou o fluxo do rio Amazonas em dois drenagens, leste e oeste. Esta divisão logo foi reduzida pelos sedimentos do Terciário e

Quaternário juntando o fluxo no atual sistema conhecido como rio Solimões- Amazonas (Wesseling & Hoorn 2011).

Malabarba & Malabarba (2010) mencionam que linhagens ancestrais de caracídeos existiam desde o cretáceo, e evidências de registros fósseis de peixes amazônicos tem demonstrado que durante o Mioceno a fauna aquática era similar à atual (Lundberg et al. 2010). Isso indica que provavelmente a espécie de *Piaractus brachypomus* existia desde aqueles tempos e sua população foi separada com o surgimento do Arco de Purus, levando a um processo de especiação alopátrica. Posteriormente com o surgimento da cordilheira dos Andes, os sedimentos produzidos no Mioceno, Plio e Pleistoceno se depositara formando a bacia sedimentar do Amazonas, que cobriu o arco do Purus e removeu a barreira geográfica entre os dois drenagens amazônicos leste e oeste que existia. Esta conexão permitiu a troca gênica até a atualidade entre as populações aquáticas que ali habitavam.

Sobre este cenário, considera-se que as populações que ainda permanecem nas margens opostas dos antigos drenagens amazônicos apresentam maiores diferenças genéticas entre eles, as quais vão-se reduzindo cada vez que aumenta a área de contato. É assim que na população de *Piaractus brachypomus* mediante a análises Bayesiana do *Structure* (Figura 2b), detectou-se dois *clusters* ou unidades biológicas (UB), que contem localidades com diferenças genéticas significantes localizadas nas margens opostas da bacia. Numa margem está a unidade biológica associada aos escudos de Guiana e Brasileiro (Boa Vista, Borba, Humaitá, Guajára-Mirim, Boca de Acre) denominada aqui como UB do leste, e na outra margem a unidade biológica associada à margem da bacia sedimentar (Letícia, Oriximiná e Santarém) denominada aqui UB do oeste. Além disso, presencia-se uma área de contato localizada na calha principal Solimões-Amazonas e áreas associadas (Tefé, Beruri, Janauacá, Japurá, Juruá, La Pedrera e Borba) que demonstra a interação entre as duas unidades biológicas (Tabela 12 e Figura 3). De igual maneira, a relação par a par de *F<sub>ST</sub>* manifesta as diferenças significativas entre as localidades situadas nas duas áreas geomorfológicas: sedimentar e escudos (Tabela 7).

Estudos com outras espécies de peixes amazônicos como *Arapaima gigas* (Leão 2009) e *Osteoglossum bicirrhossum* (Da Silva 2009) também apresentaram um padrão similar a *Piaractus brachypomus*. Embora a estruturação destes duas primeiras espécies foi relacionada ao isolamento por distância, isto pode estar pelas estratégias reprodutivas

destas espécies que são muito diferentes da espécie aqui estudada.

Encontrar as localidades de Oriximiná e Santarém significativas como parte da *UB* do oeste, pode ser devido a que as coletas das amostras foram obtidas de um grupo de peixes (cohorte) proveniente do alto Solimões. Apoiados na alta vagilidade da espécie, isto é possível, graças a dispersão dos ovos e larvas logo depois da reprodução até distâncias de 700 km. Estas são levadas pela correnteza para dentro da planície inundável onde encontram refugio e alimento para seu crescimento. Alevinos e juvenis podem continuar descendo em cardumes entre as áreas alagáveis até o grande berçário no baixo Amazonas (Araújo-Lima 1984; Araújo-Lima & Oliveira 1998; Carvalho 2002; Barthem & Fabré 2004).

Assim, pode-se dizer que a *UB* oeste, representada pela área sedimentar amazônica, mantém na margem mais oeste, indivíduos que ainda conservam alta porcentagem do genoma ancestral, tais como as localidades no alto Solimões (Letícia) e provavelmente nas cabeceiras dos afluentes andinos (ex: Ucayali, Napo e Putumayo-Iça) embora neste trabalho não estejam incluídos. Enquanto que a *UB* do leste, está formada pelas localidades dos rios que tiveram formação nos escudos da Guiana e Brasileiro; ao norte o rio Branco (Boa Vista), e ao sul o rio Madeira (Guajará-Mirim e Humaitá) e associado a eles, Boca do Acre e provavelmente alguns rios da bacia amazônica boliviana (Guaporé o Iténez) (Figura 6).

#### **4.2. Fluxo gênico e tamanho efetivo populacional do *Piaractus brachypomus* (Amazonas)**

Os peixes migradores na bacia do Amazonas, são categorizados por (Barthem & Fabré 2004; Barthem 2011). em dois tipos: 1) Espécies migradoras continentais: migram milhares de quilômetros entre o estuário e a encosta dos Andes, habitam tanto em ambientes fluviais como estuários, utilizam a calha principal dos rios, tem alta fecundidade, a desova única nas cabeceiras dos rios de água branca, com tendência de apresentar alto fluxo genético e grupos homogêneos nos sistemas (ex: *Brachyplatystoma vailantii*), e 2) Espécies migradoras de planície: que migram centenas de quilômetros, usam ambientes lacustres e fluviais, tem alta fecundidade, desova única no rio, com tendência de apresentar alto fluxo genético entre grupos de diferentes sistemas fluviais

(ex. *Semaprochilodus* spp; *Piaractus brachypomus*). Estes últimos aparentemente entram na planície alagada para se alimentar durante grande parte de seu ciclo de vida e podem permanecer no mesmo local por vários meses ou anos (Van Damme et al. 2011).

*Piaractus brachypomus* tem sido definida dentro da segunda categoria e o modelo de fluxo gênico realizado neste estudo foi compatível com dinâmica migratória mencionada acima. Assim, a estimacão do fluxo gênico manifestou-se de forma bidirecional assimétrica entre as localidades amostradas dos diferentes rios da bacia Amazônica, com tamanhos populacionais variados, comportando-se como o modelo de ilhas com interações complexas (Wright 1943; Primack 2001) (Tabela 10 e Figura 3).

Analisando o fluxo gênico dentro da população, pode-se encontrar que este é dinâmico com interações entre todas as localidades. Para maior entendimento do nível do fluxo gênico dentro da população, este foi categorizado em duas magnitudes de acordo ao valor mínimo e valor máximo que em ele ocorrem. Assim, consideraram-se dois níveis de magnitude: baixa ( $Nm=0,85-1,47$ ) e moderada ( $Nm=1,48-2,10$ ) imigrantes efetivos por geração. Na figura 3 representaram-se só as localidades mais distantes deste estúdio com relação a calha principal.

Segundo a figura 3 para melhor observação, foram representadas as localidades mais distantes deste estúdio com relação à calha principal. Pode-se analisar que na calha principal Solimões - Amazonas (Letícia, Beruri e Santarém) tem conexão genética de igual magnitude nos dois sentidos. De igual maneira, o baixo Amazonas (Santarém) com o rio Madeira (Guajará-Mirim, Humaitá) e baixo Amazonas (Santarém) com rio Tapajós. A magnitude em outros afluentes, diminui entre Solimões - Amazonas (Beruri, Santarém) com o rio Caquetá - Japurá (Japurá, La Pedrera), e baixo Amazonas (Santarém) com rio Branco (Boa Vista) e alto rio Purus (Boca de Acre).

Em geral, as interações do fluxo gênico acontecem em todas as direções das localidades da bacia, produzindo uma tendência à homogenização genética entre as duas unidades biológicas detectadas pela análise Bayesiana (unidade biológica do oeste com a unidade biológica do leste), principalmente nas áreas da calha principal Solimões – Amazonas e zonas adjacentes (Tefé, Beruri, Janauacá, Japurá, Juruá, La Pedrera e Borba), denominadas anteriormente como área de contato. Esta troca gênica é quantificada pela estimativa da proporção do genoma ancestral de cada indivíduo no *cluster* na Tabela 10 e representado graficamente na Figura 2b e 6.

Com o fim de ampliar o detalhe da magnitude do fluxo gênico, categorizou-se o número de imigrantes acumulado em baixa ( $Nm \leq 27,80$ ), moderada ( $Nm = 27,80-35,50$ ) e alta ( $Nm = 35,50-43,20$ ) magnitude. Assim encontrou-se que Japurá, Humaitá e Itaituba foram as localidades que maior magnitude tiveram, ou seja, que receberam maior número de imigrantes efetivos. La Pedrera, Juruá, Oriximiná, Borba, Guajará-Mirim e Santarém tiveram uma magnitude moderada e Letícia, Tefé, Beruri, Janauacá, Boca do Acre e Boa Vista tiveram baixa magnitude (Tabela 10 e Figura 4).

É possível pensar que a parte alta dos afluentes recebe-se maior fluxo gênico pelo comportamento migratório da espécie, ao se deslocar aos tributários para reprodução. No entanto, Humaitá e Japurá tiveram o maior fluxo gênico que Guajará - Mirim e La Pedrera que são localidades mais acima nos rios Madeira e Caquetá - Japurá respectivamente. Estas diferenças podem ser atribuídas à presença das cachoeiras nos dois rios. Por um lado, o rio Madeira apresenta aproximadamente 19 cachoeiras sendo as mais importantes: Santo Antônio e Jirau (Goulding 1979) e por outro lado no rio Caquetá - Japurá a cachoeira do chorro de Córdoba (Rodriguez 1992). Estas barreiras físicas restringem os deslocamentos contínuos dos peixes rio acima, diminuindo a magnitude do fluxo gênico.

Em Itaituba também apresentou-se alto fluxo gênico. No entanto, parte da população que foi amostrada foi capturada abaixo das cachoeiras de São Luiz que ficam aproximadamente 50 km acima da cidade de Itaituba. Os resultados evidenciaram que o alto fluxo gênico é proveniente da calha principal do rio Amazonas principalmente de Santarém que acolhe abundantes indivíduos da população. Dinâmica similar foi detectada para *Colossoma macropomum* no estudo realizado por Santos-Freitas (2010).

Ao comparar a população de *Piaractus brachypomus* com outras espécies migratórias Amazônicas, achou-se que a magnitude do fluxo gênico foi considerada baixa com um rango que vai de 0,85 a 4,75 e média 2,2 imigrantes efetivos por geração, quando comparada com *Colossoma macropomum* que apresentou valores de 0,23 a 20,78 e média 6,6 imigrantes efetivos por geração (Santos-Freitas 2010) e *Brachyplatystoma vaiillantii* com valores de 5,9 a 24,7 e média 7,4 imigrantes efetivos por geração (Rodriguez 2009). Embora o fluxo gênico de *Piaractus brachypomus* seja menor, é suficiente para manter a conectividade da população.

Com relação ao tamanho efetivo populacional, entende-se este como o tamanho

de uma população idealizada que perderia diversidade genética (ou se tornaria endogâmica) na mesma taxa da população real (Frankham et al. 2008), ou em outras palavras corresponde ao número de indivíduos reprodutivos que contribuem para geração seguinte em termos demográficos e genéticos (Moreno-Letelier 2007; Dudgeon et al. 2012).

Em *Piaractus brachypomus* na bacia do Amazonas, o tamanho efetivo populacional ( $N_e$ ) revelou-se variável nas diferentes localidades da população. Japurá e Itaituba mostraram os maiores valores (1583,3 e 1541,7 indivíduos efetivos respectivamente) e Boca do Acre e Janauacá os menores (833 indivíduos efetivos para cada) (Tabela 10).

Baseados nas observações de Van Damme et al (2011) que menciona que a espécie apresenta deslocamentos pausados, devido que entra na planície alagada para se alimentar durante grande parte de seu ciclo de vida e ficam aí por vários meses ou anos, é possível pensar que nas localidades de Japurá e Itaituba o tamanho efetivo populacional seja maior devido a pouca movimentação dos indivíduos e sua proteção nas áreas de reserva circundantes.

Ao comparar  $N_e$  com a população do *Piaractus brachypomus* da bacia do Orinoco que estimou-se entre 1208 a 2500 indivíduos efetivos por geração, o Amazonas revelou ser levemente menor apesar da ampla área geográfica que ocupa. Mais ao lado de *Colossoma macropomum* que apresenta valores entre 945 até 39.410 indivíduos por geração (tomado estes valores a partir do maior limite de confiança) (Santos-Freitas 2010) é possível crer que esta última espécie é mais abundante; no entanto, esta estimativa foi realizada com o programa *IMa2* que não é apropriado para este parâmetro, devido a que iludi premissas importantes que aconteceram nas populações naturais como ignorar a recombinação. Quando este tipo de inferências acontece o  $N_e$  fica superestimado (Strasburg & Rieseberg 2010).

Apesar do tamanho efetivo populacional de *Piaractus brachypomus* na bacia do Amazonas sere menor comparados com a população do Orinoco têm alta variabilidade genética dado a alta vagilidade da espécie refletida no fluxo gênico, que mantém a conexão da população na bacia Amazônica.

Baseados no tamanho populacional médio teórico para um táxon ser recuperado sere de aproximadamente 1550 indivíduos efetivos (Frankham et al. 2008). Neste estudo

determinou-se que o tamanho médio da população de *Piaractus brachypomus* na bacia do Amazonas é menor (1139 indivíduos efetivos), o que indica que a população está sendo afetada por fatores que estão diminuindo sua capacidade de adaptação.

#### **4.4. Demografia histórica**

A análise da demografia histórica realizada com o programa *Msvr* sugeriu um forte declínio populacional datado há aproximadamente 2.507 anos correspondente ao Holoceno, em outros termos 835 gerações atrás.

O Holoceno, é um período se caracterizou pelo clima relativamente estável, até mais ou menos 5.500 anos atrás, logo vieram os ciclo de aquecimento/esfriamento desconhecendo exatamente as condições climáticas. Estas mudanças provocaram variações dos ambientes naturais e com ele das populações de fauna que nele habitam (Rapp 2008). Associado a isto, está o fenômeno “*El Niño*” que nos últimos milênios vem afetando a América do Sul. Estudos de históricos em Peru tem relacionado a ocorrência dos fortes fenômenos com desaparecimento de civilizações (Macharé & Ortlieb 1993).

Na bacia Amazônica, “*El Niño*” traz incrementos de chuvas na parte alta e media dos Andes incrementando o transporte de sedimentos, enquanto na parte leste da bacia produzem-se grandes sequias e diminuição do volume da água dos rios (Dueñas 1992; UNEP 2013; Bookhagen & Strecker 2010) afetando os hábitat naturais principalmente o aquático.

É provável que o gargalo da população tenha sido causado pelas variações climáticas fortes no ambiente associada a um evento do “*El Niño*” causando diminuição do oxigênio pelo aumento dos sedimentos e variação da temperatura da água o que afeta na respiração e reprodução dos peixes.

A recuperação de uma população está muito relacionada com o tamanho populacional, a diversidade genética, o tempo de longevidade da espécie, vagilidade e disponibilidade de habitat que ele ocupa (Frankham 1995; Dudgeon et al. 2012). Se uma população aumenta rapidamente seu tamanho depois do gargalo, a perda da variação genética será baixa. Populações grandes e exogâmicas naturalmente possuem alta diversidade genética que permite responder as diversas pressões do ambiente (Frankham et al. 2002; Allendorf & Luikart 2006; Dudgeon et al. 2012).

A população de *Piaractus brachypomus* antes da redução contava com uma população extremadamente grande (535316 indivíduos respetivamente) suas

características migratórias, ampla distribuição na bacia, tempo de longevidade (28 anos) (Loubens & Panfili 2001) e alta diversidade genética favoreceram a manutenção da população até o presente.

Um análise demográfico mais recente realizado com *Bottleneck*, indicou que a população está em expansão. Evidencia que também está sendo explicada pela presença de alelos privados na maioria das localidades amostradas da população. No entanto, de acordo ao tamanho efetivo determinado neste estudo a população ainda não tem-se estabelecido totalmente, o qual pode ser causado pelas modificações do habitat como desmatamento que reduz a disponibilidade de alimento e alta pressão de pesca da espécie.

## 5. CONCLUSÃO E SUGESTÕES DE MANEJO

A população de *Piaractus brachypomus* na bacia do Amazonas caracteriza-se pela alta variabilidade genética que confere a espécie bom potencial gênico para responder a condições adversas do ambiente e da ação humana.

A população de *Piaractus barchypomus* na bacia do Amazonas, esta estruturada em duas unidades biológicas, as quais são associadas com as formações geológicas da bacia. Uma *UB* relacionada com as formações antigas dos escudos da Guiana e Brasileiro, e a outra *UB* com a bacia sedimentar do vale Amazônico. As localidades da calha principal do rio Amazonas e área adjacentes onde se forma a área de varzea, constituem uma área de mistura genética das duas *UB*, enquanto as localidades periféricas constituem áreas com indivíduos que conservam o genoma mais puro.

O fluxo gênico da população, é de baixa magnitude ao comparado com outras espécies migratórias da bacia Amazônica, mais suficiente para manter a conectividade na população.

As barreiras físicas que atravessam o rio Madeira, o rio Caquetá-Japurá, o rio Tapajós e o rio Branco não impedem o fluxo gênico da população, devido ao comportamento migratório da espécie.

O tamanho efetivo populacional de *Piaractus brachypomus* na bacia do Amazonas apresentou valores baixos e mais ou menos homogêneos ao longo da bacia comparado com outras espécies migratórias amazônicas. Apesar que a população manifestou estar em um processo de expansão, seu tamanho efetivo ainda é baixo para garantir sua recuperação total da espécie, o qual pode estar associado a alta pressão de pesca na região assim como o desmatamento que Amazônia sofre diminuindo a oferta alimentar da espécie.

Portanto sugere-se controlar a exploração de pesca através de tamanhos mínimos de captura os quais devem ser concordantes com as *UBs*, atualizados segundo as características biológicas e ecológicas e homologados aos países onde cada *UB* tem território. Assim como manter a proteção em épocas reprodutivas na região Amazônica.

Recomenda-se que as *UBs* identificadas neste estudo sejam consideradas Unidades de Manejo ou Estoques Pesqueiros diferentes, as quais requerem de uma

gestão específica tanto nas áreas de maior pureza quanto na área de mistura. Estas precisam ser administradas com precaução no território que ocupam em cada país que faz parte da região Amazônica.

A área de várzea e áreas associadas, agregam indivíduos juvenis e adultos jovens de toda a população o qual requer um manejo diferenciado as áreas das cabeceiras onde se hospedam geralmente os adultos reprodutivos.

As áreas de várzea e áreas associadas congregam a maior diversidade genética da população, nas quais indivíduos provenientes destas áreas são os melhores candidatos como reprodutores para o desenvolvimento da aquicultura na região.

Os indivíduos da área de mistura (zona de várzea) podem ser utilizados para recuperação local da população em caso está seja diminuída, exceto nas localidades periféricas que contem as *UB* com indivíduos mais puros, as quais podem ser restabelecidas com indivíduos de localidades vizinhas.

## **6. AGRADECIMENTOS**

Em campo a Edwin Agudelo, Henry Elias Yucuna Cubeo e Damaris Gómez pela colaboração na coleta das amostras na Amazônia colombiana. A Carolina Doria, Rosseval Lette, Maria da Conceição Freitas, Adam León, Nicole Dutra e Michel Catarino pela colaboração da coleta das amostras na Amazônia brasileira. A Vinícius Verona pelo apoio com os mapas.

Este trabalho foi apoiado financeiramente pela CAPES; CNPQ N° 554057/2006-9; CNPQ N° 53/2010.

## 7. BIBLIOGRAFIA

- Albert, J., Petry, P. & Reis, R., 2011. Major biogeographic and phylogenetic patterns. In J. . Albert & R. E. Reis, eds. *Historical Biogeography of Neotropical Fishes*. Berkeley, Los Angeles, California, pp. 21–58.
- Allendorf, F., Ryman, N. & Utter, F., 1987. Genetics and fishery management: past, present, and future. In N. Ryman & Fred Utter, eds. *Population genetic and fishery management genetics and fishery management*. University of Washington Press, Seattle, pp. 1–20.
- Allendorf, F.W. & Luikart, G., 2006. *Conservation and the Genetics of Populations*, New York, NY: Blackwell Publishing.
- Araujo-Lima, C., 1984. *Distribuição espacial e temporal de larvas de Characiformes em um sector do rio Amazonas, próximo a Manaus*. Manaus: INPA & UFAM.
- Araújo-Lima, C.A.R.M. & Oliveira, E.C., 1998. Transport of larval fish in the Amazon. *Journal of Fish Biology*, 53, pp.297–306.
- Barletta, M. et al., 2010. Fish and aquatic habitat conservation in South America: a continental overview with emphasis on neotropical systems. *Journal of Fish Biology*, 76(9), pp.2118–2176.
- Barthem, R.B., 2011. A pesca na Amazônia: situação atual e perspectivas. In *XIX Encontro Brasileiro de Ictiologia*. Manaus, AM, Brasil, p. 50.
- Barthem, R.B. & Fabré, N.N., 2004. Biologia e diversidade dos recursos pesqueiros da Amazônia. In M. L. Ruffino, ed. *A Pesca e os Recursos Pesqueiros na Amazônia Brasileira*. Manaus, Brazil: Ibama/ProVárzea, pp. 11–55.
- Barthem, R.B. & Goulding, M., 2007. *An Unexpected Ecosystem: The Amazon as Revealed by Fisheries*, St. Louis, MO, USA: Amazon Conservation Association and Missouri Botanical Garden Press.
- Batista, J. da S., 2010. Caracterização genética de estoques pesqueiros da Dourada - *Brachyplatystoma rousseauxii* (SILURIFORMES-PIMELODIDAE) na Amazônia utilizando marcadores moleculares mitocondriais e microsatélites. *Genética, Conservação e Biologia Evolutiva*, Ph.D., p.175.
- Bayley, P.B. & Petrere Jr., M., 1989. Amazon fisheries: assessment methods, current status and management options. In D. P. Dodge, ed. *Proceedings of the International Large River Symposium*. Proceedings of the International Large River Symposium. Canadian Special Publication of the Fish Aquatic Sciences, 106, pp. 385–398.
- Beaumont, M.A., 1999. Detecting population expansion and decline using microsatellites. *Genetics*, 153(4), pp.2013–2029.
- Berli, P. & Palczewski, M., 2010. Unified framework to evaluate panmixia and migration direction among multiple sampling locations. *Genetics*, 185(1), pp.313–326.
- Bookhagen, B. & Strecker, M.R., 2010. Modern andean rainfall variation during ENSO cycles and its impact on the Amazon drainage basin. In C. Hoorn & F. P. Wesselingh, eds. *Amazonia: Landscape and Species Evolution: A Look into the Past*. Malaysia, pp. 223–241.
- Calcagnotto, D. & DeSalle, R., 2009. Population genetic structuring in pacu (*Piaractus mesopotamicus*) across the Paraná-Paraguay basin: evidence from microsatellites.

*Neotropical Ichthyology*, 7(4), pp.606–616.

- Calcagnotto, D., Russello, M.A. & DeSalle, R., 2001. Isolation and characterization of microsatellite loci from *Piaractus mesopotamicus* and their applicability in other Serrasalminae fish. *Molecular Ecology Notes*, 1(1), pp.245–247.
- Carvajal-Vallejos, F. & Zeballos-Fernández, A., 2011. Diversidade y distribución de los peces de la Amazonía boliviana. In *Los peces y delfines de la Amazonía boliviana*. pp. 101–147.
- Carvalho, A., 2002. *A desova dos Characiformes do rio Solimões/Amazonas*. Universidade Federal do Amazonas & INPA.
- CCI, C.C.I., 2008. *Pesca y Acuicultura de Colombia 2008.*,
- Chapuis, M.-P. & Estoup, A., 2007. Microsatellite null alleles and estimation of population differentiation. *Molecular Biology and Evolution*, 24(3), pp.621–631.
- Chistiakov, D., Hellemans, B. & Volckaert, F., 2006. Microsatellites and their genomic distribution, evolution, function and applications: A review with special reference to fish genetics. *Aquaculture*, 255, pp.1–29.
- Cornuet, J.M. & Luikart, G., 1996. Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data. *Genetics*, 144(4), pp.2001–2014.
- Van Damme, P.A. et al., 2011. Peces migratorios de la Amazonía boliviana. In P. A. Van Damme, F. M. Carvajal-Vallejos, & J. Molina Carpio, eds. *Los peces y delfines de la Amazonía boliviana*. Cochabamba, Bolivia, pp. 149–202.
- Dempster, A.P., Laird, N.M. & Rubin, D.B., 1977. Maximum likelihood from incomplete data via the EM algorithm. *Journal of the Royal Statistical Society, Series B (Statistical Methodology)*, 39, pp.1–38.
- DeWoody, J.A. et al., 2004. Universal method for producing ROX-labeled size standards suitable for automated genotyping. *Biotechniques*, 37, pp.348–352.
- DeWoody, J.A. & Avise, J.C., 2000. Microsatellite variation in marine freshwater and anadromus fishes compared with other animals. *Journal of Fish Biology*, 56, pp.461–473.
- Doyle, J.J. & Doyle, J.L., 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin*, 19(1), pp.11–15.
- Dudgeon, C.L. et al., 2012. A review of the application of molecular genetics for fisheries management and conservation of sharks and rays. *Journal of Fish Biology*, 80, pp.1789–1843.
- Dueñas, H., 1992. The Paleo ENSO record in the lower Magdalena basin, Colombia. *Revista Académica Colombiana de Ciencias*, XVIII, pp.437–439.
- Earl, D.A. & VonHoldt, B., 2012. Structure Harvester. *Conservation Genetic Resources*, 4(2), pp.359–361.
- Excoffier, L., Laval, G. & Schneider, S., 2005. Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online*, 1(1), pp.47–50.
- Excoffier, L. & Lischer, H.E.L., 2010. Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology*

*Resources*, 10(3), pp.564–567.

- Falush, D., Stephens, M. & Pritchard, J.K., 2003. Inference of population structure using multilocus genotype data: linked loci and correlated allele frequencies. *Genetics*, 164(4), pp.1567–1587.
- Frankham, R., 1995. Conservation genetics. *Annual Review of Genetics*, 29, pp.305–327.
- Frankham, R., Ballou, J.D. & Briscoe, D.A., 2008. *Fundamentos de Genética da Conservação*. P. M. Galetti Jr., F. P. Rodrigues, & I. P. Farias, eds., Ribeirão Preto, SP, Brazil: Editora SBG.
- Frankham, R., Ballou, J.D. & Briscoe, D.A., 2002. *Introduction to Conservation Genetics*, Cambridge, UK: Cambridge University Press.
- Freeland, J.R., 2005. *Molecular Ecology*, Chichester, England: John Wiley and Sons.
- Funk, W. et al., 2012. Harnessing genomics for delineating conservation units. *Trends in Ecology and Evolution*, 27 (9), pp.489–496.
- Goulding, M., 1979. *Ecologia de Pesca do Rio Madeira*, Manaus, Brazil: INPA.
- Goulding, M., Barthem, R.B. & Ferreira, E.J.G., 2003. *The Smithsonian Atlas of the Amazon*, Washington, DC: Smithsonian Institution Press.
- Haffer, J. & Prance, G.T., 2002. Impulsos climáticos da evolução na Amazônia durante o Cenozóico: sobre a teoria dos Refúgios da diferenciação biótica. *Estudos Avançados*, 16, pp.175–206.
- Hammond, D., 2005. *Biophysical features of the Guiana Shield*. D.S. Hammond, ed., Cambridge, MA: CABI.
- IBGE, 1999. *Geografia do Brasil Região Norte*, Rio de Janeiro, Brazil.
- James, A. & Reis, R., 2011. Introduction to Neotropical Freshwaters. In *Historical Biogeography of Neotropical Fishes*. pp. 3–19.
- Junk, W.J., Bayley, P.B. & Sparks, R., 1989. The flood pulse concept in river-floodplain systems. *Canadian Special Publication of Fisheries and Aquatic Sciences*, 106, pp.110–127.
- Junk, W.J., Mota, M.G. & Bayley, P.B., 2007. Freshwater fishes of the Amazon River basin: their biodiversity, fisheries, and habitats. *Aquatic Ecosystem Health and Management*, 10:2, pp.153–173.
- Landines-Parra, M. & Mojica-Benítez, H., 2005. Manejo y Reproducción de Carácidos. In P. Daza, M. Landines-Parra, & A. Sanabria-Ochoa, eds. *Reproducción de peces en el trópico*. Bogotá, Colombia, pp. 91–103.
- Lasso, C. et al., 2011. *Catálogo de los recursos pesqueros continentales de Colombia*. C. Instituto Humboldt, ed., Bogota, Colombia.
- Leão, A.S. de A., 2009. *Análise da variabilidade genética das populações de pirarucu (Arapaima gigas, schinz 1822) dos principais tributários do rio Amazonas através do uso de marcadores microssatélites*. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazonia e Universidade Federal do Amazonas.
- Leite, R.N. & Rogers, D.S., 2013. Revisiting Amazonian phylogeography: insights into diversification hypotheses and novel perspectives. *Organisms Diversity & Evolution*, (Published online:26 June 2013).

- Loubens, G. & Panfili, J., 2001. Biologie de *Piaractus brachypomus* (Teleostei: Serrasalminae) dans le bassin du Mamoré (Amazonie bolivienne). *Ichthyology Exploration Freshwaters*, 12(0936-9902), pp.51–64.
- Lowe-McConnell, R.H., 1999. *Estudios Ecológicos de Comunidades de Peixes Tropicais*, São Paulo, Brazil: Edusp.
- Lucas, M. et al., 2001. *Migration of freshwater fish*. B. Science, ed., Berlin, Germany.
- Luikart, G. & Cornuet, J.-M., 1998. Empirical evaluation of a test for identifying recently bottlenecked populations from allele frequency data. *Conservation Biology*, 12(1), pp.228–237.
- Lujan, N. & Armbruster, J., 2011. The Guiana Shield. In J. S. Albert & R. E. Reisz, eds. *Historical Biogeography of Neotropical Freshwater Fishes*. Berkeley, Los Angeles, London, pp. 211–222.
- Lundberg, J.G. et al., 2010. The Amazonia Neogene fish fauna. In C. Hoorn & F. Wesselingh, eds. *Amazonia: Landscape and Species Evolution: A Look into the Past*. Malaysia, pp. 281–301.
- Macharé, J. & Ortlieb, L., 1993. Registros del Fenómeno del Niño en el Perú. *Bull. Inst. Fr. études andines*, 22, pp.35–52.
- Malabarba, M. & Malabarba, L., 2010. Biogeography of Characiformes: an evaluation of the available information of fossil and extant taxa. In J. Nelson, S. Hans-Peter, & M. Wilson, eds. *Origin and Phylogenetic Interrelationships of Teleosts*. pp. 317–336.
- Mantel, N., 1967. The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Research*, 27(2), pp.209–220.
- Mendes, G. & Ferreira, E.J., 1999. Peixes da bacia Amazônica. In R. H. Lowe-McConnell, ed. *Estudios Ecológicos de Comunidades de Peixes Tropicais*. pp. 345–354.
- Moreno-Letelier, A., 2007. Tamaño efectivo de la población. In L. E. Eguiarte, V. Souza, & X. Aguirre, eds. *Ecología Molecular*. México, D.F., p. 608.
- Myers, N. et al., 2000. Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature*, 403, pp.853–858.
- Oliveira, R. et al., 2008. Hybridization versus conservation: are domestic cats threatening the genetic integrity of wildcats (*Felis silvestris silvestris*) in Iberian Peninsula? *Philosophical Transactions of the Royal Society B Biological Sciences*, 363 (1505), pp.2953–2961.
- Palsbøll, P.J., Bérubé, M. & Allendorf, F.W., 2007. Identification of management units using population genetic data. *Trends in Ecology and Evolution*, 22(1), pp.11–16.
- Patton, J.L. et al., 1997. Diversity, differentiation, and the historical biogeography of nonvolant small mammals of the Neotropical forests. In W. F. Laurance & R. O. Bierregaard, eds. *Tropical Forest Remnants: Ecology, Management, and Conservation of Fragmented Communities*. Chicago, IL, USA: University of Chicago Press, pp. 455–465.
- Primack, R., 2001. Aplicaciones de la biología de Poblaciones. In R. Primack et al., eds. *Fundamentos de Conservación Biológica, Perspectivas Latinoamericanas*. Mexico City, Mexico: Fondo de Cultura Económica de Mexico, p. 783.
- Pritchard, J.K., Stephens, M. & Donnelly, P., 2000. Inference of population structure using

- multilocus genotype data. *Genetics*, 155, pp.945–959.
- Rapp, D., 2008. *Assessing Climate Change: Temperatures, Solar Radiation, and Heat Balance*, California, USA: Praxis Publishing.
- Rice, W.R., 1989. Analyzing tables of statistical tests. *Evolution*, 43(1), pp.223–225.
- Rodriguez, C., 1992. *Bagres malleros y cuerdos del bajo rio Caqueta C.* Tropenbos, ed., Bogota, Colombia.
- Rodriguez, F., 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.* INPA & UFAM.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. & Maniatis, T., 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* 2nd ed., Cold Springs Harbor, NY: Cold Springs Harbor Laboratory Press.
- Dos Santos, G.M., Ferreira, E.J.G. & Zuanon, J.A.S., 2006. *Peixes comerciais de Manaus*, Manaus, AM, Brazil: IBAMA/Pró-Várzea.
- Santos, M. da C.F., Hrbek, T. & Farias, I.P., 2009. Microsatellite markers for the tambaqui (*Colossoma macropomum*, Serrasalminae, Characiformes), an economically important keystone species of the Amazon River floodplain. *Molecular Ecology Resources*, 9(3), pp.874–876.
- Santos-Freitas, M., 2010. *Caracterização da diversidade genética de populações naturais de tambaqui (Colossoma macropomum) através de marcadores moleculares: uma contribuição para conservação da espécie.* Universidade Federal do Amazonas, UFAM.
- Schlötterer, C., 2000. Evolutionary dynamics of microsatellite DNA. *Chromosoma*, 109, pp.265–371.
- Da Silva, T. de J., 2009. *Marcadores moleculares para análise da variabilidade genética de populações do aruanã (Osteoglossum bicirrhosum).* Universidade Federal do Amazonas -UFAM.
- Sioli, H., 1984. The Amazon and its main affluents: hydrography, morphology of the river courses and river types. In H. Sioli, ed. *The Amazon. Limnology and Landscape Ecology of a Mighty Tropical River and its Basin*. New York, NY: Springer Verlag, pp. 127–165.
- Storz, J.F. & Beaumont, M.A., 2002. Testing for genetic evidence of population expansion and contraction: an empirical analysis of microsatellite DNA variation using a hierarchical Bayesian model. *Evolution*, 56(1), pp.154–166.
- Storz, J.F., Beaumont, M.A. & Alberts, S.C., 2002. Genetic evidence for long-term population decline in a savannah-dwelling primate: inferences from a hierarchical bayesian model. *Molecular Biology and Evolution*, 19(11), pp.1981–1990.
- Strasburg, J.L. & Rieseberg, L.H., 2010. How robust are “isolation with Migration” analyses to violations of the IM model? A simulation study. *Molecular Biology and Evolution*, 27(2), pp.297–310.
- Templeton, A.R., 2011. *Genética de Populações e Teoria Microevolutiva* 1º ed., Ribeirão Preto, SP, Brazil: Sociedade Brasileira da Genética.
- UNEP, P. de las N.U. para el M.A., 2013. Repercusiones climáticas del fenómeno El Niño

en América Latina y el Caribe.

<http://www.grida.no/publications/vg/lacsp/page/2792.aspx>, p.12.

- Weir, B.S., 1996. *Genetic Data Analysis II: Methods for Discrete Population Genetic Data*, Sunderland, MA: Sinauer Associates.
- Welcomme, R.L. & Halls, A., 2004. Dependence of tropical river fisheries on flow. In R. L. Welcomme & T. Petr, eds. *Proceedings of the Second International Symposium on the Management of Large Rivers for Fisheries: Volume 2*. Bangkok, Thailand: FAO Regional Office for Asia and the Pacific, RAP Publication 2004/17, pp. 267–284.
- Wesseling, F.. & Hoorn, C., 2011. Geological Development of Amazon and Orinoco Basins. In J. . Albert & R. . Reis, eds. *Historical Biogeography of Neotropical Freshwater Fishes*. London, England, pp. 57–65.
- Winemiller, K.O., 1989. Patterns of variation in life history among South American fishes in seasonal environments. *Oecologia*, 81(2), pp.225–241.
- Wright, S., 1969. *Evolution and the Genetics of Populations. Volume 2. The Theory of Gene Frequencies*, Chicago, IL: University of Chicago Press.
- Wright, S., 1978. *Evolution and the Genetics of Populations. Volume 4. Variability within and among Natural Populations*, Chicago, IL: University of Chicago Press.
- Wright, S., 1943. Isolation by distance. *Genetics*, 28, pp.114–138.

## TABELAS

Tabela 1. Marcadores moleculares usados nas análises da população de *Piaractus brachypomus* na bacia do Amazonas.

Especie	Locus/No. acesso	Primer (5' a 3')	Ta (C°)
<i>Piaractus mesopotamicus</i>	Pme4 AF362446	F: CATGCTGCTGCAGATTAGAC R: CGCTTGCAATTTAACGCAGT	55
	Pme5 AF362447	F: CAGAGCATCTGGAGGGACAT R: TCTGAGACACTGATATCTAAACACACA	55
	Pme21 AF362450	F: ATAATGCTGGCGTCAGTGGT R: GGACAGCTGGTCTCAAGCTC	55
<i>Colossoma macropomum</i>	Cm1F7 EU6853313	F-CCTATTGTGATGGCAGAGAGAG R-CACAGACGTGTACAGCTGGTT	62
	Cm1G7 EU 685314	F-CCCAGCCTACTACAGGGTCA R-CACACATCGCTCTTCTCTCC	62
	Cm1B8 EU685316	F-CACAACCCACCTGTTTGATT R-CTAATAACAAACCTACTTCCACTTCTC	60

Tabela 2. Alelos privados. Representados por tamanho e entre parênteses a frequência.

Local/ locus	Pme4	Pme5	Pme21	Cm1F7	Cm1G7	Cm1B8	Total
1. Beruri	238 (0,045)			219 (0,023)			2
3. Letícia					150 (0,025)		1
4. Santarém					132 (0,024)		1
5. Japurá	208 (0,025)			232 (0,025)	152 (0,025)		3
6. Juruá	206 (0,025)					170 (0,026)	2
7. Tefé	232 (0,025)						1
8. Janauacá					160 (0,026) 158 (0,053)		2
9. Itaituba		194 (0,075) 200 (0,050)				198 (0,075)	3
10. Borba				217 (0,050)			1
11. Humaitá				241 (0,050)			1
12. Guajará- Mirim		204 (0,025)					1
15. Bocas/Acre			274 (0,026)				1
Alelos exclusivos	4	3	1	4	5	2	19
Total de alelos	16	16	6	13	17	11	79

Tabela 3. Caracterização genética de *Piaractus brachipomus* (Amazonas): A= Riqueza alélica, Ho=Heterozigosidade observada, He= Heterozigosidade esperada, Fis=Coeficiente de endogamia, p=significância para H&W e Fis, \*Nível de significância após correção de Bonferroni ( $p < 0.0083$ ).

Locus	Leticia				La Pedrera				Japurá				Juruá				Tefé				FIS
	A	Ho	He	p<0,05	A	Ho	He	p<0,05	A	Ho	He	p<0,05	A	Ho	He	p<0,05	A	Ho	He	p<0,05	
Pme4	7	0.75	0.79	0.49	7	0.80	0.80	0.77	9	0.95	0.89	0.10	10	1.00	0.89	0.98	10	0.80	0.88	0.88	0.04
Pme5	9	0.63	0.81	0.01	8	0.75	0.86	0.16	9	1.00	0.89	0.55	9	0.90	0.89	0.95	8	0.90	0.87	0.87	0.06
Pme21	4	0.50	0.65	0.49	3	0.55	0.60	0.73	5	0.75	0.61	0.73	5	0.60	0.57	0.29	4	0.50	0.57	0.57	0.09
Cm1F7	7	0.70	0.73	0.16	7	0.75	0.70	0.79	10	0.90	0.80	0.52	7	0.75	0.66	0.70	4	1.00	0.56	0.56	-0.06
Cm1B8	8	0.50	0.68	0.04	4	0.90	0.70	0.16	8	0.55	0.76	0.01	7	0.55	0.77	0.003*	5	0.90	0.75	0.75	0.19
Cm1G7	7	0.70	0.72	0.50	5	0.70	0.71	0.80	6	0.63	0.76	0.13	8	0.74	0.77	0.97	5	0.55	0.73	0.72	0.11
Meia	7.0	0.63	0.77		5,7	0.74	0.72		7.8	0.80	0.78		7.7	0.76	0.76		6.0	0.77	0.72	0.72	
FIS	0.13268				-0.02516				-0.02673				-0.00205				-0.07188				
P<0,05	0.0088				0.6911				0.7370				0.5298				0.9081				

Tabela 4. Continuidade caracterização genética de *Piaractus brachypomus* (Amazonas): *A*= Riqueza alélica, *Ho*=Heterozigosidade observada, *He*= Heterozigosidade esperada, *F<sub>IS</sub>*=Coeficiente de endogamia, *p*=significância para H&W e *F<sub>IS</sub>*, \*Nível de significância após correção de Bonferroni ( $p < 0.0083$ ).

Locus	Beruri				Bocas do Acre				Janauacá				Boa Vista				Oriximiná				FIS
	A	Ho	He	p<0,05	A	Ho	He	p<0,05	A	Ho	He	p<0,05	A	Ho	He	p<0,05	A	Ho	He	p<0,05	
Pme4	9	0.77	0.78	0.53	7	0.70	0.78	0.38	8	0.65	0.80	0.05	9	0.80	0.86	0.29	7	0.85	0.86	0.03	0.04
Pme5	7	0.95	0.85	0.86	9	0.80	0.83	0.12	7	0.80	0.85	0.45	8	0.80	0.86	0.97	9	0.85	0.89	0.29	0.06
Pme21	3	0.36	0.48	0.07	5	0.57	0.62	0.60	3	0.55	0.57	0.12	4	0.55	0.59	0.91	4	0.50	0.64	0.31	0.09
Cm1F7	8	0.68	0.68	0.38	3	0.40	0.41	0.28	3	0.90	0.60	0.000*	6	0.75	0.68	0.02	7	0.90	0.80	0.52	-0.06
Cm1B8	5	0.50	0.71	0.003*	3	0.37	0.58	0.17	7	0.63	0.75	0.32	2	0.50	0.05	1.00	4	0.50	0.58	0.76	0.19
Cm1G7	5	0.64	0.70	0.37	4	0.45	0.56	0.19	5	0.67	0.67	0.84	5	0.75	0.66	0.23	5	0.55	0.70	0.09	0.11
Meia	6.18	0.65	0.70		5.2	0.55	0.63		5.5	0.70	0.71		5.7	0.63	0.62		6.00	0.69	0.75		
FIS	0.06763				0.11533				-0.01598				-0.02352				0.07616				
P<0,05	0.1183				0.0401				0.6500				0.6862				0.0714				

Tabela 5. Continuidade caracterização genética de *Piaractus brachypomus* (Amazonas): *A*= Riqueza alélica, *Ho*=Heterozigosidade observada, *He*= Heterozigosidade esperada, *F<sub>IS</sub>*=Coeficiente de endogamia, *p*=significância para H&W e *F<sub>IS</sub>*, \*Nível de significância após correção de Bonferroni ( $p < 0.0083$ ).

Locus	Guajará-Mirim				Humaitá				Borba				Santarém				Itaituba				FIS
	A	Ho	He	p<0,05	A	Ho	He	p<0,05	A	Ho	He	p<0,05	A	Ho	He	p<0,05	A	Ho	He	p<0,05	
Pme4	7	0.75	0.84	0.94	9	0.65	0.83	0.05	10	0.80	0.87	0.07	9	0.90	0.84	0.87	10	0.90	0.88	0.06	0.04
Pme5	10	0.90	0.88	0.18	8	0.65	0.86	0.01	10	0.75	0.86	0.27	9	0.76	0.87	0.03	9	0.75	0.89	0.01	0.06
Pme21	3	0.70	0.59	0.67	3	0.50	0.64	0.33	4	0.50	0.54	0.43	4	0.57	0.60	0.87	5	0.40	0.68	0.05	0.09
Cm1F7	6	0.55	0.67	0.33	8	0.65	0.76	0.08	8	0.65	0.68	0.10	6	0.38	0.57	0.06	7	0.75	0.75	0.05	-0.06
Cm1B8	7	0.50	0.58	0.27	5	0.30	0.59	0.00*	6	0.50	0.74	0.004*	8	0.42	0.69	0.04	7	0.70	0.79	0.05	0.19
Cm1G7	4	0.50	0.72	0.11	4	0.70	0.67	0.61	6	0.60	0.75	0.07	4	0.57	0.69	0.40	7	0.70	0.75	0.000*	0.11
Meia	6.2	0.65	0.71		6.2	0.57	0.72		7.3	0.63	0.74		6.7	0.60	0.71		7.5	0.70	0.79		
FIS	0.09024				0.21048				0.14959				0.15344				0.11726				
P<0,05	0.06354				0.0000				0.0029				0.0010				0.02444				

Tabela 6. Análise de Variância Molecular AMOVA para *Piaractus brachypomus* (Amazonas)

Fontes de variação	Componentes da variância	Porcentagem de variação
Entre populações	0.11899	5.27
Entre os indivíduos dentro das populações	0.13773	6.10
Dentro das populações	2.00000	88.62
<i>F<sub>IS</sub></i>		0.06443*
<i>F<sub>ST</sub></i>		0.05273*
<i>F<sub>IT</sub></i>		0.11376*

\*nível de significância (p<0,05)

Tabela 7. Relação par a par de  $F_{ST}$  entre as localidades amostradas com dados de microssatélites. Sobre a diagonal distâncias geográficas.

Localidades	Leticia	La Pedrera	Japurá	Juruá	Tefé	Beruri	Bocas do Acre	Janauacá	Boa Vista	Óbidos	Borba	Humaitá	Guajará-Mirim	Santarém	Itaituba
1. Leticia	<b>0.0000</b>	1916,56	1494,06	1111,76	1140,82	1610,22	3604,19	2197,99	2701,02	2436,15	2090,7	2727,45	3305,66	2558,2	2856,24
2. La Pedrera	<u>0,01689</u>	<b>0.0000</b>	422,5	1174,48	775,74	1203,83	3197,8	1366,54	2335,94	2193,12	1725,62	2362,37	2940,58	2193,12	2491,16
3. Japurá	<u>0,01708</u>	-0.00006	<b>0.0000</b>	751,98	353,24	781,33	2775,3	944,04	1913,44	1770,62	1303,12	1939,87	2518,08	1770,62	2068,66
4. Juruá	<u>0,02843</u>	0.00971	-0.00281	<b>0.0000</b>	398,74	826,83	2820,8	989,54	1958,94	1816,12	1348,62	1985,37	2563,58	1816,12	2114,16
5. Tefé	0,01897	0.01365	0.00533	0.02054	<b>0.0000</b>	469,4	2463,37	590,8	1560,2	1417,38	949,88	1586,63	2164,84	1417,38	1715,42
6. Beruri	<u>0,04957</u>	0,02803	0.04294	0.03662	0.03573	<b>0.0000</b>	1993,97	204,02	1173,42	908,55	563,1	1199,85	1778,06	1030,6	1328,64
7. B. do Acre	<u>0,09936</u>	0,06124	0.07863	0.05627	0.07115	0.10834	<b>0.0000</b>	2197,99	3167,39	2902,52	2557,07	3193,82	3772,03	3024,57	3322,61
8. Janauacá	<u>0,03387</u>	0,02493	0.00768	0.03445	-0.00520	<u>0,06977</u>	0.10867	<b>0.0000</b>	969,4	895,05	359,08	995,83	1574,04	826,58	1124,62
9. Boa Vista	<u>0,14687</u>	<u>0,13007</u>	<u>0,01775</u>	0.08580	0.12700	0.14907	0.11538	<u>0,14806</u>	<b>0.0000</b>	1864,45	1302,88	1939,63	2517,84	1795,98	2042,82
10. Oriximiná	<u>0,01418</u>	<u>0,01071</u>	<u>-0,0055</u>	0.02611	<u>0,00973</u>	<u>0,05103</u>	0.11969	<u>0,01852</u>	0.15463	<b>0.0000</b>	874,62	1511,37	2089,58	258,99	557,03
11. Borba	<u>0,04909</u>	<u>0,06251</u>	<u>0,04889</u>	<u>0,03717</u>	<u>0,04557</u>	0.09208	<u>0,08276</u>	<u>0,05263</u>	0.07375	0.09208	<b>0.0000</b>	636,75	1214,96	858,88	1156,92
12. Humaitá	<u>0,06821</u>	<u>0,04874</u>	<u>0,05420</u>	<u>0,03075</u>	<u>0,05787</u>	<u>0,07486</u>	<u>0,03579</u>	<u>0,07161</u>	0.04588	0.08704	0.02858	<b>0.0000</b>	578,21	1495,63	1793,67
13. G.-Mirim	<u>0,07280</u>	<u>0,07740</u>	<u>0,06958</u>	<u>0,04267</u>	<u>0,07104</u>	<u>0,10934</u>	<u>0,07341</u>	<u>0,07685</u>	<u>0,04308</u>	<u>0,10427</u>	<u>0,00178</u>	<u>0,00799</u>	<b>0.0000</b>	2073,84	2371,88
14. Santarém	0,00881	0,01619	0.01791	0.02017	0.02335	0.05037	0.09281	0.02557	0.14404	<u>0,03214</u>	<u>0,05169</u>	<u>0,06974</u>	<u>0,06845</u>	<b>0.0000</b>	298,04
15. Itaituba	<u>0,04307</u>	<u>0,02642</u>	<u>0,01775</u>	<u>0,01379</u>	<u>0,03557</u>	<u>0,07246</u>	<u>0,05955</u>	<u>0,04062</u>	<u>0,09735</u>	<u>0,04273</u>	0.01830	<u>0,02601</u>	<u>0,03096</u>	<u>0,04203</u>	<b>0.0000</b>

\*valores sublinhados é o nível de significância depois da correção de Bonferroni ( $p < 0,0004$ )

Tabela 8. Taxa de imigração ( $M = m/\mu$ ) e valor de  $\Theta$  ( $4Ne\mu$ ) por localidade na bacia do Amazonas. Valores da media e intervalos de confiança (97,5%) X= fonte da migração.

Localidades	Theta	M1 ← X	M2 ← X	M3 ← X	M4 ← X	M5 ← X	M6 ← X	M7 ← X	M8 ← X
1. Letícia	1.3000		1.125 (0,20-2,10)	0.875 (0,30-1,30)	0.925 (0,25-1,65)	1.225 (0,60-2,10)	1.225 (0,45-1,85)	0.825 (0,10-1,70)	0.625 (0,05-1,55)
2. La Pedrera	1.2000	0.775 (0,20-1,35)		0.925 (0,35-1,45)	1.025 (0,15-1,95)	0.975 (0,45-1,85)	1.225 (0,45-1,70)	0.875 (0,30-1,60)	0.825 (0,00-1,50)
3. Japurá	1.9000	0.875 (0,15-1,4)	0.975 (0,25-1,55)		0.875 (0,10-2,00)	0.825 (0,20-1,45)	0.825 (0,30-1,35)	1.125 (0,10-1,70)	0.525 (0,00-1,60)
4. Juruá	1.5000	0.925 (0,35-0,93)	1.025 (0,00-1,02)	1.075 (0,40-1,90)		0.875 (0,20-1,75)	0.975 (0,30-1,60)	0.325 (0,00-0,85)	0.975 (0,25-1,80)
5. Tefê	1.1500	0.975 (0,35-1,4)	1.125 (0,55-1,75)	0.975 (0,35-1,50)	0.675 (0,00-1,25)		0.975 (0,30-1,55)	1.225 (0,40-1,90)	0.975 (0,25-1,90)
6. Beruri	1.3500	1.125 (0,45-2,00)	1.825 (0,80-2,50)	0.825 (0,15-1,60)	1.125 (0,00-1,17)	1.625 (0,50-2,35)		0.975 (0,30-1,55)	1.075 (0,40-1,75)
7. Bocas do Acre	1.0000	0.675 (0,05-1,25)	0.875 (0,20-1,85)	1.075 (0,40-1,60)	0.825 (0,00-1,45)	0.975 (0,00-1,90)	0.825 (0,15-1,25)		0.825 (0,05-1,50)
8. Janauacá	1.0000	0.775 (0,10-1,55)	0.775 (0,10-2,00)	1.225 (0,50-2,00)	1.275 (0,50-2,05)	1.125 (0,20-1,90)	0.775 (0,15-1,60)	1.125 (0,40-1,75)	
9. Boa Vista	1.1500	0.575 (0,00-1,10)	1.225 (0,45-1,85)	0.525 (0,05-0,95)	0.825 (0,00-1,45)	0.975 (0,45-1,50)	1.075 (0,30-1,75)	0.875 (0,30-1,60)	0.825 (0,00-1,50)
10. Oriximiná	1.4500	1.525 (0,65-2,15)	0.725 (0,00-1,30)	1.325 (0,70-2,00)	1.175 (0,40-1,95)	0.975 (0,15-1,60)	0.925 (0,20-1,40)	0.725 (0,05-1,20)	0.775 (0,15-1,55)
11. Borba	1.4500	0.875 (0,20-1,60)	0.925 (0,25-1,65)	0.725 (0,05-1,30)	1.325 (0,50-2,00)	0.825 (0,15-1,40)	1.075 (0,30-1,07)	0.625 (0,05-1,20)	0.675 (0,10-1,45)
12. Humaitá	1,4500	0.625 (0,15-1,20)	1.225 (0,50-1,22)	0.425 (0,00-1,00)	0.925 (0,30-1,50)	1.025 (0,25-1,60)	0.875 (0,25-1,45)	0.725 (0,15-1,30)	0.475 (0,00-1,15)
13. Guajará-Mirim	1.3000	0.775 (0,25-1,35)	0.725 (0,15-0,72)	0.725 (0,20-1,15)	0.575 (0,00-1,05)	1.075 (0,40-1,07)	0.575 (0,00-0,95)	0.875 (0,25-1,55)	1.225 (0,30-1,95)
14. Santarém	1.4500	1.125 (0,25-1,85)	1.225 (0,25-2,25)	0.925 (0,200-1,55)	0.725 (0,15-1,30)	1.075 (0,35-2,05)	1,225 (0,55-1,90)	0.325 (0,00-0,85)	1.175 (0,50-1,95)
15. Itaituba	1.8500	0.975 (0,20-1,55)	0.975 (0,25-1,80)	0.475 (0,00-1,10)	1.075 (0,35-1,80)	0.575 (0,05-1,15)	0.625 (0,05-1,10)	0.725 (0,15-1,35)	0.775 (0,25-1,20)

Tabela 9. Continuidade taxa de imigração ( $M = m/\mu$ ) e valor de  $\Theta$  ( $4Ne\mu$ ) por localidade; X= fonte da migração.

Localidades	Theta	M9 ← X	M10 ← X	M11 ← X	M12 ← X	M13 ← X	M14 ← X	M15 ← X
1. Leticia	1.3000	1.125 (0,25-1,60)	1.125 (0,40-1,90)	0.575 (0,00-1,15)	0.675 (0,00-1,65)	0.825 (0,20-1,35)	1.175 (0,40-1,85)	1.075 (0,25-1,70)
2. La Pedrera	1.2000	1.025 (0,00-1,90)	0.975 (0,25-1,80)	1.125 (0,00-1,40)	0.875 (0,20-1,65)	0.875 (0,30-1,55)	1.025 (0,35-1,65)	0.775 (0,20-1,25)
3. Japurá	1.9000	0.925 (0,05-1,75)	0.525 (0,00-1,45)	0.675 (0,15-1,30)	0.875 (0,15-2,10)	0.625 (0,10-1,05)	0.725 (0,15-1,45)	0.875 (0,15-1,60)
4. Juruá	1.5000	0.825 (0,05-1,55)	0.775 (0,10-1,45)	0.925 (0,25-1,75)	0.775 (0,15-1,45)	1.125 (0,30-1,90)	0.675 (0,05-1,45)	0.875 (0,25-1,45)
5. Tefê	1.1500	0.625 (0,00-1,00)	0.825 (0,15-1,60)	0.725 (0,10-1,35)	1.025 (0,35-1,60)	0.825 (0,10-1,50)	0.975 (0,30-1,50)	0.675 (0,10-1,25)
6. Beruri	1.3500	1.025 (0,15-1,55)	1.325 (0,45-2,00)	1.275 (0,50-2,00)	0.975 (0,00-2,45)	1.125 (0,45-2,05)	1.125 (0,45-1,75)	0.925 (0,30-1,45)
7. Bocas do Acre	1.0000	0.925 (0,25-1,55)	0.775 (0,05-1,40)	1.175 (0,55-1,65)	1.275 (0,60-1,90)	0.725 (0,10-1,30)	0.825 (0,00-1,40)	0.775 (0,35-1,55)
8. Janauacá	1.0000	1.175 (0,25-1,90)	0.825 (0,15-1,85)	1.075 (0,40-1,60)	0.775 (0,00-1,45)	1.225 (0,25-2,05)	0.975 (0,15-1,95)	0.575 (0,00-1,00)
9. Boa Vista	1.1500		0.775 (0,25-1,80)	0.725 (0,00-1,40)	1.025 (0,25-2,05)	1.325 (0,45-2,35)	0.725 (0,20-1,15)	0.775 (0,20-1,40)
10. Oriximiná	1.4500	0.375 (0,00-0,90)		1.225 (0,50-2,00)	0.675 (0,00-1,30)	0.875 (0,10-1,50)	0.975 (0,00-1,70)	0.725 (0,10-1,35)
11. Borba	1.4500	1.025 (0,30-1,70)	0.875 (0,25-1,40)		1.175 (0,45-1,75)	1.025 (0,30-1,90)	0.825 (0,15-1,20)	1.125 (0,45-1,80)
12. Humaitá	1,4500	1.225 (0,40-1,95)	0.875 (0,20-1,55)	1.225 (0,30-1,85)		0.975 (0,45-1,40)	1.075 (0,15-1,55)	1.075 (0,30-1,60)
13. Guajará-Mirim	1.3000	1.325 (0,25-2,35)	0.475 (0,00-1,65)	1.125 (0,05-1,95)	1.025 (0,05-2,15)		0.675 (0,10-1,40)	0.775 (0,15-1,60)
14. Santarém	1.4500	0.825 (0,20-1,60)	0.825 (0,25-1,35)	0.875 (0,15-1,50)	0.975 (0,20-1,80)	0.625 (0,00-1,70)		0.775 (0,15-1,70)
15. Itaituba	1.8500	0.525 (0,00-1,10)	0.775 (0,15-1,45)	0.625 (0,00-1,45)	1.175 (0,35-1,80)	0.875 (0,20-1,70)	0.775 (0,05-1,60)	

Tabela 10. Fluxo gênico  $Nm$  ( $4Nem$ ) acima e abaixo da diagonal e tamanho efetivo populacional  $N_e$  ( $\Theta/4\mu$ ) na diagonal, a partir do máximo valor do intervalo de confiança.  $\mu$  = taxa de mutacional para microsatélites  $10^{-4}$

Localidades	Nm1	Nm2	Nm3	Nm4	Nm5	Nm6	Nm7	Nm8	Nm9	Nm10	Nm11	Nm12	Nm13	Nm14	Nm15
1. Leticia	<b>1083,3</b>	2,520	2,470	2,475	2,415	2,497	1,700	1,550	1,840	2,755	1,667	2,392	1,755	2,682	3,145
2. La Pedrera	1,755	<b>1000</b>	2,945	2,925	2,127	2,295	1,600	1,500	2,185	2,610	2,030	2,392	2,015	2,392	2,312
3. Japurá	1,820	1,860	<b>1583,3</b>	3,00	1,667	1,822	1,700	1,600	2,012	2,102	1,885	3,045	1,365	2,102	2,96
4. Juruá	1,209	1,224	1,938	<b>1250</b>	2,012	2,160	0,850	1,800	1,782	2,320	2,537	2,102	2,470	2,102	2,682
5. Tefé	1,820	2,100	3,325	1,875	<b>958,3</b>	2,092	1,900	1,900	1,150	2,900	1,957	2,320	1,950	2,175	2,312
6. Beruri	2,600	3,000	4,750	1,755	2,702	<b>1125,0</b>	1,550	1,750	1,782	2,030	2,900	3,552	2,665	2,537	2,682
7. Bocas do Acre	1,625	2,220	3,515	2,175	2,185	1,687	<b>833,3</b>	1,500	1,782	2,682	2,392	2,755	1,690	2,030	2,867
8. Janauacá	2,015	2,400	3,800	3,075	2,185	2,160	1,750	<b>833,3</b>	2,185	2,610	2,320	2,102	2,665	2,827	1,850
9. Boa Vista	1,430	2,220	3,515	2,175	1,725	2,362	1,600	1,500	<b>958,3</b>	2,030	2,030	2,972	3,055	1,667	2,590
10. Oriximiná	2,795	1,560	2,470	2,925	1,840	1,890	1,200	1,550	1,035	<b>1208,3</b>	2,900	1,885	1,950	2,465	2,497
11. Borba	2,080	1,980	3,135	3,000	1,610	1,444	1,200	1,450	1,955	2,247	<b>1208,3</b>	2,537	2,470	1,740	3,330
12. Humaitá	1,560	1,464	2,318	2,250	1,840	1,957	1,300	1,150	2,245	2,392	2,682	<b>1208,3</b>	1,820	2,247	2,960
13. Guajará-Mirim	1,755	0,864	1,368	1,575	1,230	1,282	1,550	1,950	2,702	1,957	2,827	3,117	<b>1083,3</b>	2,030	2,960
14. Santarém	2,405	2,700	4,275	1,950	2,300	2,565	0,850	1,950	1,840	2,102	2,175	2,610	2,210	<b>1208,3</b>	3,145
15. Itaituba	2,015	2,160	3,420	2,700	1,322	1,485	1,350	1,200	1,265	2,102	2,102	2,610	2,210	2,320	<b>1541,7</b>
Total	26,884	28,272	<b>43,244</b>	33,855	27,163	27,702	<b>20,100</b>	22,35	25,76	32,84	32,41	36,39	30,29	31,32	38,295

Tabela 11. Diversidade genética para peixes de águas doces obtidos a partir de marcadores microssatélites. A= Riqueza alélica, He= heterozigocidade esperada.

<b>Especie</b>	<b>No. locus</b>	<b>A</b>	<b>He</b>	<b>Referencia bibliográfica</b>
Peixes águas doces geral	75	7,5	0,46	DeWoody & Avise (2000)
<i>Piaractus brachypomus</i> (Orinoco)	7	6,1	0,66	Neste estudo
<i>Piaractus brachypomus</i> (Amazonas)	6	6,4	0,72	Neste estudo
<i>Piaractus mesopotamicus</i>	8	8,5	0,58	Calcagnotto & DeSalle (2009)
<i>Colossoma macropomum</i>	12	21,4	0,78	Santos-Freitas (2010)
<i>Brachyplatystoma vaillantii</i>	6	9,2	0,75	Rodrigues (2009)
<i>Brachyplatystoma rousseauxii</i>	8	11,3	0,61	Batista (2010)
<i>Arapaima gigas</i>	11	12,4	0,65	Leão A (2009)

Tabela 12. Valores de atribuição (Q) dos indivíduos de cada localidade.

Pontos da Figura	Localidades	Cluster 1 (Q)	Cluster 2 (Q)	Número de indivíduos
1	Letícia	<b>0.845</b>	0.155	20
2	Tefé	0.714	0.286	20
3	Beruri	0.726	0.274	20
4	Janauacá	0.786	0.214	20
5	Oriximiná	<b>0.893</b>	0.107	20
6	Santarém	<b>0.849</b>	0.151	21
7	Japurá	0.782	0.218	20
8	Juruá	0.588	0.412	20
9	La Pedrera	0.675	0.325	20
10	Borba	0.372	0.628	20
11	Humaitá	0.164	<b>0.836</b>	20
12	Guajará-Mirim	0.150	<b>0.850</b>	20
13	Bocas do Acre	0.197	<b>0.803</b>	20
14	Itaituba	0.433	0.567	20
15	Boa Vista	0.051	<b>0.949</b>	20

## FIGURAS

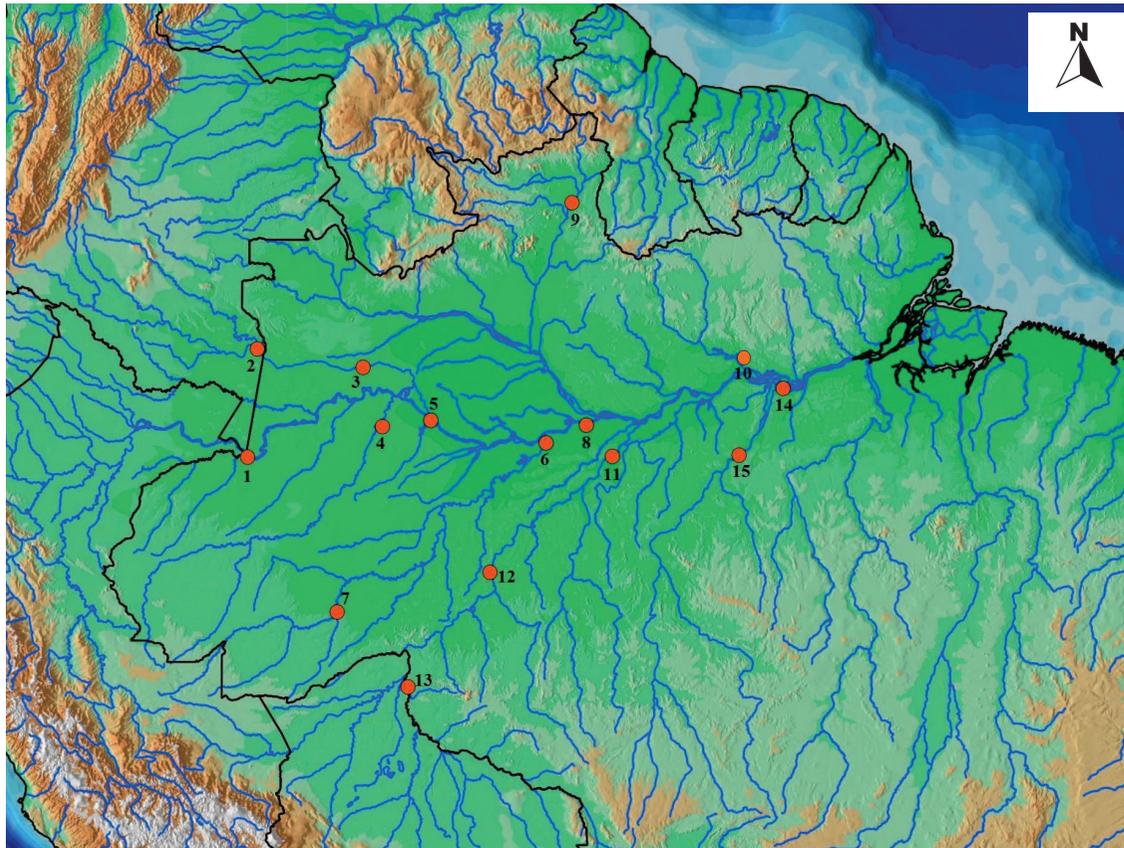
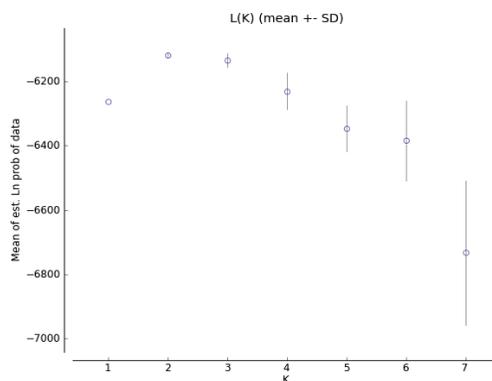
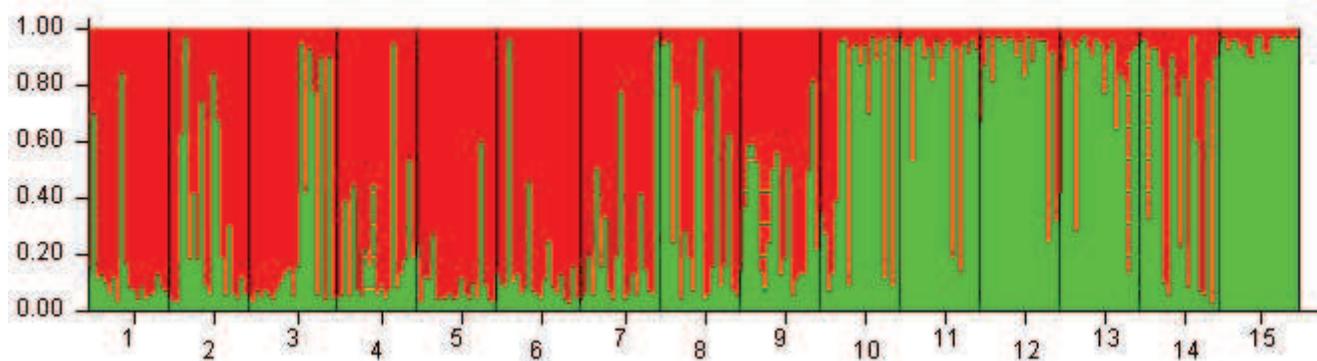


Figura 1. Localização das coletas na bacia do Amazonas: 1. Leticia, 2. La Pedrera, 3. Japurá, 4. Juruá, 5. Tefé, 6. Beruri, 7. Boca do Acre, 8. Janauacá, 9. Boa Vista, 10. Oriximiná, 11. Borba, 12. Humaita, 13. Guajará-Mirim, 14. Santarém, 15. Itaituba.



(a)



(b)

Figura 2. Resultados de *Structure* para a bacia do Amazonas. a) A análises por máxima probabilidade, na vertical: medida da estimativa de distribuição de probabilidade dos dados, na horizontal: número de *clusters* testados. b) *Cluster* a cor vermelha representa os indivíduos relacionados com a bacia sedimentaria Amazônica, a cor verde representa os indivíduos relacionados com os escudos cristalinos da bacia da Amazônia. 1.Leticia, 2.Tefé, 3. Beruri, 4. Janauacá, 5. Trombetas, 6. Santarém, 7. Japurá, 8. Juruá, 9. La Pedrera, 10. Borba, 11. Humaitá, 12. Guajará-Mirim, 13. Boca do Acre, 14. Itaituba, 15. Boa Vista.

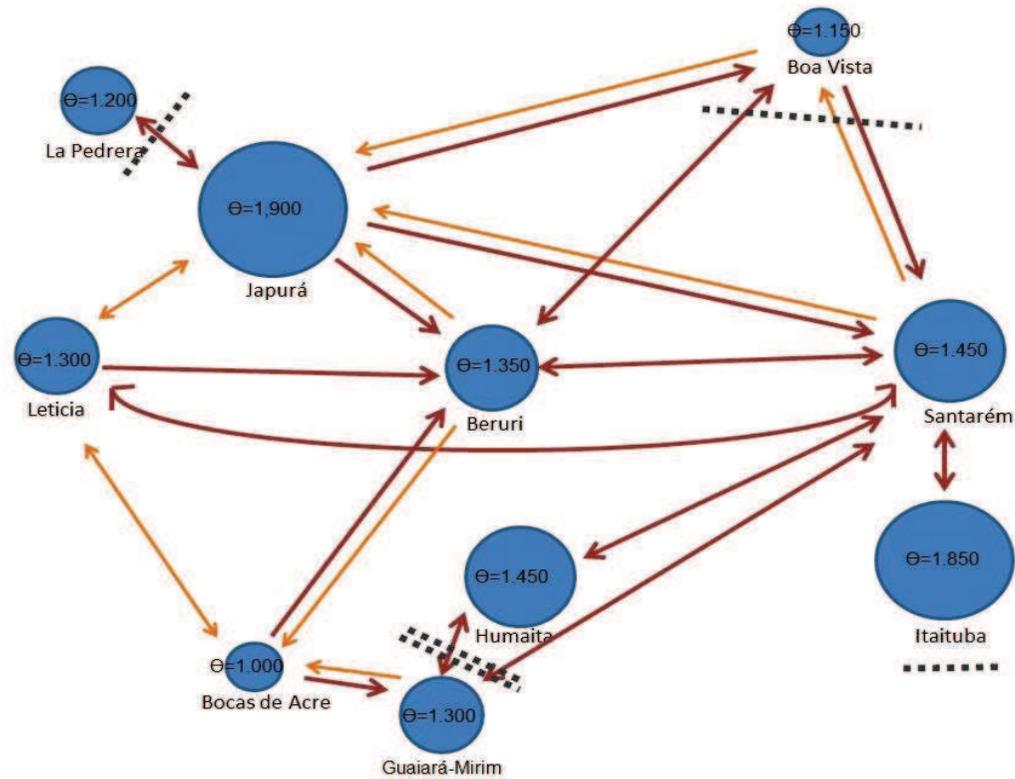


Figura 3. Diagrama de fluxo gênico da população de *Piaractus brachypomus* na bacia do rio Amazonas. Representando as localidades mais distantes (La Pedrera, Boca de Acre, Guaiará-Mirim, Itaituba e Boa Vista) localidades da calha principal Solimões – Amazonas (Leticia, Beruri, Santarém) e localidades antes das cachoeiras (Japurá, Humaitá). Linha marrão indica moderado fluxo gênico, linha amarela indica baixo fluxo gênico. Linha em traços representam as cachoeiras.

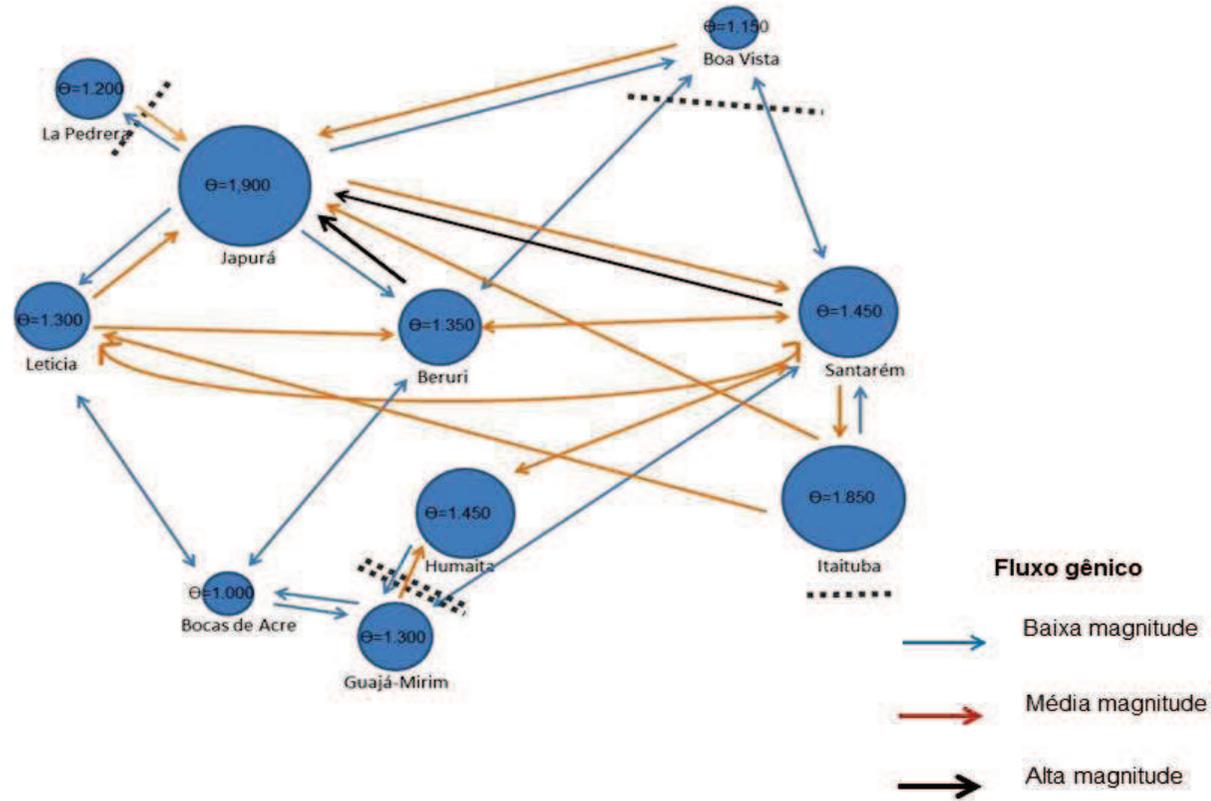
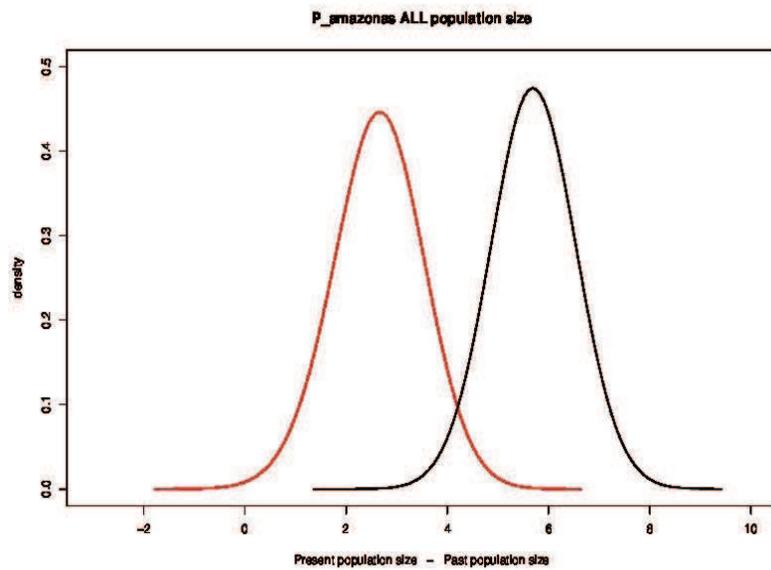
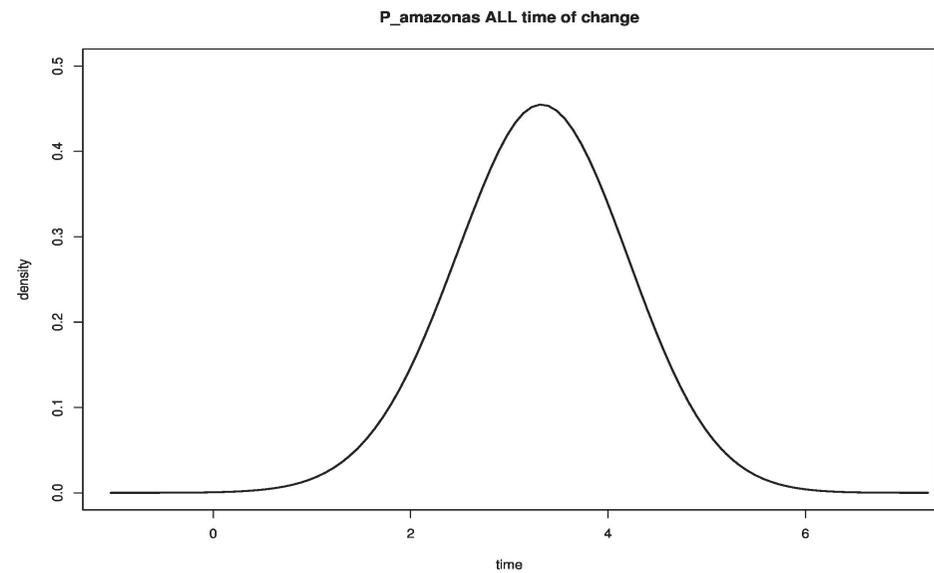


Figura 4. Diagrama detalhado do fluxo gênico da população de *Piaractus brachypomus* na bacia do rio Amazonas. Linha azul indica baixo fluxo gênico ( $Nm \leq 27,80$ ), linha marrom indica moderado fluxo gênico ( $Nm = 27,80 - 35,50$ ) e linha preta indica alto fluxo gênico ( $Nm = 35,50 - 43,20$ ). Linha em traços representam as cachoeiras.



(a)



(b)

Figura 5. Demografia histórica da população de *Piaractus brachypomus* na bacia do Amazonas. a) Tamanhos efetivos populacionais em vermelho a população recente, em preto a população ancestral. b) O tempo de inicio de decrescimento populacional.



Figura 6. Unidades Biológicas (UB) de *Piaractus brachypomus* na bacia Amazônica. A cor amarelo-claro indica a área da UB mais puras relacionadas com a bacia sedimentar. A cor verde-escuro indica a área da UB mais puras relacionadas com os escudos de Guiana e Brasileiro, em cor verde-amarelo corresponde a área a mistura das duas UBs.

#### 4. CONCLUSÕES GERAIS

O estudo permitiu definir que a população de *Piaractus brachypomus* está altamente estruturada, formando duas Unidades Evolutivas Significantes -*ESU* totalmente isoladas. Cada *ESU* está associada aos dois grandes sistemas hidrológicos no norte do continente sul-americano: as bacias do Amazonas e Orinoco.

As duas *ESU* apresentaram características genéticas e morfológicas significantes que permitem sua delimitação, assim como atributos de diversidade genética e demográficos diferenciados.

A população do Amazonas revelou alta diversidade genética ao comparar com outros grandes peixes migradores da região. A complexidade e processo de formação histórica da região Amazônica levou a estruturação da população em duas unidades biológicas, que correspondem a duas unidades de manejo ou estoques pesqueiros. Cada unidade biológica está relacionada as formações geomorfológicas da bacia. Uma com a bacia sedimentar ao oeste, tendo indivíduos mais puros nos afluentes andinos, e a outra nos escudos cristalinos de Guiana e Brasileiro ao leste, com indivíduos mais puros nos afluentes em Bolívia e Roraima. A calha principal do rio Solimões–Amazonas e áreas associadas constituíram a zona de mistura das duas unidades biológicas. O fluxo gênico entre as localidades mostrou-se assimétrico, e de baixa magnitude comparado com outros peixes migradores da região, mas suficiente para manter a conexão da população. A população passou por um forte declínio populacional, produto de fortes mudanças climáticas características da época. No entanto sua alta variação genética, tamanho efetivo populacional ancestral e história de vida permitiram a recuperação e expansão da população, embora o tamanho efetivo populacional atual ainda não seja suficiente para garantir o estabelecimento da espécie.

A população do Orinoco mostrou ser panmítica e com moderada diversidade genética quando comparada com outros peixes de águas doces da América do Sul. O fluxo gênico manifestou-se assimétrico e de moderada magnitude permitindo a conexão da população. Os rios andinos constituíram a fonte principal para toda a população, enquanto as áreas alagadas entre Apure e Arauca conhecido como “delta interno” constituiu o maior berçário. A população passou por uma drástica diminuição do tamanho populacional, produto de severas variações climáticas. Mas a alta diversidade, o tamanho da população ancestral e as características intrínsecas da espécie permitiram sua expansão e recuperação.

Uma vez definidas e identificadas as *ESU* de *Piaractus brachypomus* em sua área de distribuição com suas características genético-populacionais próprias, fez-se necessário estabelecer medidas de gestão como um recurso pesqueiro independentes.

Na bacia do Orinoco, é possível manter a mesma normatividade com relação as épocas de defeso e tamanho mínimo de captura, dado que trata-se de uma única população. Esta última pode ser definida de acordo com estudos biológicos pesqueiros obtidos na área de Apure-Arauca que congrega a maioria de indivíduos dos diferentes afluentes, sendo eles juvenis e adultos em processo de amadurecimento.

Os afluentes andinos da bacia do Orinoco, devem ter um tratamento especial de conservação por ser a fonte de indivíduos para população. A extração pesqueira nestas localidades pode ser orientada por um manejo da pressão de pesca, assim como o comprimento do tamanho mínimo de captura e época de defeso.

Com relação ao aspecto aquícola, a espécie deveria ser criada e mantida na mesma bacia, e não ser translocada à bacia do Amazonas para evitar erosão genética por possíveis vazamentos ao ambiente natural.

Sugere-se ter desenvolvimento próprio da aquicultura na região Amazônica, de tal forma que reprodutores de alevinos de *Piaractus brachypomus* tenham o mesmo acervo gênico que a população natural, evitando desta maneira o translocação de peixes do Orinoco.

Sugere-se que o manejo pesqueiro na região Amazônica seja diferenciado, tendo em conta as unidades biológicas e área de mistura genética.

Sugere-se que a normatividade pesqueira seja homologada nos países de acordo como o território nacional que cada unidade biológica ocupa, por exemplo, épocas de defeso podem ser iguais entre Brasil e Bolívia para as áreas dos afluentes do escudo do Brasileiro.

Este trabalho foi viabilizado com a parceria:

Bolsa de estudo concedida pela:

CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior)

Apoio financeiro:

CNPQ No. 55457/2006-9

CNPQ No. 53/2010

Execução do trabalho:

Universidade Federal do Amazonas -Laboratório de Genética Animal -LEGAL

Licença permanente para coleta de material zoológico:

MMA/ICMBio/SISBIO No. 3741-1