

**PUNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS**  
**FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS**  
**PESQUEIRAS NOS TRÓPICOS**

**ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE LOCOS**  
**MICROSSATÉLITES E SUA APLICAÇÃO NA**  
**IDENTIFICAÇÃO DE ESTOQUE PESQUEIRO DA PIRAÍBA -**  
***BRACHYPLATYSTOMA FILAMENTOSUM* – PIMELODIDAE-**  
**SILURIFORMES**

LARISSA MELO DAS NEVES BRASIL

**MANAUS**  
**2016**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS**  
**FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO CIÊNCIAS**  
**PESQUEIRAS NOS TRÓPICOS**

LARISSA MELO DAS NEVES BRASIL

**ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE LOCOS**  
**MICROSSATÉLITES E SUA APLICAÇÃO NA**  
**IDENTIFICAÇÃO DE ESTOQUE PESQUEIRO DA PIRAÍBA -**  
***BRACHYPLATYSTOMA FILAMENTOSUM* – PIMELODIDAE-**  
**SILURIFORMES**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Pesqueiras nos Trópicos da Universidade Federal do Amazonas (UFAM), como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Pesqueiras nos Trópicos.

**Orientador: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Jacqueline da Silva Batista**

**MANAUS**  
**2016**

Ficha Catalográfica  
(Catalogação na fonte realizada pela Biblioteca Central – UFAM)

<b>B823i</b>	<p>Brasil, Larissa Melo das Neves Isolamento e caracterização de locos microssatélites e sua aplicação na identificação de estoque pesqueiro da piraíba - <i>Brachyplatystoma filamentosum</i> – Pimelodidae-Siluriformes / Larissa Melo das Neves Brasil. 2016 84 f.: il. color; 31 cm.</p> <p>Orientadora: Jacqueline da Silva Batista Dissertação (Mestrado em Ciências Pesqueiras nos Trópicos) - Universidade Federal do Amazonas.</p> <p>1. <i>Brachyplatystoma filamentosum</i> (Piraíba). 2. Bacia amazônica. 3. DNA. 4. Microssatélites. 5. Estoque pesqueiro. I. Batista, Jacqueline da Silva II. Universidade Federal do Amazonas III. Título Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).</p>
--------------	--

LARISSA MELO DAS NEVES BRASIL

**ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE LOCOS  
MICROSSATÉLITES E SUA APLICAÇÃO NA  
IDENTIFICAÇÃO DE ESTOQUE PESQUEIRO DA PIRAÍBA -  
*BRACHYPLATYSTOMA FILAMENTOSUM* – PIMELODIDAE-  
SILURIFORMES**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Pesqueiras nos Trópicos da Universidade Federal do Amazonas (UFAM), como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Pesqueiras nos Trópicos.

Aprovado em 16 de março de 2016.

**BANCA EXAMINADORA**

1. Dra. María Doris Escolar Lizararo  
Universidade Federal do Amazonas
2. Dra Miriam Silva Rafael  
Instituto Nacional de Pesquisas da Amazonia
3. Dra. Denise Correa Benzaquem  
Universidade Estadual do Amazonas

*Ao autor da minha vida, ao meu amado  
marido, a meus pais e minha irmã, dedico...*

## **Agradecimentos**

Agradeço primeiramente a Deus, autor da vida, que não desiste de mim até que a minha história esteja completa. Como um tapeceiro incansável em sua arte, tecendo o tapete do avesso, formando um emaranhado de linhas, confusas, feias até. Mas o tapeceiro tem tudo sob controle, ele sabe como ficará o resultado final. Ao virar o tapete do lado certo, ver que sua obra de arte é impecável! Na vida é assim. Essa etapa do mestrado foi mais um toque de beleza para somar à minha história de vida.

Grata sou também àqueles que me ajudaram/incentivaram no cotidiano para que esta etapa se concluísse.

Ao meu marido – Fábio Brasil, que me acompanhou em TODOS os momentos, desde o altar (casamos!!), incluindo a fase de coleta das amostras de peixes, viajando pra tão longe, sem conforto, “na saúde e na doença” – pegamos malária ao mesmo tempo... e em tudo o que ele pode.

Aos meus pais João Passos e Maria Aparecida, com um amor incondicional, que SEMPRE estão preocupados em saber se está tudo bem, e se estou precisando de alguma coisa, e dando qualquer jeito de participar da minha vida! AMO “do tamanho da mão de Deus”, me deram todas as condições para que eu chegasse até aqui!

A minha irmã Fabrícia Melo, que mesmo longe, fazendo mestrado ao mesmo tempo que eu, me deu total incentivo, força e parceria...te amo mana!

A minha orientadora Dra. Jacqueline da Silva Batista pelo incentivo de iniciar o mestrado, me resgatando do comodismo para que eu retornasse aos estudos; pela atenção, pelo tempo dedicado, paciência e disposição para a conclusão do trabalho. Devo muitíssimo a ela, a realização desta etapa!!!

Às minhas “co-orientadoras” Kyara Formiga e Giselle Moura me dando todo suporte laboratorial e técnico. Em particular, a Gi, minha vizinha deu SUPER contribuição na hora de fazer as análises, doando seu tempo e sua casa para discutirmos as análises. Você é nota 10000000, nunca vou esquecer!

É claro, aos meus amigos de laboratório pelas ENORMES ajudas, pelas discussões científicas e/ou não científicas; por terem me ajudado a resolver as dúvidas: Kátia, Fabyanne, Yumi, Paula, Vanessa, Fernanda, Santiago, Saulo, Jane... Valeu gente! sentirei muita falta dos nossos quitutes!!

A Universidade Federal do Amazonas – UFAM e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Pesqueiras nos Trópicos - CIPET, a coordenação da Dra. Kedma Yamamoto.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão de bolsas de estudo.

Ao Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA) e ao Laboratório Temático de Biologia Molecular (LTBM / INPA) por propiciar as condições necessárias de infraestrutura e logística para a execução desse trabalho.

Ao projeto Pirada – Genética, manejo e conservação dos grandes bagres migradores na Amazônia pelo financiamento deste estudo.

Sem esses apoios, a experiência de realização deste trabalho não seria tão rica quanto foi. Cada um já está marcado na minha história.

AGRADEÇO

## Resumo

A piraíba – *Brachyplatystoma filamentosum*, é o maior dentre os bagres migradores Amazônicos. Sua distribuição abrange toda a bacia amazônica, desde os rios do Amapá até a cordilheira dos Andes, habitando tanto em água branca, preta e clara, como também em tributários e lagos de várzea e igapó. Até 2005 as informações a respeito desta espécie eram tratadas em comum com a *Brachyplatystoma capapretum*, que foi descrita com base em características osteológicas. Nesse contexto, faz-se necessário estudos sobre a biologia dessas espécies, sendo a genética a ciência promissora para elucidar questões como o ciclo biológico, distribuição exata no ambiente amazônico, variabilidade e estoque genético. Estudos genéticos utilizando sequências de DNA mitocondrial contribuíram revelando que em média *B. filamentosum* é mais abundante que *B. capapretum* em rios de águas brancas na bacia amazônica. O presente estudo se propôs, através de marcadores moleculares microssatélites, verificar se o *B. filamentosum* apresenta estrutura populacional, podendo compor mais de que um estoque genético e se possui segregação genética e se está associada ao tipo de água onde ocorrem. Dezesete marcadores microssatélites foram isolados e caracterizados em 35 indivíduos de *B. filamentosum* oriundas da região de Belém – PA, Brasil. Foram obtidos 78 alelos, variando entre 1 a 15 alelos por loco, com uma média de 6,00. A heterozigosidade observada ( $H_o$ ) e esperada ( $H_e$ ) variou entre 0,100 à 0,875 (média 0,569) e 0,136 à 0,837 (média 0,558), respectivamente. A amplificação heteróloga resultou em 3 a 12 locos entre seis espécies do gênero *Brachyplatystoma*: *B. capapretum* (filhote capapreta), *B. vaillantii* (piramutaba), *B. rousseauxii* (dourada), *B. platynemum* (babão), *B. tigrinum* (dourada zebra) e *B. juruense* (flamengo). Os marcadores microssatélites obtidos irão contribuir para futuros estudos genéticos de populações naturais de *B. filamentosum* e estarão disponíveis para outras espécies do gênero *Brachyplatystoma*. Dez locos microssatélites foram utilizados para as análises de genética populacional de 178 indivíduos de *B. filamentosum* amostrados em seis regiões da bacia amazônica, representantes de três diferentes tipos de água. Foi obtido um total de 80 alelos, com uma média de 8 alelos, média das heterozigosidades observada de 0,548 e esperada de 0,598 por loco. Os resultados da AMOVA indicaram moderado fluxo gênico entre as localidades e valores significativos de  $F_{ST}$ . Não é possível aceitar a hipótese nula de panmixia, de um único estoque para a espécie, pois as análises, de forma geral, indicam estrutura entre algumas localidades, principalmente entre rio Araguaia com os rios rio Branco ( $F_{ST} = 0,113$ ) e Negro ( $F_{ST} = 0,219$ ). O rio Negro também apresentou o rio Madeira ( $F_{ST} = 0,101$ ). Os valores de  $Nm$  também foram abaixo de 4 entre essas localidades. Desta forma, sugere-se que *B. filamentosum* seja manejada considerando mais de que um estoque genético, principalmente no rio Negro, Araguaia e Branco. Todavia, não se pode afirmar que essa segregação esteja totalmente associada ao tipo de água.

## Abstract

The Piraíba- *Brachyplatystoma filamentosum*, Is the largest among the migratory Amazonian catfish. Its distribution covers the entire Amazon basin, from the rivers of Amapá to the Andes, living both in white water, black and clear, as well as in tributaries and floodplains and igapó lakes. Until 2005 the information about this species were treated in common with *Brachyplatystoma capapretum*, which was described based on osteological features. In this context, it is necessary studies on the biology of the species, being the genetics the promising science to elucidate issues such as life cycle, accurate distribution in the Amazonian environment, variability and genetic stock. Genetic studies using mitochondrial DNA sequences contributed revealing that on average *B. filamentosum* is more abundant than *B. capapretum* in white water rivers in the Amazon basin. This study aims, through microsatellite markers, check if *B. filamentosum* presents population structure and can compose more than one genetic stock, if it has genetic segregation and if it is associated with the type of water where is its natural environment. Seventeen microsatellite markers were isolated and characterized in 35 individuals of *B. filamentosum* coming from the Belem - PA, Brazil. There were obtained 78 alleles that ranged from 1 to 15 alleles per locus, with an average of 6.00%. The observed heterozygosity ( $H_o$ ) and expected ( $H_e$ ) ranged from 0.100 to 0.875 (mean 0.569) and 0.136 to 0.837 (mean 0.558), respectively. The heterologous amplification resulted in 3 to 12 locos of six species of the genus *Brachyplatystoma* *B. capapretum* (black piraíba), *B. vaillantii* (piramutaba), *B. rousseauxii* (dourada) *B. platynemum* (Babão), *B. tigrinum* (dourada zebra ) and *B. juruense* (Flamengo). The microsatellite markers obtained will contribute to future genetic studies of natural populations of *B. filamentosum* and will be available for other species of the genus *Brachyplatystoma*. Ten microsatellite loci were used for population genetic analyzes of 178 individuals of *B. filamentosum* sampled in six regions of the Amazon basin, representatives of three different types of water. A total of 80 alleles was obtained with average of 8 alleles, the average of heterozygosity observed and expected from 0.548 to 0.598 per locus. The results of AMOVA showed moderate genetic flow between locations and significant values of  $F_{ST}$ . It is not possible accept the null hypothesis of panmixia, from single stock for the species, because the analyzes indicate structure between some locations, especially between Araguaia River with Branco River ( $F_{ST} = 0.113$ ) and Negro River ( $F_{ST} = 0.219$ ). The Negro River also presented the Madeira River ( $F_{ST} = 0.101$ ). The  $N_m$  values were also below 4 between these locations. Thus, it is suggested that *B. filamentosum* be considered as a single genetic stock, especially in Negro River, Araguaia River and Branco River. However, it is not possible to say that this segregation is fully associated with the type of water.

## Lista de Figuras

Figura 1- Produção pesqueira das três principais espécies de peixe liso no Brasil, entre 2000 e 2010. (MMA, 2000; Id., 2001; Id., 2002; Id., 2003; Id., 2004; Id., 2005; Id., 2006; Id., 2007; MPA, 2008; MPA, 2010) .....	18
Figura 2- <i>Brachyplatystoma filamentosum</i> . .....	19
Figura 3- Produção pesqueira na região fronteira de Letícia (Colômbia) e Tabatinga (Brasil) entre os anos de 1977 a 2001 (Petrere Jr. et al., 2004). .....	20
Figura 4- Dentição das mandíbulas. (A) <i>Brachyplatystoma filamentosum</i> e (B) <i>Brachyplatystoma capapretum</i> . .....	21
Figura 5- Esquema gráfico do DNA mitocondrial de peixes com a localização da região controle (com preenchimento). Fonte: modificado de Meyer (1993). .....	23
Figura 6- Frequências de <i>B. filamentosum</i> e <i>B. capapretum</i> por região, e a estimativa da frequência média de cada espécie entre as piraíbas comercializadas nos rios de águas brancas da Amazônia brasileira, reveladas pelo sequenciamento da região controle do DNA mitocondrial. ....	24
Figura 7- Mapa indicando as distribuições de frequência dos haplótipos de <i>B. filamentosum</i> em cada clado, dentro de cada região. ....	28

## Capítulo II

Figura 1- Locais de coleta de piraíbas ( <i>Brachyplatystoma cf. filamentosum</i> ) em 1- rios de água preta (São Gabriel da Cachoeira-AM) e 2- clara (Itaituba-PA). .....	52
Figura 2- Dentição de exemplares de <i>Brachyplatystoma cf. filamentosum</i> . .....	52
Figura 3- Proporção de <i>Brachyplatystoma filamentosum</i> e <i>B. capapretum</i> em São Gabriel da Cachoeira e em Itaituba, definidas após identificação molecular com o fragmento nucleotídico	

Região	controle	do	DNA	mitocondrial.
.....				54

### Capítulo III

Figura 1- A distribuição dos principais rios de águas branca, preta e clara da bacia Amazônica (Junk et al., 2011). .....	63
---	----

Figura 2- A bacia hidrográfica amazônica e os locais amostrados: 1.Belém (ESA)-PA, 2.Santa Isabel-GO, 3.São Miguel do Araguaia-GO, 4.Paranaíta-MT, 5.Itaituba-PA, 6.Guajará Mirim-RO, 7.Porto Velho-RO, 8.Boa Vista-RR e 9.São Gabriel da Cachoeira-AM.....	63
---	----

Figura 3- Resultado do STRUCTURE HARVESTER, indicando K=5, como a maior probabilidade para os dados do presente trabalho, resultado para 10 locos, Na vertical temos a média da estimativa da distribuição das probabilidades dos dados e na horizontal número de clusters testados (K) e o desvio padrão (SD) da probabilidade média .....	74
---	----

Figura 4- <i>Barplot</i> gerado pelo programa STRUCTURE 2.3.2, indicando cinco populações de <i>B. filamentosum</i> , de acordo com a análise de 10 locos microssatélites. Cada cor corresponde a um agrupamento e cada localidade é representado por uma barra vertical. As localidades estão evidenciadas no eixo X e o eixo Y representa a probabilidade de atribuição de uma localidade em cada grupo. ....	74
---	----

## Lista de Tabelas

### Capítulo I

Tabela 1- Caracterização de 13 locos microssatélites polimórficos, desenvolvidos a partir da biblioteca genômica, em 26-35 indivíduos de *Brachyplatystoma filamentosum* amostrados em Belém no Estado do Pará, Brasil. ....44

Tabla 2- Amplificação interespecífica de 16 locos microssatélites desenvolvidos para a *Brachyplatystoma filamentosum* .....45

### Capítulo II

Tabela 1- Número de amostras identificadas como sendo de *B. filamentosum* e *B. capapretum* para cada região e seus respectivos locais de coleta.....53

### Capítulo III

Tabela 1- Regiões, seus respectivos locais de coleta, localizações político-geográficas e classificação por tipo de água. ....64

Tabela 2 - Locos microssatélites utilizados nas análises populacionais de *Brachyplatystoma filamentosum* amostrada em 6 regiões com diferentes tipos de água da Amazônia brasileira. ..65

Tabela 3- Sistemas Multiplex utilizado para a genotipagem dos indivíduos de *Brachyplatystoma filamentosum* amostrados nas 6 regiões da Bacia Amazônica, desenvolvidos a partir da combinação do tamanho dos alelos (pb) e das fluorescências FAM, HEX e NED. ....66

Tabela 4 – Heterozigosidade esperada e observada, polimorfismo Informativo (PIC) e o índice de Endogamia ( $F_{IS}$ ) obtidos para cada um dos 10 locos microssatélites em 178 indivíduos de *Brachyplatystoma filamentosum*, amostrados em seis localidades. As médias para cada um desses índices também são apresentados. ....68

Tabela 5 - Alelos exclusivos (em pb) e suas frequências (valores entre parênteses) observados em nove locos microssatélites de *Brachyplatystoma filamentosum* nas 6 regiões amostradas. .69

Tabela 6- Índices de diversidade genética obtidos em dez locos microssatélites de *Brachyplatystoma filamentosum* amostrada em seis regiões da Bacia Amazônica com diferentes tipos de água. N – Número de indivíduos analisados em cada região; A – Número de alelos;  $H_O$  - Heterozigosidade observada;  $H_E$  - Heterozigosidade esperada;  $F_{IS}$  – Coeficiente de endogamia;  $HWE$  – Probabilidade do teste de Equilíbrio de Hardy Weinberg. ....70

Tabela 7- Índice genético de *B. filamentosum* nas seis regiões da Bacia Amazônica, utilizando 10 locos microssatélites. Número total de alelos (AT), média do número de alelos por loco ou riqueza alélica (AR), diversidade genética média, média da heterosigozidade total observada ( $H_o$ ) e esperada ( $H_e$ ) e o coeficiente de endogamia ( $FIS$ ).....71

Tabela 8 – Fluxo gênico com NM = número de migrantes (valores acima da linha diagonal) e  $F_{ST}$  par-a-par (valores abaixo da linha diagonal), estimado entre as seis regiões em que *B. filamentosum* são amostradas, com dez locos microssatélites. ....73

Tabela 9 – Análise de variância molecular (AMOVA) em *Brachyplatystoma filamentosum*, a partir de distância euclidiana estimada com os valores de  $F_{ST}$ , utilizando dez locos microssatélites, nas seis regiões distribuídas na Bacia Amazônica. ....73

## Sumário

1. INTRODUÇÃO.....	16
1.1 A pesca na Amazônia .....	16
1.2 Os grandes bagres e sua importância comercial .....	17
1.3 A piraíba .....	18
1.3.1. Classificação taxonômica da piraíba .....	19
1.4 Genética: o uso de marcadores moleculares.....	22
1.4.1 O DNA mitocondrial e a Região Controle .....	22
1.4.2 Marcadores moleculares microssatélites .....	24
1.5 Aplicação de SSR em espécies de peixes amazônicos .....	25
2. OBJETIVOS:.....	29
2.1 Objetivo geral .....	29
2.2 Objetivos específicos .....	29
3. BIBLIOGRAFIA .....	30
CAPÍTULO I - Isolamento e caracterização de marcadores microssatélites para <i>Brachyplatystoma filamentosum</i> (Siluriformes: Pimelodidae) e amplificação heteróloga no gênero <i>Brachyplatystoma</i> .....	38
Resumo .....	39
1. INTRODUÇÃO.....	39
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	40
2.1 Coleta do material biológico.....	40
2.2 Isolamento e Caracterização de locos microssatélites.....	41
3. REULTADOS .....	43
4. BIBLIOGRAFIA .....	46
CAPÍTULO II - Estimativa da divergência genética das piraíbas <i>Brachyplatystoma filamentosum</i> (Lichtenstein, 1819) e <i>Brachyplatystoma capapretum</i> (Lundberg e Akama, 2005) (Siluriformes: Pimelodidae) em ambiente de água preta (São Gabriel da Cachoeira-AM, rio Negro) e de água clara (Itaituba-PA, rio Tapajós).....	49
Resumo .....	50
1. INTRODUÇÃO.....	50
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	52
2.1 Coleta do material biológico e extração do DNA mitocondrial .....	52
2.2 Identificação e alinhamento das sequências nucleotídicas .....	53
3. RESULTADOS .....	53
3. DISCUSSÃO .....	54
5. BIBLIOGRAFIA .....	56
CAPÍTULO III - Estrutura populacional do bagre <i>Brachyplatystoma filamentosum</i> (Siluriformes: Pimelodidae), capturado comercialmente na amazônia brasileira, inferida por locos microssatélites .....	58

Resumo .....	59
1. INTRODUÇÃO.....	59
2 . MATERIAL E MÉTODOS.....	62
2.1 Coleta do material biológico.....	62
2.2 A extração de DNA dos exemplares de <i>Brachyplatystoma filamentosum</i> .....	64
2.3 Amplificação e genotipagem das amostras de DNA de <i>Brachyplatystoma filamentosum</i> .....	64
2.4 Estimativa do tamanho dos alelos, tratamento e montagem do banco de dados de genotipagem. ....	66
2.5 Análises estatísticas e estrutura populacional.....	67
3.RESULTADOS .....	68
3.1 Diversidade genética em <i>Brachyplatystoma filamentosum</i> com o uso de marcadores moleculares microssatélites .....	68
3.2 Análise da distribuição da diversidade genética (AMOVA) em <i>Brachyplatystoma filamentosum</i> .....	71
4.DISSCUSSÃO .....	75
5. CONCLUSÕES GERAIS .....	78
6. BIBLIOGRAFIA .....	79

## 1. INTRODUÇÃO

A região Amazônica é privilegiada pela sua abundância em água doce, com 20% em todo mundo (Piedade, 2012). Um dos aspectos mais marcantes da bacia amazônica é a elevada riqueza da ictiofauna, incluindo cerca de 3 mil espécies de variados tamanhos, formas e cores. Os peixes se apresentam como os vertebrados mais diversificados e os de maior variação genética conhecida (Lewinsohn e Prado, 2002). Acredita-se que alguns fatores geológicos referentes a formação da bacia amazônica, podem contribuir para explicar essa diversidade de peixes amazônicos (Lundberg *et al.*, 1998).

O rio Amazonas é o maior do mundo, totalizando 7 mil quilômetros (km) de extensão e 20 km de largura na altura de Manaus. Há evidências, com base em fósseis de peixes, que há 2,5 milhões de anos o rio Amazonas corria para oeste e desaguava em uma área hoje árida do Caribe (Hoorn *et al.*, 2010). Sacek (2014) apresenta uma nova explicação para a formação do rio e da bacia Amazônica, sugerindo que suas águas já fluíam para leste há cerca de 10 milhões de anos. Para entender essa hipótese, é necessário entender a evolução da paisagem na região no início do período geológico conhecido como Mioceno.

Há 24 milhões de anos, as nascentes dos rios do norte da América do Sul não ficavam nos Andes, mas em relevos do lado oeste, dividindo as águas da região em duas bacias hidrográficas distintas. A leste do divisor de águas, os rios desciam em direção à atual foz do Amazonas e, a oeste, os rios seguiam na direção oposta, rumo as bacias aos pés dos Andes, formando lagos e pântanos, conhecido como Sistema Pebas. Devido ao soerguimento da cordilheira do Andes, a água dos lagos, a oeste, começaram a fluir para leste (Hoorn *et al.*, 2010).

Com o isolamento dos rios, a impossibilidade de pequenas espécies cruzarem os grandes canais, a constante demanda de sedimentos oriundo dos Andes, fez com que espécies tivessem que se adaptar às novas condições de espaço e na composição química das águas para sobreviverem (Lundberg *et al.*, 1998). O que pode ter extinguido certas espécies e surgido novas. As conclusões de Lundberg *et al.*, (1998), corroboram com as de Arbeláez *et al.*, (2008), ao se tratar da Amazônia colombiana, diz que em algumas áreas, as unidades geológicas e essas diferenças nos parâmetros químicos das águas, são considerados os fatores responsáveis pela diversidade de peixes.

### 1.1 A pesca na Amazônia

Embora haja uma rica diversidade de peixes, uma pequena parcela é alvo da exploração comercial pesqueira. A atividade pesqueira é tão importante, que em contexto

nacional, a pesca na bacia amazônica representa entre 20 e 25% do rendimento total da produção pesqueira, estimando 200.000 t/ano para toda a Bacia (Santos *et al.*, 2006).

A pesca na região amazônica destaca-se em relação às demais regiões brasileiras pela quantidade de pescado capturada e pela dependência da população a esta atividade, que serve como fonte de alimento, comércio, renda e lazer para grande parte da população que vive nas margens dos rios de grande e médio porte (Rossevelt *et al.*, 1991). Uma das principais características das pescarias na Amazônia é a pesca multi-específica efetuada com uma variedade de aparelhos. Entre eles a rede de cerco desde 1930, malhadeiras, desde 1960, espinhel e rede arrasto. Destes a malhadeira destaca-se como o principal aparelho na atividade pesqueira dos ribeirinhos e o segundo mais empregado na pesca comercial que abastece Manaus e Manacapuru (Petrere, 1978; Barthem *et al.*, 1997; Santos *et al.*, 2006; Batista *et al.*, 1998).

## 1.2 Os grandes bagres e sua importância comercial

Uma das riquezas ictiofaunísticas encontrada na região neotropical e principalmente, na bacia amazônica, é o grupo dos grandes bagres migradores pertencentes à Ordem dos Siluriformes, família Pimelodidae. As principais características morfológicas comuns a esses peixes são o corpo revestido por couro, por isso são também conhecidos como peixes “lisos” e a presença de barbilhões que lhes auxiliam como sensores nervosos para movimentar-se dentro do rio.

Há pelo menos 12 espécies de bagres descritas (Barthem e Goulding, 1997). Dentre essas espécies existem dois gêneros que se destacam comercialmente, as do gênero *Pseudoplatystoma*, como o surubim - *P. fasciatum* e o caparari – *P. tigrinum*, e as do gênero *Brachyplatystoma* como a piramutaba - *B. vaillantii*, a dourada - *B. rousseauxii*, a piraíba - *B. filamentosum*, o flamengo - *B. juruense*, a dourada zebra – *B. tigrinum* (Lundberg e Littmann, 2003), e a mais recente descrita piraíba negra ou filhote capapreta denominada *B. capapretum* (Lundberg e Akama, 2005).

Essas espécies ocupam toda a calha do rio Amazonas, no Brasil, além da Colômbia e Peru, realizando grandes migrações reprodutivas de até 4500 Km. Em geral, de acordo com o modelo migratório dos grandes bagres, proposto por Barthem e Goulding (1997), eles utilizam a região do estuário como área de criação, a Amazônia central como área de alimentação dos adultos e pré-adultos, as cabeceiras e os tributários como áreas de desova. A calha do rio Amazonas é via de dispersão natural das larvas em direção ao estuário e é onde os adultos encontram alimento (Ruffino, 2000).

Na calha central, a pesca dos bagres é feita com redes de emalhe e espinhel e na foz, é realizada pela indústria pesqueira, utilizando a rede de arrasto. A captura desses bagres é voltada principalmente para a exportação. Os registros de desembarque da pesca comercial é uma das principais fontes de dados para estudos de ecologia de peixes. Com eles se têm dados como tamanho, quantidade e composição do pescado. Um dos primeiros registros de desembarque de pescado na região amazônica foi em Belém, em 1972, com o controle do desembarque da piramutaba (*Brachyplatystoma vaillantii*), que é responsável por quase 90% do pescado exportado pelo estado do Amazonas (Ibama, 1999; Ruffino, 2000). Posteriormente, em 1978, foi iniciado um controle do desembarque pesqueiro em Manaus, com pescarias multiespecíficas (Petrere, 1978). E na década de 80, outros centros urbanos da Amazônia foram incorporados às estatísticas de desembarque pesqueiro (Isaac & Barthem, 1995). Com esses registros foi possível realizar as primeiras análises de captura por unidade de esforço dos principais pesqueiros da região. O Ministério da Pesca e Aquicultura (MPA) e Ministério de Meio Ambiente (MMA), realizou entre os anos de 2000 e 2010 um levantamento, em âmbito nacional, mostrando a produção pesqueira de *B. filamentosum*, *B. rousseauxii* e *B. vaillantii*, (Figura 1).

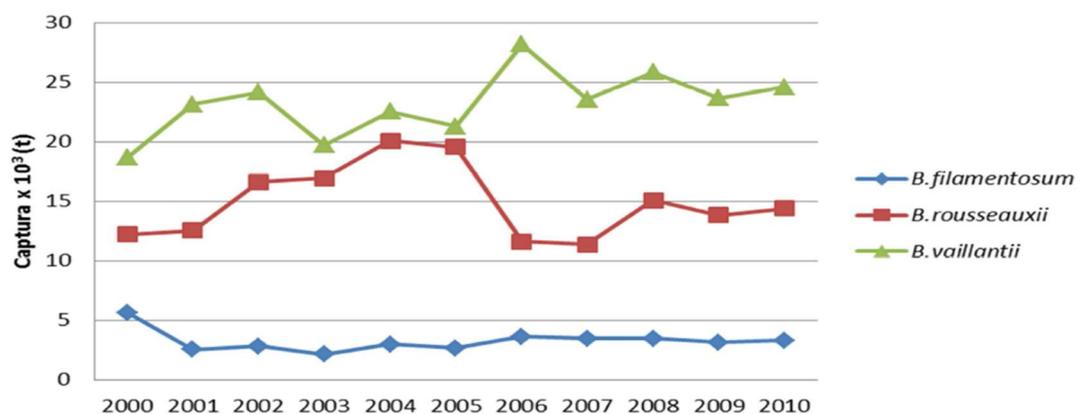


Figura 1- Produção pesqueira das três principais espécies de peixe liso no Brasil, entre 2000 e 2010. (MMA, 2000; Id., 2001; Id., 2002; Id., 2003; Id., 2004; Id., 2005; Id., 2006; Id., 2007; MPA, 2008; MPA, 2010)

### 1.3 A piraíba

O maior dentre os grandes bagres migradores da Amazônia é a piraíba - *Brachyplatystoma filamentosum* (Figura 02) - é uma das espécies de peixe que se destaca pelo seu grande valor comercial e pelo seu tamanho (Eigenmann e Eigenmann, 1890). Lundberg e Littmann (2003) registraram uma piraíba com 360 cm de comprimento total. Já o peso máximo registrado é de 200 Kg (Boujard *et al.*, 1997).

### 1.3.1. Classificação taxonômica da piraíba

A piraíba foi classificada por Lichtenstein em 1819 e a taxonomia revisada por Lundberg e Akama (2005):

Reino: Animalia

Filo: Chordata

Classe: Actinopterygii

Ordem: Siluriformes

Família: Pimelodidae

Tribo: Brachyplatystomatini

Gênero: *Brachyplatystoma*

Sub-gênero: *Malacobagrus*

Espécie: *Brachyplatystoma filamentosum*

No Brasil, os indivíduos pequenos são chamados de “Filhote”, com tamanho menor que 60 cm. Já na Colômbia, é chamada de *lechero* devido ao líquido branco com função ainda desconhecida que sai das glândulas abaixo das nadadeiras peitorais (Agudelo- Córdoba *et al.*, 2000). Essa espécie não possui um padrão claro de cor que a caracterize, apresentando dorso escuro e ventre claro (Barthem e Goulding, 1997).



Figura 2- *Brachyplatystoma filamentosum*.

Fonte: Brasil, 2014.

Atualmente, o que se sabe sobre a biologia da piraíba, geralmente, é tratado em conjunto com outras espécies de grandes bagres, principalmente se tratando de *B. capapretum*, pois é sua espécie geneticamente mais próxima e de difícil discriminação por intermédio de caracteres morfológicos. A sua distribuição compreende a bacia amazônica, desde os rios do Amapá até a cordilheira dos Andes, habitando tanto em água branca, preta e clara, como também em tributários e lagos de várzea e igapó (Barthem e Goulding, 1997).

Segundo Huergo (2009), *B. filamentosum* é mais abundante que *B. capapretum* nos rios de águas brancas da bacia amazônica, de acordo com as análises das sequências da região

controle do DNA mitocondrial, e que *B. filamentosum* provavelmente possui uma grande população estável com uma longa história evolutiva ou possui contato secundário entre linhagens diferentes (Grant e Bowen, 1998).

Dados de produção pesqueira, na região fronteiriça de Leticia (Colômbia) e Tabatinga (Brasil), entre os anos de 1977 a 2001 mostram que houve um declínio na captura de piraíbas de 4000t em 1983 para valores insignificantes até 2001 (Figura 3) indicando sobrepesca de recrutamento (Petrere *et al.*, 2004). Esses mesmos dados mostram ainda que no mesmo período também há registro de pouco dos outros peixes, logo haviam poucas presas para as piraíbas se alimentarem, levando ao seu declínio.

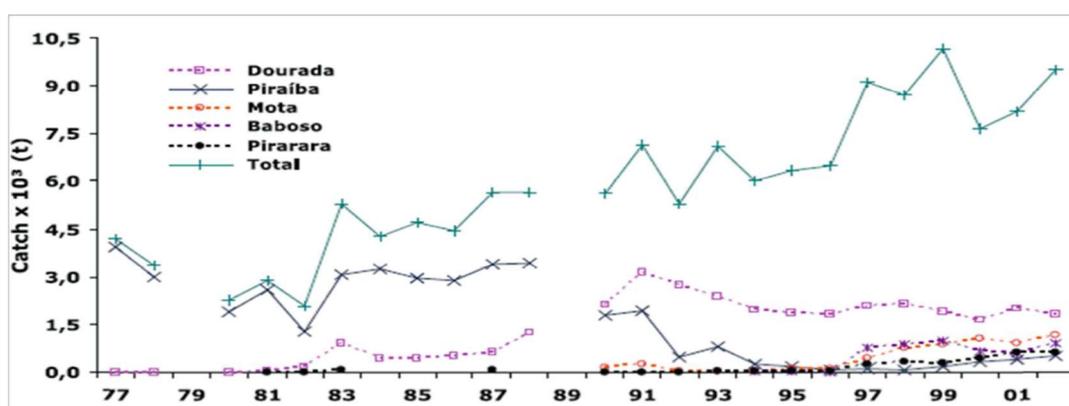


Figura 3- Produção pesqueira na região fronteiriça de Leticia (Colômbia) e Tabatinga (Brasil) entre os anos de 1977 a 2001 (Petrere Jr. *et al.*, 2004).

Embora haja muitas informações pertinentes sobre os bagres amazônicos, como registros, publicações e modelo de migração, na verdade, sobre a piraíba, ainda há muito para elucidar. Não há dados suficientes para afirmar seu estoque genético na natureza, ciclo biológico, mesmo havendo indícios de migração, quase todas as informações referentes a piraíba são em comum com a piraíba preta – *Brachyplatystoma capapretum*, por isso, o padrão migratório da piraíba ainda é desconhecido (Barthem e Goulding, 2007). A espécie *Brachyplatystoma capapretum* só foi desmembrada de *B. filamentosum*, denominada e morfologicamente diagnosticada em 2005 através de dados fornecidos pelo Projeto “Calhamazon”, realizado pelo *National Science Foundation* (Huergo, 2009). As piraíbas jovens possuem manchas arredondadas, adultos com o dorso muito escuro e nadadeira caudal pouco furcada (Lundberg e Akama, 2005), a piraíba negra possui a denteção das mandíbulas fina e densamente espaçada (Figura 04), o que resulta em problemas para a identificação de uma piraíba, além disso, normalmente, esses exemplares chegam nos desembarques pesqueiros e mercados, sem cabeça. Devido a essa difícil identificação, não é possível saber ao certo qual das duas espécies, ou se as duas, encontra-se em sobrepesca.

Do ponto de vista genético, há indícios de que a *B. filamentosum* da região amazônica, encontra-se no quadro de sobreexploração em população formada em sua maioria por indivíduos de piraíbas de água branca e que populações provenientes de rios de água preta e água clara possuem baixa variação nucleotídica, sugerindo que essas três populações de *B. filamentosum*, provenientes de três tipos de águas distintos devem ser incluídas de forma urgente na lista de espécies de peixes sobreexplorados ou ameaçados de sobreexploração do Ministério do Meio Ambiente do Brasil (Huergo, 2011).

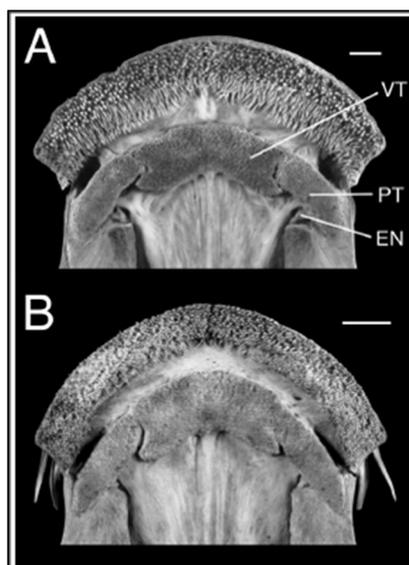


Figura 4– Dentição das mandíbulas. (A) *Brachyplatystoma filamentosum* e (B) *Brachyplatystoma capapretum*.

Embora a nomenclatura popular represente o conhecimento empírico e seja fundamental para o conhecimento dos peixes amazônicos, é muito importante saber que cada espécie biológica tem uma história natural particular com estratégias de vida próprios. Daí a necessidade de tratar cada espécie individualmente, afim de contribuir positivamente com qualquer processo de exploração pesqueira (Santos *et al.*, 2006).

Devido à crise da biodiversidade e aos estoques de piraíba na bacia amazônica encontrarem-se em sobreexploração, o manejo dos recursos pesqueiros faz-se necessário, tanto pela conservação dos sistemas aquáticos amazônicos, quanto pela manutenção de uma atividade de destacada importância socioeconômica para a população tradicional amazônica. O sucesso do manejo depende do conhecimento integrado em diferentes aspectos da biologia das espécies exploradas e das características do ambiente onde vivem (Petreire *et al.*, 2004; Santos e Jegu, 2004).

Devido à ampla distribuição geográfica e seu caráter migratório, a diversidade genética de *B. filamentosum* pode ser resultado das mudanças geológicas da bacia amazônica. Questões como a panmixia, ou se há mais de uma população para esta espécie, e mais, o

conhecimento sobre o padrão de estrutura genética para *B. filamentosum* é fundamental para a elaboração de planos de manejo pesqueiro e propostas para conservação (Waples, 1998; Vrijenhoek, 1998).

#### **1.4 Genética: o uso de marcadores moleculares**

Pode-se dizer que a genética tem sido uma ciência promissora para elucidar questões sobre o manejo da piraíba, assim como de outras espécies em risco. A biologia molecular apresenta uma ampla área de atuação. A genética da conservação tem possibilitado as estimativas de heterozigose, análise de estrutura genética populacional, ocorrência de endemismo, biodiversidade nominal, identificação e acompanhamento da dispersão de espécies invasoras (Solé-Cava, 2001).

Os avanços de técnicas de análises moleculares, possibilitam novas abordagens no estudo dos organismos. O uso de marcadores morfológicos é mais vantajoso devido ao alto nível de polimorfismo, apresentando relativa neutralidade aos efeitos fenotípicos e por serem acessados em qualquer nível de desenvolvimento do organismo (Ferreira e Grattapaglia, 1998).

##### **1.4.1 O DNA mitocondrial e a Região Controle**

O sequenciamento nucleotídico permite a analisar vários fragmentos de DNA de vários indivíduos simultaneamente (McVean *et al.*, 2002), sendo muito indicado na maioria dos estudos sobre a variabilidade genética existente em populações naturais (Schlotterer, 2004). O fragmento mais utilizado é o DNA mitocondrial – mtDNA (Avise, 2004). O genoma mitocondrial dos peixes (Figura 5) é uma molécula de DNA com formato circular, compreende 37 genes, em que, 22 codificam RNAs transportadores, 13 são codificadores de proteína e 2 codificam RNAs ribossomais (12S e 16S). Possui ainda uma região não codificante denominada região controle (Meyer, 1993).

O mtDNA, é uma ferramenta excelente e a mais utilizada para estudos de estrutura genética populacional e filogenéticos, dispersão e estudos zoogeográficos pois, possui herança quase exclusivamente materna, taxas evolutivas elevadas, se comparadas ao genoma nuclear (5 a 10 vezes mais variável), contém muitas cópias por célula e a não recombinação durante a meiose (Avise, 1986; Brown *et al.*, 1982).

A região controle ou alça D (referenciada na figura 5), é um dos fragmentos de DNA mais utilizados desse genoma em estudos populacionais.



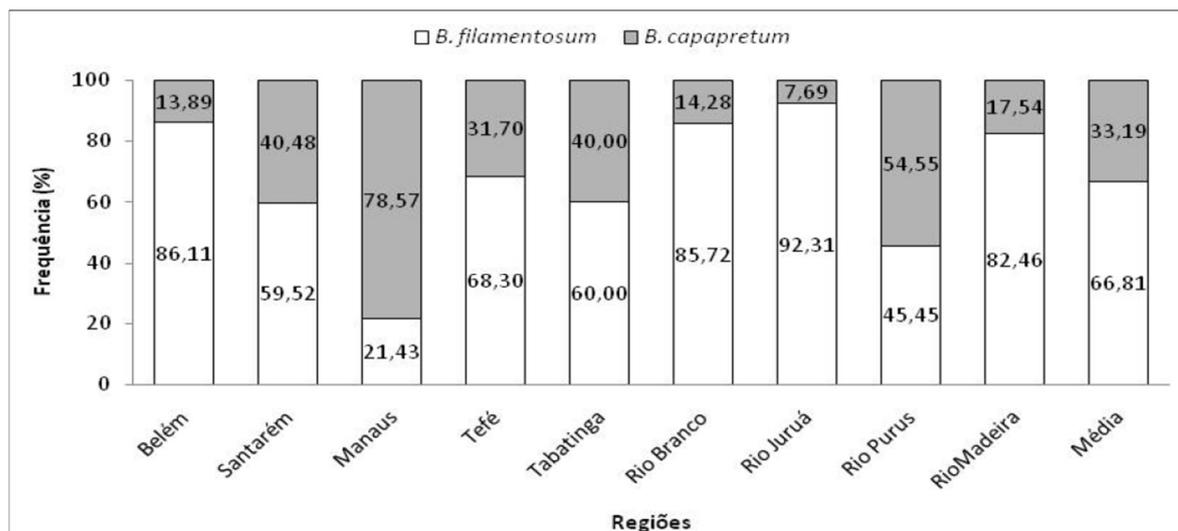


Figura 6- Frequências de *B. filamentosum* e *B. capapretum* por região, e a estimativa da frequência média de cada espécie entre as piraiabas comercializadas nos rios de águas brancas da Amazônia brasileira, reveladas pelo sequenciamento da região controle do DNA mitocondrial.

#### 1.4.2 Marcadores moleculares microssatélites

Os marcadores moleculares microssatélites ou *SSR* (*Simple Sequences Repeats*) são regiões encontradas ao longo da molécula de DNA que consiste de pequenas sequências de 1-6 nucleotídeos repetidas em *tandem* (Ferreira e Grattapaglia, 1998). São utilizado em estudos populacionais e deste a década de 90 é o mais utilizado em estudos ecológicos e genéticos (Schlotterer, 2004).

Apresenta numerosas vantagens quando comparados a outros tipos de marcadores (RFLP, RAPD, AFLP, etc.), por serem altamente polimórficos e informativos; a herança é co-dominante, onde ambos alelos de um indivíduo heterozigoto podem ser visualizados e detectados; são multialélicos; são encontrados em todo genoma dos eucariotos- em regiões codificadoras e não codificadoras; são amplificados via PCR com pouca quantidade de DNA, basicamente com DNA a 10ng/μl, mesmo sendo espécie- específicos, podem ser utilizados em estudos de outras espécies do mesmo gênero (amplificação heteróloga); não requerem radioatividade; e permitem ser analisados em sistema *multiplex*, ou seja, é possível fazer a amplificação e/ou genotipagem de mais de um loco simultaneamente (Zane *et al.*, 2002; Goldstein e Pollock, 1997).

As diversas aplicações, tais como mapeamento genético, diagnóstico de doenças, investigação forense, análise populacional, estudos ecológicos, paternidade e biologia da conservação, dependem, portanto do desenvolvimento de locos espécie-específicos para estas regiões genômicas a serem amplificadas através da PCR (Schlotterer, 2004).

Os microssatélites são classificados:

➤ De acordo com a natureza das repetições em:

- Perfeito (sem interrupções - CTCTCTCTCTCT);
- Imperfeito (com uma ou mais interrupções - CTCTCTCTACTCTCTCT);
- Compostos (repetições adjacentes de uma sequência diferente - CTCTCTATATATATC) (Weber, 1990).

➤ De acordo com o número de nucleotídeos repetidos em quatro tipos:

- Mononucleotídeos: TGCATTGAAAAAAAAAAAAAAAAACTGGATC
- Dinucleotídeos: TGCATTGTATATATATATATACTGGATC
- Trinucleotídeos: TGCATTGTGATGATGATGATGACTGGATC
- Tetranucleotídeos: TGCATTGTGACTGACTGACTGACCTGGATC

Esses marcadores podem diferir com respeito a características importantes, como: abundância genômica, nível de polimorfismo detectado e informação genética, especificidade dos locos, reprodutibilidade, requerimentos técnicos e investimentos financeiros (Buso *et al.*, 2003).

As desvantagens do uso dos marcadores microssatélites estão relacionadas ao tempo e a metodológica complexa, o alto custo para a síntese de *primers* específicos e marcados com fluorescência, para a amplificação dos locos por PCR. Além disso, é necessário contar com os possíveis erros de genotipagens causadas por algum fator durante a PCR, podem ocorrer alelos nulos, *stutters* (bandas “fantasmas”) e *dropout* (Ferreira e Grattapaglia, 1998). Mesmo havendo essas desvantagens, é possível identificar a importância dos resultados provenientes do uso dos microssatélites para ajudar no manejo e conservação de espécies ameaçadas, em trabalhos realizados nos últimos sete anos.

### 1.5 Aplicação de SSR em espécies de peixes amazônicos

Rodrigues *et al.*, 2009 desenvolveram 15 locos microssatélites para piramutaba - *B. vaillantii*, dos quais foi possível somente o uso de seis locos polimórficos para estimar a variabilidade genética da espécie no sentido norte-sul da bacia amazônica. Posteriormente, Carvalho (2015), desenvolveu mais 22 locos microssatélites para avaliar a variabilidade genética da piramutaba ao longo do rio Madeira verificando se as cachoeiras de Santo Antônio e Teotônio eram barreiras ao fluxo gênico da espécie. Constatou alta variabilidade genética para a piramutaba tanto em análises espaciais quanto em temporais, além de uma única população ( $K=1$ ).

Santos *et al.*, (2009), isolaram 14 locos de microssatélites altamente polimórficos para o Tambaqui - *Colossoma macropomum*. Afim de verificar a variabilidade genética e a forma como está distribuída ao longo da região Amazônica, os microssatélites foram utilizados pra gerar informações importantes para direcionar estratégias de manejo e conservação para a espécie. E conclui que na bacia Amazônica brasileira, o tambaqui forma uma única e grande população, suportado por um intenso fluxo gênico entre as localidades.

Para verificar se a dourada, *Brachyplatystoma rousseauxii*, constitui um único estoque genético de larga distribuição e geneticamente homogêneo, além de testar a hipótese de *homing*, Batista (2010) desenvolveu 36 locos de microssatélites para dourada, além de gerar sequencias de DNA a partir do genoma mitocondrial. Em uma matriz com 483 indivíduos de *B. rousseauxii*, utilizou oito locos polimórficos, para serem aplicados nos indivíduos provenientes de 13 localidades amostradas, que não indicaram a ocorrência de alelos nulos, *stutters* e *dropout*, e obteve 114 alelos. Os dados gerados pelos microssatélites, juntamente com os gerados pelas sequências da região controle do DNA mitocondrial, possibilitou concluir que não houve segregação genética significativa entre as 13 localidades onde indivíduos de *B. rousseauxii* foram amostrados, indicando que esta espécie compartilha de um único estoque genético. E foi descartada o comportamento de *homing*.

Para o grande bagre surubim – *Pseudoplatystoma punctifer*, Saulo-Machado *et al.*, (2010) desenvolveu 15 locos de microssatélites. Machado *et al.*, (2013), caracterizou 10 locos em 99 indivíduos de *P. punctifer*, de seis localidades, de duas sub-bacias da bacia amazônica. Além de incorporar em seu trabalho, análises de sequencias do gene COI do DNA mitocondrial. O objetivo do trabalho foi verificar se *P. punctifer* constituiu uma população panmítica ou se existia algum tipo de segregação genética que pudesse ser relacionada com as cachoeiras do rio Madeira. Propôs-se com este trabalho, um modelo de migração de machos e a ocorrência de dois estoques pesqueiros, um em cada sub-bacia.

Orrego (2012) utilizou seis locos heterólogos de microssatélites de *Brachyplatystoma rousseauxii* para o Babão - *Brachyplatystoma platynemum*, além de sequências de DNA de dois genes do DNA mitocondrial (região controle e o gene citocromo *b*). Foram analisados 169 indivíduos para os seis locos, 216 para a região controle e 140 para o gene citocromo *b*. Concluindo haver altos níveis de diversidade haplotípica e a existência de pelo menos duas populações de *B. platynemum* (rio Madeira e os demais pontos) sendo consideradas como unidades independentes na elaboração de medidas de manejo e conservação para que se possa manter o tamanho e a variabilidade genética das populações naturais. A estrutura observada não constituiu suficientemente para evidenciar o comportamento de *homing*.

Para a Piraíba negra - *Brachyplatystoma capapretum*, Lira-Cordeiro *et al.*, (2013) isolaram e caracterizaram 24 locos de microssatélites, com o objetivo de estimar a variabilidade genética de *B. capapretum*. Utilizou também sequências de DNA da região controle do genoma mitocondrial. Concluiu que há uma hipótese de panmixia nas populações de *B. capapretum*, e fortes tendências ao fluxo gênico entre as localidades.

Além desses descritos acima, foram desenvolvidos locos de microssatélites para várias outras espécies de peixes amazônicos. Dentre elas: 14 locos para o pirarucu (*Arapaima gigas*) (Farias *et al.*, 2003), sete locos para o peixe borboleta (*Carnegiella marthae*) (Beheregaray *et al.*, 2006), 17 para a pescada amarela (*Cynoscion acoupa*) (Farias *et al.*, 2006) ; 13 para o acará-disco (*Symphysodon discus*) (Amado *et al.*, 2008), 19 para o aruanã (*Osteoglossum bicirrhosum*) (Silva *et al.*, 2009), 13 para o acara-açu (*Astronotus crassipinis*) (Sousa *et al.*, 2009), 10 para o tucunaré (*Cichla piquiti*) (Carvalho *et al.*, 2009) e 12 para uma outra espécie de tucunaré (*Cichla monoculus*) (Lima *et al.*, 2010), 16 para o jaraqui (*Semaprochilodus insignis*) (Passos *et al.*, 2010); 11 para a piranha (*Pygocentrus nattereri*) (Nascimento *et al.*, 2012) e 31 para o matrinxã (*Brycon amazonicus*) (*Molecular Ecology Resources Primer Development Consortium et al.*, 2012).

Huergo (2009) verificou, através dos resultados do sequenciamento da região controle do DNA mitocondrial, a presença de três clados de *B. filamentosum* provenientes de nove regiões da bacia amazônica, representantes dos diferentes tipos de água, sugerindo que esses três grupos podem estar associados ao tipo de cor de água de onde ocorrem, sendo necessário a utilização de outros marcadores moleculares para afirmar ou refutar a hipótese de segregação genética associada ao tipo de água (Figura 7).

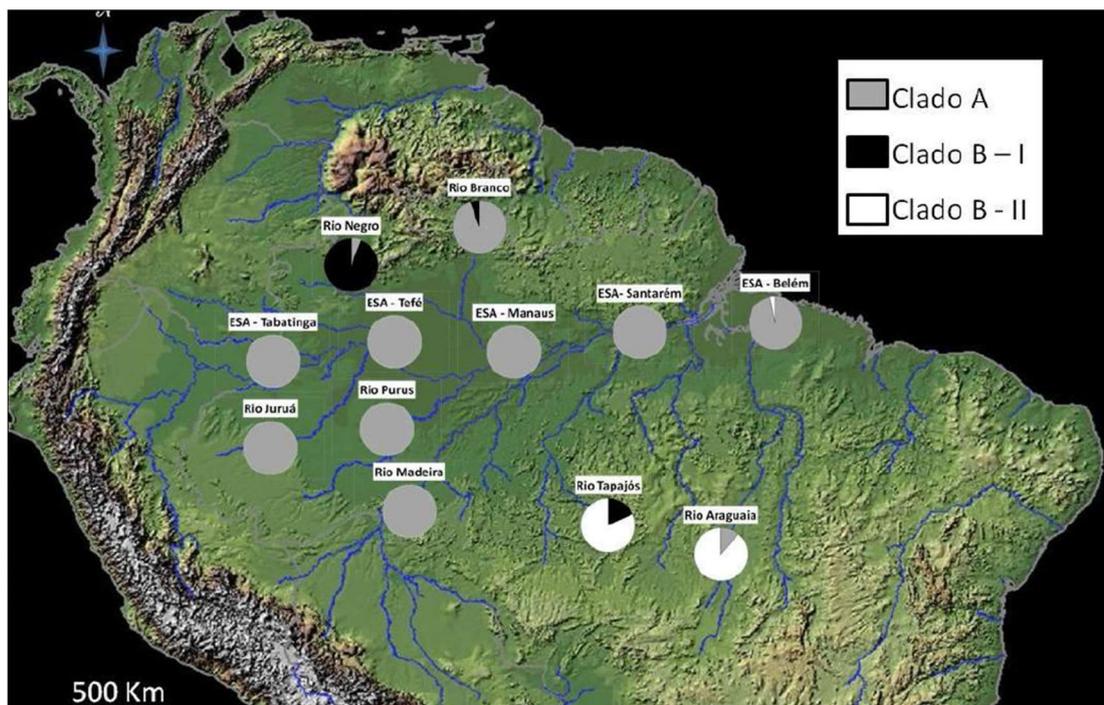


Figura 7- Mapa indicando as distribuições de frequência dos haplótipos de *B. filamentosum* em cada clado, dentro de cada região.

O maior valor de divergência genética encontrado entre os clados de *B. filamentosum* foi de 2,9% entre o clado A e B- II foi menor que a divergência encontrada entre *B. filamentosum* e *B. capapretum* de 10 % (Huergo *et al.*, 2011), porém dentro do gênero *Pseudoplatystoma*, para *P. tigrinum* e *P. reticulatum*, essa divergência foi mínima de 4,9%, o suficiente para distinguir uma espécie da outra (Torrico, 2009). Huergo sugere que, para a confirmação da existência de duas novas espécies de *Brachyplatystoma* correspondentes aos clados B-I e B-II, é necessário o uso de outras ferramentas de estudo.

Neste contexto, devido a necessidade de obter informações mais precisas sobre a piraíba e conseqüentemente gerar meios para o manejo e conservação desta espécie em sobrepesca (Petrere *et al.*, 2004), pretende-se com este trabalho, disponibilizar marcadores moleculares microssatélites para melhor identificar e caracterizar estoques pesqueiros da piraíba (*B. filamentosum*) na Amazônia, com as seguintes hipóteses formuladas:

H<sub>0</sub>: *B. filamentosum* não apresenta segregação.

H<sub>1</sub>: *B. filamentosum* apresenta estrutura populacional, podendo compor mais de que um estoque genético.

H<sub>2</sub>: *B. filamentosum* apresenta estrutura populacional, podendo compor mais de que um estoque genético associado ao tipo de água, testando assim a hipótese de Huergo (2009).

## 2. OBJETIVOS:

### 2.1 Objetivo geral

Isolar e caracterizar marcadores moleculares microssatélites para piraíba (*Brachyplatystoma filamentosum*) e aplica-los a fim de verificar se esta espécie compõem um único estoque genético.

### 2.2 Objetivos específicos

- Construir e caracterizar uma biblioteca genômica enriquecida com regiões de microssatélites para a *Brachyplatystoma filamentosum*;
- Amplificar os clones obtidos na bibliotecas genômica;
- Purificar e Sequenciar os clones amplificados que possuem insertos (DNA da espécie em questão);
- Desenhar *primers* a partir das sequencias nucleotídicas dos clones que possuem regiões com microssatélites;
- Caracterizar os locos polimórficos em uma determinada população da espécie;
- Realizar a amplificação heteróloga dos locos polimórficos obtidos em cada espécie do mesmo gênero;
- Utilizar no mínimo 10 locos para verificar se a piraíba compõe um único estoque pesqueiro na Amazônia brasileira;
- Verificar se há segregação genética em *Brachyplatystoma filamentosum*, e se esta estrutura é associada ao tipo de água onde ocorre.

### 3. BIBLIOGRAFIA

AGUDELO-CÓRDOBA, E.; Y. SALINAS-COY; C. L, SÁNCHEZ; MUÑOZ-SOSA, D. L.; ALONSO-GONZÁLEZ, J. C.; ARTEAGA-DÍAZ, M. E. A; RODRÍGUES-PIETRO, O. J. R.; ANZOLA-POTES, N. R.; ACOSTA-MUÑOZ, L. E.; NÚÑES-AVELLANEDA, M.; VALDÉS- CARRILLO, H. 2000, *Bagres de la amazonía colombiana: Un Recurso sin Fronteras*, Instituto Amazónico de Investigaciones Científicas-SINCHI, Bogota, Colombia, 253 p.

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

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

ARBELÁEZ, F.; DUIVENVOORDEN, J. F.; MALDONADO-OCAMPO, J. A. 2008. Geological differentiation explains diversity and composition of fish communities in upland streams in the southern Amazon of Colombia. *JOURNAL OF TROPICAL ECOLOGY*, 24: 505-515.

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

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

BARTHEM, R. B. & GOULDING, M. 1997. Os bagres balizadores: Ecologia, Migração e Conservação de peixes amazônicos, Sociedade Civil Mamirauá; CNPq Brasília, 140p.

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

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

- Doutorado. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia. Manaus, Amazonas, Brasil, p, 148.
- BATISTA, V.; INHAMUNS, A.J.; FREITAS, C.E.C.; FREIRE-BRASIL, D. 1998. Characterization of the fishery in riverine communities in the Low-Solimões/ High-Amazon region, *Fisheries Management and Ecology*, 5:419-435.
- BEHEREGARAY, L.B.; PIGGOTT, M.; CHAO, N.L.; CACCONE, A. 2006. *Development and characterization of microsatellite markers for the Amazonian blackwing hatchetfish, (Carnegiella marthae) (Teleostei, Gasteropelecidae)*, *Molecular Ecology Notes*, p. 787-788.
- BOUJARD, T.; PASCAL, M.; MEUNIER, J. F.; LE BAIL, P. Y. 1997. Poissons de Guyane, Guide Écologique de L'approuague et de la Réserve des Nourages, Institut National de La Recherche Agronomique, Paris, 219 p.
- BROWN, W.M.; PRAGER, E.M.; WANG, A.; WILSON, A.C. 1982. Mitochondrial DNA sequences of primates: Tempo and mode of evolution, *Journal of Molecular Evolution*, 18: 15.
- BUSO, G. S. C.; CIAMPI, A. Y. MORETZOHON, M. C; AMARAL, Z. P. S.; BRONDANI, R. V. Marcadores microssatélites em espécies vegetais – desenvolvimento e caracterização de marcadores microssatélites em espécies vegetais tropicais. *Biotechnology ciência e desenvolvimento*. Brasília, n, 30, p.46-50,2003.
- CARVALHO, D. C.; OLIVEIRA, A. A.; SAMPAIO, I.; BEHEREGARAY, L. 2009. *Microsatellite markers for the Amazon peacock bass (Cichla piquiti)*, *Molecular Ecology Resources*, n, 9, p, 239–241.
- CARVALHO, K. C. G. Marcadores de DNA microssatélites e estimativa da variabilidade genética da piramutaba (*Brachyplatystoma vaillantii*) no rio Madeira-AM no contexto da construção de hidrelétricas. 2015, 71f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia) Universidade Estadual do Amazonas.
- EIGENMANN, C. H.; EIGENMANN, R.S. 1890. A revision of South American Nematognathi or catfishes. *Occasional Papers of the California Academy of Sciences*, 1:1-8.
- FARIAS, I.P.; HRBEK, T.; BRINKMANN, H.; SAMPAIO; MEYER, A. 2003. *Characterization and isolation of DNA microsatellite primers for Arapaima gigas, an*

*economically important but severely over-exploited fish species of the Amazon basin, Molecular ecology notes. p. 128-130.*

FARIAS, I.P.; MUNIZ, L.B.; ASTOLFI-FILHO, S.; SAMPAIO, I. 2006. *Isolation and characterization of DNA microsatellite primers for Cynoscion acoupa, the most exploited sciaenid fish along the coast of Brazil, Molecular ecology notes. p. 660-663.*

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

GRANT, W.S.; BOWEN, B. W. 1998. Shallow Population Histories in Deep Evolutionary Lineages of Marine Fishes: Insights From Sardines and Anchovies and Lessons for Conservation, *The Journal of Heredity*, 89(5): 415-426.

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

HOORN, C.; WESSELINGH, F. P.; STEEGE, H.; BERMUDEZ, M. A.; MORA, A.; SEVINK, J.; SANMARTÍN, I.; SANCHEZ-MESEGUER, A.; ANDERSON, C. L.; FIGUEIREDO, J. P.; JARAMILLO, C.; RIFF, D.; NEGRI, F. R.; HOOGHMISTRA, H.; LUNDBERG, J.; STADLER, T.; SÄRKINEN, T.; ANTONELLI, A. Amazonia through time: andean uplift, climate change, landscape evolution, and biodiversity, *Science*, v. 330, p. 927-31, 2010.

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

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

IBAMA, 1999. V Reunião do Grupo Permanente de Estudos sobre a Piramutaba. Ibama. Coleção Meio Ambiente. Série Estudos de Pesca. 26: 92 p.

ISAAC, V.J. E BARTHEM, R.B. 1995. Os recursos pesqueiros na Amazônia brasileira. Bol Mus. Para. Emílio Goeldi. série Antrop. 11:295-339.

LEWINSOHN, T.M. & PRADO, P.I. 2002. Biodiversidade brasileira: síntese do estado atual do conhecimento. Contexto. São Paulo.

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

LIRA-CORDEIRO, A. 2013 Estimativa da variabilidade genética da piraíba negra *Brachyplatystoma capapretum* (Siluriformes: Pimelodidae), por meio de marcadores mitocondriais e microssatélites, 2013, 107 f, Dissertação (Mestrado em Biotecnologia), Universidade Federal do Amazonas, Amazonas, Brasil.

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

LUNDBERG, J.G.; MARSHALL, L.G.; GUERRERO, J.; HORTON, B.; MALABARBA, M.C.; WESSELINGH, F. 1998. The Stage for Neotropical Fish Diversification: A History of Tropical South American Rivers. In: Malabarba. L.R.; Reis. R.E.; Vari. R.P.; Lucena. C.A.S.; Lucena. Z.M.S. (Eds.). Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes. Museu de Ciências e Tecnologia. PUCRS. Porto Alegre. Brazil.

LUNDBERG, J. G.; LITTMANN, M. W. 2003. Family Pimelodidae. In: Reis. R. E.; Kullander. S. O. Ferraris. C.J. (Eds). Check list of the freshwater fishes of South and Central America. Porto Alegre. EDIPUCRS. pp. 432 – 435.

MACHADO, A.S.C.; FORMIGA, K.M.; LIMA, H.O.; HRBEK, T.; BATISTA, J.S. 2013. O DNA do caparari (*Pseudoplatystoma tigrinum*, Siluriformes: Pimelodidae) responde: Esse peixe forma uma única população nas bacias Amazônica, Boliviana e do Orinoco? In. 65<sup>a</sup>

Reunião Anual da Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência – SBPC. Recife/Pernambuco.

MCVEAN, G.; AWADALLA, P.; FEARNHEAD, P. 2002. A Coalescent-Based Method for Detecting and Estimating Recombination from Gene Sequences. *Genetics*, 160: 1231-1241.

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

Molecular Ecology Resources Primer Development Consortium, AKSOY, S., ALMEIDA-VAL, V. M. F., AZEVEDO, V. C. R., BAUCOM, R., BAZAGA, P., BEHEREGARAY, L. B., BENNETZEN, J. L., BRASSALOTI, R. A., BURGESS, T. I., CACCONE, A., CHANG, S.-M., CIAMPI, A. Y., CIANCALEONI, S., CLÍMACO, G. T., CLOUET, C., COIMBRA, M. R. M., COUTINHO, L. L., DANTAS, H. L., DE VEGA, C., ECHODU, R., ENYARU, J., FIGUEIRA, A., FILHO, M. A. G., FOLTZ, B., FRESSIGNÉ, L., GADOMSKI, M., GAUTHIER, N., HERRERA, C. M., HYSENI, C., JORGE, E. C., KACZMARCZYK, D., KNOTT, E., KUESTER, A., LIMA, A. P. S., LIMA, M. A., LIMA, M. P., LONGO, A. L. B., LOR, G., MAGGIONI, R., MARQUES, T. S., MARTINS, A. R., MATOSO, D. A., MEDRANO, M., MENDONÇA, M. A. C., METTLER, R., NASCIMENTO, P. R. M., NEGRI, V., OLIVEIRA, K. K. C., OLIVEIRA, L. O., OVCARENKO, I., PAULA-SILVA, M. N., RAGGI, L., SANDOVAL-CASTILLO, J., SANTOS, C. H. D. A., MARTIN SCHAEFER, H., SEGELBACHER, G., SEINO, M. M., SISTROM, M., TAOLE, M. M., TESKE, P. R., TSAGKARAKOU, A., VERDADE, L. M., VILLELA, P. M. S., VINSON, C. C., WINGFIELD, B. D. AND WINGFIELD, M. J. 2013. *Permanent Genetic Resources added to Molecular Ecology Resources Database 1 October 2012–30 November 2012*. *Molecular Ecology Resources*. v. 13. p. 341–343. doi:10.1111/1755-0998.12061

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

ORREGO, L. E. O. Análise filogeográfica de *Brachyplatystoma platynemum* (Siluriformes: Pimelodidae). 2012. 89 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas (Zoologia)). Universidade Estadual Paulista. Botucatu. São Paulo.

- PASSOS, K. P.; LEÃO, A. S. A.; OLIVEIRA, D. P.; FARIAS, I. P.; HRBEK, T. 2010. *Polymorphic microsatellite markers for the overexploited Amazonian fish. *Semaprochilodus insignis* (Jardine and Schomburgk 1841). Conservation Genetics Resour. p. 231-234.*
- PETREIRE, JR. M. 1978. Pesca e esforço de pesca no estado do Amazonas. II – Locais e aparelhos de captura e estatística de desembarque. *Acta Amazônica*. 8(Supl. 2): 1-54.
- PETREIRE Jr. M.; BARTHEM, R. B.; CÓRDOBA, E. A.; GÓMEZ, B. C. 2004. *Review of the large fisheries in the upper Amazon and de stock depletion of piraíba (*Brachyplatystoma filamentosum* Lichtenstein). Reviews in Fish Biology and Fisheries. Brasil. v. 14. p. 403-414.*
- PIEIDADE, M.T.F.; JUNK, W.J.; SCHÖNGART, J.; PIEIDADE, L.R.; WITTMANN, F. 2012. Recursos Hídricos e Áreas Úmidas Amazônicas no Contexto de um Mundo Globalizado. In: Fonseca. O.J.M. & Camargo. A.A.F. (org.). *Temas Contemporâneos de Direito Ambiental*. UEA Edições. Manaus. pp. 21-30.
- ROCHA, A. A. Variabilidade genética da piramutaba- *Brachyplatystoma vaillantii* (VALENCIENNES. 1840) do rio Madeira. Monografia (Graduação em Ciências biológicas) Faculdade Estácio do Amazonas. 2015.
- RODRIGUES, F.C; FARIAS, I.P; BATISTA, J.S; ALVES-GOMES, J. Isolation and characterization of microsatellites loci for “piramutaba” (*Brachyplatystoma vaillantii*. Siluriformes: Pimelodidae). one of the commercially most import migratory catfishes in the Amazon Basin. *Conservation Genet Resour.* v.1. n. 1. p. 365-368. 2009.
- ROOSEVELT, C.; HOUSLEY, R. A; IMAZIO DA SILVEIRA, M.; MARANCA, S. E JOHNSON, R. "Eighth Millenium Pottery from a Prehistoric Shell Medden in the Brazilian Amazon". *Science*. n. 254. 1991. pp. 1621-1624.
- RUFFINO, M. L. 2000. Manejo dos Recursos pesqueiros no Médio Amazonas. In: IBAMA. *Recursos Pesqueiros do médio Amazonas: Biologia e Estatística Pesqueira*. Brasília. pp. 115 – 140.
- SACEK, V. Drainage reversal of the Amazon River due to the coupling of surface and lithospheric processes. *Earth and Planetary Science Letters*. v. 401. p. 301-12. 2014.
- SANTOS, G. M.; JEGU, M. 2004. Piraíba, o peixe gigante. *Ciência Hoje*. 34: 69 - 71.

SANTOS, G. M.; FERREIRA E. J. G.; ZUANON J. A. S. Peixes comerciais de Manaus. Manaus: Ibama/AM, ProVárzea, 2006. p. 144, il.: color.; 27x21cm.

SANTOS, M.D.; HRBEK, T.; FARIAS, I. Microsatellite markers for the tambaqui (*Colossoma macropomum*. Serrasalminidae. Characiformes). an economically important keystone species of the Amazon River floodplain. 2009. *Molecular Ecology Resources*.

SAULO-MACHADO, A.C.; FORMIGA, K.M.; ORTIZ, M.F.; SOUZA, A.C.B.; ALVES-GOMES, J.A.; BATISTA, J.S. Polymorphic microsatellite DNA markers for the Amazonian catfish *Pseudoplatystoma punctifer* (Siluriformes: Pimelodidae). *Conservation Genetics Resources*. 2011. V.3. n.2. p.307-310.

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

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

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

SOUSA, C; SANTOS, C; SOUSA, A; PAULA-SILVA, M; SOUZA, A; FARIAS, I; FERREIRA-NOZAWA, M; ALMEIDA-VAL, V. 2009. *Development and characterization of microsatellite markers in Astronotus crassipinis* (Heckel. 1840). *Conservation Genetics Resources*.

TORRICO, J.P.; HUBERT N.; DESMARAIS E.; DUPONCHELLE F.; NUÑEZ RODRIGUEZ, J.; MONTOYA-BURGOS, J.; GARCIA DAVILA, C.; CARVAJAL-VALLEJOS, F.M.; GRAJALES, A.A.; BONHOMME, F.; RENNO, J.F. 2009. Molecular phylogeny of the genus *Pseudoplatystoma* (Bleeker, 1862): biogeographic and evolutionary implications. *Molecular phylogenetics and evolution*, 51(3): 88-94.

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

WAPLES, R.S. 1998. Separating the wheat from the chaff: patterns of genetic differentiation in high gene flow species. *Journal Heredity*. 98: 438–450.

WEBER, J.L. 1990. Informativeness of human (dC-dA)<sub>n</sub> (dG-dT)<sub>n</sub> polymorphisms. *Genomics*. 7: 524-530.

ZANE, L.; BARGELLONI, L.; PATARNELLO, T. 2002. Strategies for microsatellite isolation: a review. 135 *Molecular Ecology* 11. 1-16.

**CAPÍTULO I - Isolamento e caracterização de marcadores microssatélites para *Brachyplatystoma filamentosum* (Siluriformes: Pimelodidae) e amplificação heteróloga no gênero *Brachyplatystoma*.**

**Isolamento e caracterização de marcadores microssatélites para *Brachyplatystoma filamentosum* (Siluriformes: Pimelodidae) e amplificação heteróloga no gênero *Brachyplatystoma*.**

BRASIL, L. M. N.<sup>1,2</sup>; FORMIGA, K. M.<sup>2</sup>; BATISTA, J. S.<sup>1,2</sup>

*1-Programa de Pós-Graduação em Ciências Pesqueiras nos Trópicos, Universidade Federal do Amazonas, Brasil, Manaus.*

*2-Laboratório Temático de Biologia Molecular (LTBM), Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Brasil, Manaus.*

### **Resumo**

A piraíba - *Brachyplatystoma filamentosum*, é o maior bagre amazônico. Dados recentes gerados a partir da região controle do DNA mitocondrial revelam indícios de que a população de piraíbas de água branca da região amazônica, encontra-se no quadro de sobreexploração. Dezesete locos microssatélites foram isolados e caracterizados para *B. filamentosum*. O número de alelos por loco variou de 1 a 15, com média de 6,00. Dentre os locos polimórficos os valores da heterozigosidade observada ( $H_O$ ) e esperada ( $H_E$ ) variaram de 0,100 à 0,875 (média 0,569) e 0,136 à 0,837 (média 0,558), respectivamente. Três locos (Bf42, Bf46 e Bf61) não se mostraram em equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW). A amplificação heteróloga resultou em 3 a 12 locos, os polimórficos variaram entre 2 a 5 locos entre as seis espécies do gênero *Brachyplatystoma*. Estes locos microssatélites irão contribuir para futuros estudos genéticos de populações naturais de *B. filamentosum* e estarão disponíveis para outras espécies do gênero *Brachyplatystoma*.

**Palavras-Chave:** Piraíba. Microssatélites. *Brachyplatystoma filamentosum*. Amplificação heteróloga.

### **1. INTRODUÇÃO**

A piraíba, *Brachyplatystoma filamentosum*, ou piraíba branca, é o maior peixe dentre os bagres da região amazônica. Com tamanho máximo registrado 360 cm e o peso máximo de 200 Kg. (Lundberg e Littmann 2003; Boujard *et al.*, 1997). Embora não se possa confirmar com exatidão seu percurso migratório, em geral seu ciclo é considerado como a das outras espécies migradoras tais como a dourada e a piramutaba (Barthem e Goulding, 1997). As informações referentes a biologia da piraíba, são poucas e as que existem são em comum com a *B. capapretum* (Lundberg e Akama, 2005). O que se sabe é que há indícios de

sobreexploração (Petreire *et al.*, 2004) para o estoque de alguma dessas espécies, restando saber se as duas estão no mesmo quadro. Sua distribuição abrange quase toda a bacia amazônica, podendo ser encontrada em rios de águas brancas, pretas e claras, mas é muito mais comum nas águas brancas. Economicamente, tem alta cotação de preço no mercado e é muito consumida no baixo Amazonas (Santos *et al.*, 2006).

Huergo *et al.*, (2011) com o objetivo de mostrar a proporção absoluta capturada pela pesca das duas espécies ao identificá-las molecularmente, publicaram um trabalho com uma amostragem de 337 exemplares de piraíbas, coletadas durante os anos de 1998 a 2008 pelo Projeto “Subsídios para manejo e conservação dos grandes bagres migradores na Amazônia pela identificação e caracterização genética dos estoques pesqueiros” (PROJETO PIRADA), realizado pelo Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA). Foi analisado a sequência da região controle do DNA mitocondrial desses exemplares de piraíbas, provenientes de nove regiões da Bacia amazônica para fazer a diferenciação molecular deles. Dentre N=337, 225 eram *B. filamentosum* e 112 eram *B. capapretum*. O estudo revelou ainda a frequência dessas espécies em rios de águas brancas da Amazônia brasileira, que em média, *B. filamentosum* é mais abundante que *B. capapretum*. Com exceção da região de Manaus e rio Purus, onde a *B. capapretum* foi mais abundante.

Em sua tese, Huergo (2009), com o objetivo de analisar a estrutura genética de *B. filamentosum* capturada comercialmente em rios de águas brancas, claras e pretas da Amazônia brasileira, por meio do sequenciamento do DNA mitocondrial, utilizou as 227 amostras identificadas como *B. filamentosum* provenientes de regiões representativas de águas brancas, mais 37 exemplares de mais três regiões da Bacia Amazônica, representando água preta, o rio Negro com N=7, e água clara, o alto rio Tapajós com N=11 e rio Araguaia com N=9. Ele obteve dentre as 262 sequências da região controle do DNA mitocondrial analisadas, 154 haplótipos, dos quais 114 foram haplotipos únicos. Os padrões de compartilhamento de haplótipos indicaram uma tendência de segregação genética de *B. filamentosum* associada aos tipos de águas encontrados nos rios amazônicos.

O atual trabalho se propôs neste capítulo, isolar e caracterizar marcadores moleculares microsatélites para piraíba (*Brachyplatystoma filamentosum*) a fim de disponibilizá-lo para verificar se esta espécie compõem um único estoque genético e testar a hipótese de Huergo (2009) com um marcador codominante.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 Coleta do material biológico**

Foram obtidas amostras de tecido muscular de 35 exemplares da espécie *B. filamentosum*, em atividades de coleta na região de Belém (PA) –ESA (Eixo Solimões-Amazonas).

De cada exemplar desta espécie, foram retirados pedaços de aproximadamente 1g do tecido muscular e acondicionados em tubos eppendorfs de 1,5ml com etanol 100%. Durante a coleta, as medidas de comprimento furcal dos indivíduos foram registradas e o exemplar fotografado. As amostras coletadas foram transportadas para o Laboratório Temático de Biologia Molecular (LTBM/INPA) e depositadas na coleção de Recursos Genéticos do INPA para um posterior estudo.

## 2.2 Isolamento e Caracterização de locos microssatélites

Os marcadores microssatélites foram desenvolvidos a partir da construção de uma biblioteca genômica segundo o protocolo proposto por Billotte *et al.*, (1999). Foi utilizado DNA genômico de um indivíduo de *B. filamentosum* coletado em Belém (Pará, Brasil) (Sambrook *et al.*, 1989). O DNA foi digerido com a enzima *RsaI* (Inv+itrogen) (10 u/μl) e ligado aos adaptadores *Rsa 21* 10U/μl (5' - CTCTTGCTTACGCGTGGACTA - 3') e *Rsa25* 10U/μl (3'-TAGTCCACGCGTAAGCAAGAGCACA - 5'). Os Fragmentos contendo regiões microssatélites foram hibridizados com sondas (CT)<sub>8</sub> e (GT)<sub>8</sub>, amplificados via Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), ligados ao vetor de clonagem pGEM-T (Promega) e eletrotransformados em células competentes *XLI-Blue* de *Escherichia coli*. As células competentes foram incubadas em placa contendo X-Gal/IPTG, meio sólido Luria-Bertani (LB) e ampicilina (100 mg/ml) por 22 horas a 37°C. Os clones positivos foram selecionados e cultivados em placas ELISA contendo meio de cultura 2YT-HMFM e ampicilina (100 mg/ml). O DNA recombinante de 96 clones foi extraído (Sambrook *et al.*, 1989), amplificado com os iniciadores de T7 (*forward*) e SP6 (*reverse*), sequenciado com o Kit *Big Dye Terminator v3.1* kit (*Thermo Scientific*) e eletroinjetado em analisador automatizado *ABI 3130xl* (*Thermo Scientific*). As sequências foram alinhadas e editadas com os programas *CHROMAS 2.24* (*Technelisyum Pty Ltd*) e *BIOEDIT 7.0.9.0* (Hall, 1999).

Foram identificados 63 *contigs* contendo microssatélites, com o auxílio do programa *WEBSAT* (Martins *et al.*, 2009). Destes foram desenhados 26 pares de *primers* com o auxílio do mesmo programa e do programa *PRIMER3* (Rozen e Skaletsky, 2000). Foram considerados microssatélites do tipo dinucleotídeo aqueles com mais de seis repetições do

motivo, trinucleotídeo que tivessem um mínimo de cinco repetições e pentanucleotídeo com três ou mais repetições do motivo.

Foi adicionada uma cauda M13 na extremidade 5' de cada um dos 26 *primers forward* desenhados, para permitir a marcação por fluorescência, possibilitando a execução de um sistema *multiplex*, de acordo com o protocolo econômico descrito por Schuelke (2000).

Os *primers* adquiridos foram amplificados via PCR, seguindo os parâmetros descritos por Batista *et al.*, (2010), primeiramente em quatro exemplares de piraíbas provenientes de Belém-PA, afim de se obter a temperatura de anelamento ideal de cada par de *primer*. Após identificar o padrão de temperatura de anelamento e de genotipagem para todos os locos, os *primers* foram aplicados nos demais indivíduos de Belém-PA.

As amplificações foram feitas da seguinte forma:

Para um volume final de 10µl do amplificado foi utilizado 1µl de DNA genômico à concentração de 10 ng, 0,4 µl do *primer forward* e com cauda M13 marcado com a fluorescência (*FAM*, *HEX* e *NED*), 0,8 µl do *primer* reverso, todos os *primers* à concentração de 4µM, 2,0µl de dNTPs à 1mM, 0,7µl de MgCl<sub>2</sub> à 25mM, 1,0 µl de tampão 10X (10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, pH 8,4) e 0,2 de *goTaq* DNA Polymerase (Promega) 1U. A reação ocorreu em duas etapas: a primeira consistiu em desnaturação (68°C, 2 min; 92°C, 30s) seguida por 30 ciclos de 30s a 92°C, 35s, na temperatura de anelamento do *primer* específico (Tabela 3), 35s a 68 °C de extensão; a segunda consistiu em 20 ciclos com o seguinte tempo e perfil de temperatura: 20s a 92°C, 30s a 53°C e 30s a 72°C, e uma extensão final 15 min a 72°C e 15 min a 68°C. O produto amplificado foi analisado por eletroforese em gel de agarose 1,5%, corado com *GelRed* (*Biotium*) e visualizado em fotodocumentador UVP Biodoc (*Imaging System*).

O produto de PCR dos locos amplificados foi submetido à eletroforese capilar em Analisador automático *ABI 3130xl* (*Thermo Scientific*). Foi adicionado marcador de bandas conhecido *size ROX-labeled* (Dewoody *et al.*, 2000) em cada amostra para estimativa do tamanho e padrão dos alelos dos indivíduos genotipados.

As genotipagens foram analisadas com o auxílio do programa *GeneMarker 1.97* (*SoftGenetics*). Desconsiderando os locos que não amplificaram em nenhuma temperatura de anelamento, dezessete locos microssatélites foram caracterizados em 26 - 30 indivíduos de *B. filamentosum* provenientes de Belém- PA.

O programa *MSTOOLS* (Park, 2001) foi utilizado para calcular o conteúdo de polimorfismo informativo (PIC), heterozigosidade esperada ( $H_E$ ) e observada ( $H_O$ ); *GENEPOP 4* (Raymond, Rousset, 1995) para testar o equilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE) e

o programa *FSTAT* 2. 9.3.2 (Goudet, 2001) para as estatísticas descritivas ( $F_{IS}$ ) e desequilíbrio de ligação. A presença de alelos nulos, *dropout* e *stutters* foram checadas no *MICRO-CHECKER* (Van Oosterhout *et al.*, 2004). Os níveis de significância estatísticos foram ajustados através da correção sequencial de Bonferroni para os testes de EHW e DL (Rice, 1989).

### 3. REULTADOS

O número de alelos por loco variou entre 1 (Bf02, Bf47, Bf49 e Bf55) a 15 (Bf42), com uma média de 6,00. A heterozigosidade observada ( $H_O$ ) variou entre 0,100 a 0,971 (Bf53-Bf48, respectivamente) com uma média de 0,558, enquanto que a heterozigosidade esperada ( $H_E$ ) variou entre 0,136 a 0,837 (Bf63 e Bf40, respectivamente) com uma média de 0,569. Três locos (Bf42, Bf46 e Bf61) não apresentaram equilíbrio de Hardy-Weinberg após correção de Bonferroni (Rice, 1989) (Tabela 1). Não foi verificado desequilíbrio de ligação entre os locos, indicando que todos são geneticamente independentes. A presença de alelo nulo foi testada usando o programa *MICRO-CHECKER* v2.2.3 (Van Oosterhout *et al.*, 2004) e detectada nos locos Bf3, Bf41, Bf53 e Bf62.

O conteúdo de polimorfismo informativo (PIC) (Botstein *et al.*, 1980) variou entre 0,128 (Bf63) a 0,810 (Bf42) com uma média de 0,507. O coeficiente de endogamia-  $F_{IS}$ , variou entre -0,720 (Bf61) e 0,282 (Bf03).

Dezessete locos (4 monomórficos e 13 polimórficos) foram testados na amplificação heteróloga em seis espécies do gênero *Brachyplatystoma* (Tabela 2). Dezesesseis locos amplificaram em pelo menos uma espécie, apenas 1 loco amplificou em todas as seis espécies e apenas o loco B48 não amplificou em nenhuma espécie. Em geral, o número de alelos variou entre um a seis. O número de locos amplificados variou entre 3 em *B. juruense* e 12 em *B. rousseauxii*, o número de locos polimórficos variou entre 2 em *B. platynemum* a 5 em *B. rousseauxii*. Lira- Cordeiro *et al.*, (2013) realizaram amplificação heteróloga com marcadores desenvolvidos para *B. capapretum*, nas demais espécies do mesmo gênero, constatando que os locos amplificaram em maior número (22 locos) em *B. vaillantii*, e em menor número (12 locos) em *B. tigrinum*.

Tabela 1- Caracterização de 13 locos microsatélites polimórficos, desenvolvidos a partir da biblioteca genômica, em 26-35 indivíduos de *Brachyplatystoma filamentosum* amostrados em Belém no Estado do Pará, Brasil.

Locos SSR	Motivo de repetição	Ta (°C)	N	A	Tamanho (pb)	PIC	H <sub>O</sub>	H <sub>E</sub>	P-HWE	F <sub>IS</sub>
<b>Bf01</b>	(TG) <sub>11</sub>	65	35	5	205-2013	0,465	0,629	0,562	0.7645	-0,120
<b>Bf02</b>	(GT) <sub>5</sub>	57,6	34	1	328	0	0	0	-	-
<b>Bf03a</b>	(TG) <sub>10</sub> (CTTT) <sub>4</sub>	57,6	26	6	196-220	0,577	0,462	0,640	0.204	<b>0,282</b>
<b>Bf40</b>	(GT) <sub>13</sub> (GA) <sub>11</sub>	60	32	8	131-153	0,802	0,875	<b>0,837</b>	0.732	-0,046
<b>Bf41a</b>	(CA) <sub>6</sub>	60	28	4	234-240	0,133	0,107	0,138	0.037	0,229
<b>Bf42</b>	(CT) <sub>13</sub>	60	31	15	268-338	<b>0,810</b>	0,613	0,836	<b>0.000*</b>	0,270
<b>Bf43</b>	(GT) <sub>10</sub>	60	28	7	237-269	0,607	0,571	0,645	0.043	0,117
<b>Bf46</b>	(CT) <sub>13</sub>	61	33	4	92-102	0,643	0,875	0,709	<b>0.000*</b>	-0,238
<b>Bf47</b>	(TTC) <sub>4</sub>	60	35	1	215	0	0	0	-	-
<b>Bf48</b>	(GA) <sub>16</sub>	60	34	6	188-202	0,687	<b>0,971</b>	0,745	0.010	-0,310
<b>Bf49</b>	(CT) <sub>6</sub>	60	35	1	204	0	0	0	-	-
<b>BF53a</b>	(AC) <sub>10</sub>	60	30	4	239-255	0,205	<b>0,100</b>	0,218	0.006	0.245
<b>Bf54</b>	(TG) <sub>11</sub>	60	35	11	124-162	0,682	0,743	0,726	0.093	-0,023
<b>Bf55</b>	(AC) <sub>8</sub>	60	35	1	124	0	0	0	-	-
<b>Bf61</b>	(TG) <sub>6</sub>	60	35	2	193-209	0,373	0,857	0,504	<b>0.000*</b>	<b>-0,720</b>
<b>Bf62a</b>	(TG) <sub>9</sub>	60	35	3	313-317	0,475	0,457	0,553	0.413	0,176
<b>Bf63</b>	(CT) <sub>6</sub> (CA) <sub>8</sub>	60	35	3	258-262	<b>0,128</b>	0,143	<b>0,136</b>	1.000	-0,049

Ta= Temperatura de anelamento; N= número de indivíduos analisados; A= número de alelos; a= presença de alelo nulo; pb = pares de bases; PIC=Conteúdo de Polimorfismo Informativo; H<sub>O</sub>= Heterozigidade observada; H<sub>E</sub>=Heterozigidade esperada, P-HWE\*= locos que não se mostraram em equilíbrio Hardy-Weinberg após correção de Bonferroni. F<sub>IS</sub>=índice de endogamia.

Tabla 2- Amplificação interespecífica de 17 locos microssatélites desenvolvidos para a *Brachyplatystoma filamentosum*

Locos SSR	<i>B. tigrinum</i>		<i>B. juruense</i>		<i>B. vaillantii</i>		<i>B. platynemum</i>		<i>B. rousseauxii</i>		<i>B. capapretum</i>	
	Tamanho (pb)	A	Tamanho (pb)	A	Tamanho (pb)	A	Tamanho (pb)	A	Tamanho (pb)	A	Tamanho (pb)	A
<b>Bf1</b>	215	1	x		x		x		201-203	2	x	
<b>Bf2*</b>	x		x		326-328	2	x		328	1	328	1
<b>Bf3</b>	x		x		213-216	2	204-208	1	212	1	214	1
<b>Bf40</b>	x		x		x		x		125	1	x	
<b>Bf41</b>	x		x		x		x		234	1	x	
<b>Bf42</b>	x		x		262-286	4	x		262-302	3	x	
<b>Bf43</b>	235-237	2	x		231-239	2	x		x		269	1
<b>Bf46</b>	102	1	x		100-102	2	98-102	3	x		98-102	3
<b>Bf47*</b>	x		x		x		x		215	1	x	
<b>Bf48</b>	x		x		x		x		x		x	
<b>Bf49*</b>	210-212	2	204	1	212	1	196-204	2	x		204-214	5
<b>Bf53</b>	x		x		x		131	1	237-243	3	x	
<b>Bf54</b>	x		x		140-146	4	x		130-162	6	x	
<b>Bf55*</b>	130	1	136	1	138-144	4	132	1	124	1	122-146	2
<b>Bf61</b>	x		x		207	1	204	1	203-207	2	205	1
<b>Bf62</b>	303	1	x		305	1	x		311-315	3	295	1
<b>Bf63</b>	264-266	2	252	1	268	1	x		x		256	1

N=4 para todas as espécies; A= Número de alelos; x=não amplificou; \*= loco monomórfico para *B. filamentosum*.

Os Locos Bf02, Bf47, Bf49 e Bf55 se mostraram monomórficos para *B. filamentosum*. Quando aplicados nas outras seis espécies do gênero *Brachyplatystoma*, alguns apresentaram polimorfismo como o loco Bf02 para *B. vaillantii*; o loco Bf49 para *B. tigrinum*, *B. platynemum* e *B. capapretum*; e o loco Bf55 para *B. vaillantii* e *B. capapretum*.

A partir das amplificações heterólogas com locos microssatélites espécie específicos já desenvolvidos para as quatro principais espécies comerciais dos gêneros *Brachyplatystoma* e *Pseudoplatystoma*, temos um total de 516 locos microssatélites heterólogos que podem ser utilizados em futuros estudos de variabilidade genética, como os locos desenvolvidos para a dourada e utilizados por Orrego (2012) para amplificações em *B. platynemum*.

Os marcadores microssatélites desenvolvidos neste trabalho serão importantes ferramentas para acessar a variabilidade genética e auxiliar na elaboração de planos de manejo das populações de *B. filamentosum*, assim como para as demais espécies do gênero *Brachyplatystoma*.

#### 4. BIBLIOGRAFIA

BARTHEM, R. B. & GOULDING, M. 1997. Os bagres balizadores: Ecologia, Migração e Conservação de peixes amazônicos, Sociedade Civil Mamirauá; CNPq Brasília, 140p.

BATISTA, J.S.; FAIAS, I.P.; FORMIGA-AQUINO, K.; SOUSA, A.C.B.; ALVES-GOMES, J.A. DNA microsatellite markers for dourada (*Brachyplatystoma rousseauxii*, Siluriformes: Pimelodidae), a migratory catfish of utmost importance for fisheries in the Amazon: development, characterization and inter-specific amplification. *Conservation Genet Resour.* 2010. N. 2, p. 5-10.

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

BOTSTEIN, D.; WHITE, R.; SKOLNICK, M.; DAVIS, R. 1980. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am J Hum Genet* 32: 314-331.

BOUJARD, T.; PASCAL, M.; MEUNIER, J. F.; LE BAIL, P. Y. 1997. Poissons de Guyane, Guide Écologique de L'approuague et de la Réserve des Nourages, Institut National de La Recherche Agronomique, Paris, 219 p.

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

GOUDET, J. 2001. *FSTAT, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices (version 2,9,3)*, Available from <http://www.unil.ch/izea/software/fstat.html>, Updated from Goudet (1995).

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

HUERGO, G.P.C.M. Estimativa da diversidade genética da piraíba (*Brachyplatystoma filamentosum*, Lichtenstein 1819) e da piraíba negra (*Brachyplatystoma capapretum*, Lundberg e Akama 2005), na Amazônia Brasileira, inferidas através do DNA mitocondrial: Subsídios para Manejo e Conservação. 2009. 114 f. Tese (Doutorado em Biologia de Água

Doce e Pesca Interior), Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, Amazonas, Brasil.

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

LIRA-CORDEIRO, A. 2013 Estimativa da variabilidade genética da piraíba negra *Brachyplatystoma capapretum* (Siluriformes: Pimelodidae), por meio de marcadores mitocondriais e microssatélites, 2013, 107 f, Dissertação (Mestrado em Biotecnologia), Universidade Federal do Amazonas, Amazonas, Brasil.

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

LUNDBERG, J. G.; LITTMANN, M. W. 2003. Family Pimelodidae. In: Reis. R. E.; Kullander. S. O. Ferraris. C.J. (Eds). Check list of the freshwater fishes of South and Central America. Porto Alegre. EDIPUCRS. pp. 432 – 435.

MARTINS, W.S.; LUCAS, D.C.S.; NEVES, K.F.D.S.; BERTIOLI, D.J. 2009. WebSat - A web software for microsatellite marker development *Bioinformation* 3: 282-283.

ORREGO, L. E. O. Análise filogeográfica de *Brachyplatystoma platynemum* (Siluriformes: Pimelodidae). 2012. 89 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas (Zoologia)). Universidade Estadual Paulista. Botucatu. São Paulo.

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

PETRERE Jr. M.; BARTHEM, R. B.; CÓRDOBA, E. A.; GÓMEZ, B. C. 2004. *Review of the large fisheries in the upper Amazon and de stock depletion of piraíba (*Brachyplatystoma filamentosum* Lichtenstein)*. Reviews in Fish Biology and Fisheries. Brasil. v. 14. p. 403-414.

RAYMOND, M.; ROUSSET, F. 1995. GENEPOP (Version 1.2): Population Genetics

Software for Exact Tests and Ecumenicism. *J Hered.* 86: 248-249.

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

ROZEN, S.; SKALETSKY, H.J. 2000. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: Krawetz. S.; Misener. S.. (Eds.). *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology.* Humana Press. Totowa. NJ. pp. 465-386.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual.* Cold Springs Harbor Laboratory Press. Cold Springs Harbor. NY

SANTOS, G. M.; FERREIRA E. J. G.; ZUANON J. A. S. Peixes comerciais de Manaus. Manaus: Ibama/AM, ProVárzea, 2006. p. 144, il.: color.; 27x21cm.

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

TECHNELISYUM. 1998. Chromas 2.24. ([www.technelisyum.com.au](http://www.technelisyum.com.au)). Acesso: 14/07/2015.

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

**CAPÍTULO II - Estimativa da divergência genética das piraíbas *Brachyplatystoma filamentosum* (Lichtenstein, 1819) e *Brachyplatystoma capapretum* (Lundberg e Akama, 2005) (Siluriformes: Pimelodidae) em ambiente de água preta (São Gabriel da Cachoeira-AM, rio Negro) e de água clara (Itaituba-PA, rio Tapajós).**

**Estimativa da divergência genética das piraíbas *Brachyplatystoma filamentosum* (Lichtenstein, 1819) e *Brachyplatystoma capapretum* (Lundberg e Akama, 2005) (Siluriformes: Pimelodidae) em ambiente de água preta (São Gabriel da Cachoeira-AM, rio Negro) e de água clara (Itaituba-PA, rio Tapajós).**

BRASIL, L. M. N.<sup>1,2</sup>; BATISTA, J. S.<sup>1,2</sup>

*1-Programa de Pós-Graduação em Ciências Pesqueiras nos Trópicos, Universidade Federal do Amazonas, Brasil, Manaus.*

*2-Laboratório Temático de Biologia Molecular (LTBM), Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Brasil, Manaus.*

### **Resumo**

As duas espécies popularmente conhecidas como piraíba (*Brachyplatystoma filamentosum* e *Brachyplatystoma capapretum*) e oriundas de São Gabriel da Cachoeira – AM e Itaituba- PA, foram diferenciadas geneticamente por meio do sequenciamento da região controle do DNA mitocondrial. De um total de 71 exemplares de piraíba, 64 são *B. filamentosum* e 7 são *B. capapretum*.

**Palavras-Chave:** *Brachyplatystoma filamentosum*. *Brachyplatystoma capapretum*. DNA mitocondrial. Região controle

### **1. INTRODUÇÃO**

As piraíbas *Brachyplatystoma filamentosum*, ou piraíba, e *Brachyplatystoma capapretum*, também conhecida como piraíba negra, são dois dos grandes bagres migradores da Amazônia Brasileira. São encontrados praticamente em toda a extensão da Amazônia brasileira e colombiana, na calha principal, nos tributários e igarapés, em todos os diferentes tipos de água da Bacia Amazônica (Barthem e Goulding, 1997). Em média, *B. filamentosum* é mais abundante que *B. capapretum* em rios de águas brancas da Bacia Amazônica, com exceção em Manaus (na altura do Rio Solimões) e rio Purus, onde a predominância é de *B. capapretum* (Huergo *et al.*, 2011).

Até 2005 eram consideradas como uma única espécie, mas desde a década de 1970 já havia dúvidas sobre a existência de uma ou mais espécies chamadas de piraíba, até que *Brachyplatystoma capapretum* foi descrita com base nos caracteres osteológicos (Lundberg e

Akama, 2005). A diferença morfológica está na estrutura das mandíbulas de cada uma, dificultando a distinção em campo, pois geralmente chegam nos desembarques pesqueiros sem a cabeça, afetando todas as questões que envolve o manejo e a conservação das espécies.

Uma das grandes dificuldades para se elaborar planos de manejo é a forma como os peixes comerciais são popularmente denominados. Muitas vezes não corresponde com a espécie biológica, e pode ser associada a um conjunto de espécies diferentes, e até mesmo a gêneros distintos (Santos *et al.* 2006). Em campo é possível se deparar com situações em que o mesmo nome popular pode ser dado a duas ou mais espécies. Ou ainda, a mesma espécie é popularmente chamada de nomes diferentes em regiões variadas, tornando difícil as comparações entre os desembarques de diferentes regiões da Amazônia.

Não se pode ignorar o conhecimento empírico da nomenclatura popular, porém, é necessário que cada espécie seja tratada individualmente por terem histórias distintas de necessidades, hábitos e estratégias de vida próprios. O conhecimento tradicional aliado ao científico são fundamentais para qualquer processo de exploração pesqueira (Santos *et al.* 2006).

Diante deste contexto, fez-se necessária, neste trabalho, a diferenciação genética das espécies *Brachyplatystoma filamentosum* e *Brachyplatystoma capapretum*, das localidades de São Gabriel da Cachoeira-AM (Rio Negro) e Itaituba-PA (Rio Tapajós), pois não foi possível fazer a identificação morfológica com exatidão uma vez que alguns indivíduos estavam com os dentes gastos, outros já estavam sem cabeça nos desembarques pesqueiros inviabilizando a distinção entre as duas espécies pela arcada dentária, único caracter morfológico mais adequado. Esse resultado é importante para subsidiar políticas de conservação e manejo para as espécies uma vez que possibilita ter uma informação prévia da espécie mais abundante e da possível proporção de cada uma na pesca em cidades localizadas na margem de rios de água clara (Itaituba-PA) e preta (São Gabriel da Cachoeira-AM).

A região controle ou alça D é um dos fragmentos de DNA mais utilizados do genoma mitocondrial em estudos populacionais. Possui em torno de 1100 pares de bases (pb) em peixes e localiza-se entre as regiões codificadoras de dois RNAs transportadores (RNAt), o RNAt da prolina e o RNAt da fenilalanina. Estima-se que a sua taxa de evolução está entre 2 a 5 vezes maior comparada aos demais genes mitocondriais codificadores de proteínas (Aquadro e Greenberg, 1983).

Huergo *et al.*, (2011), utilizou as sequências da região controle do mtDNA para fazer a diferenciação genética de 337 exemplares coletados e comercializados como piraíbas oriundos dos desembarques pesqueiros de nove regiões de rios de águas brancas da Amazônia

brasileira, onde foi verificado que em 66,81% dos peixes pertenciam à espécie *B. filamentosum* e 33,19% a espécie *B. capapretum*.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Coleta do material biológico e extração do DNA mitocondrial

Foram coletados 71 exemplares de “piraíbas”, sendo 38 em São Gabriel da Cachoeira –AM no rio Negro e 33 em Itaituba-PA no rio Tapajós, ambos localizados na bacia amazônica (Figura 1). A difícil identificação morfológica, através de sua dentição, pode ser vista na figura 2.

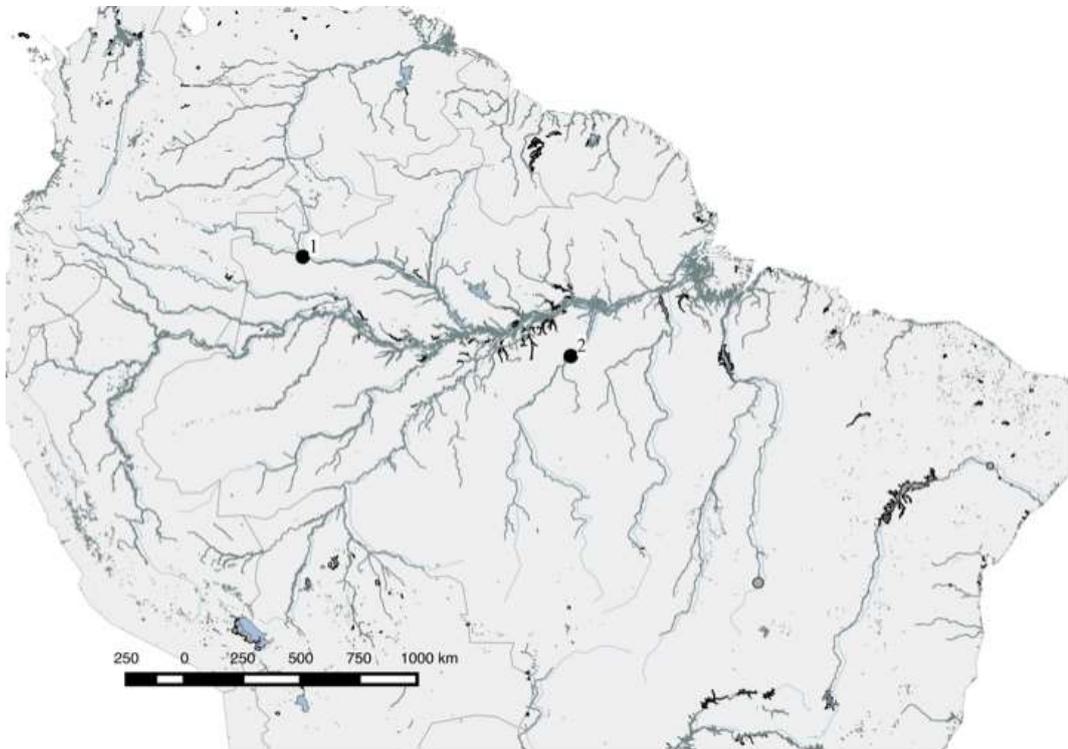


Figura 1- Locais de coleta de piraíbas (*Brachyplatystoma cf. filamentosum*) em 1- rios de água preta (São Gabriel da Cachoeira-AM) e 2- clara (Itaituba-PA).



Figura 2- Dentição de exemplares de *Brachyplatystoma cf. filamentosum*.

O DNA mitocodrial utilizado para amplificar a região controle (mtDNA), foi extraído de cada amostra de nadadeira ou tecido muscular das piraíbas, seguindo-se o protocolo de fenol/clorofórmio/álcool isoamílico, conforme descrito em (Sambrook *et al.*, 1989) e com as modificações implementadas por Batista e Alves Gomes (2006). Análise quali-quantitativa do DNA extraído foi realizada por eletroforese em gel de agarose 0,8%, corado com *GelRed* (*Biotium*) e visualizado em fotodocumentador UVP Biodoc (*Imaging System*).

A reação de amplificação e sequenciamento do fragmento nucleotídico da região controle foi realizado conforme descrito em Huergo *et al.*, (2011)

## 2.2 Identificação e alinhamento das sequências nucleotídicas

As sequências obtidas foram alinhadas, conferidas e editadas com o auxílio dos programas computacionais BioEdit 7.0.9.0 (Hall, 1999) e Chromas 2.24 (Technelisyum, 1998). Posteriormente foram comparadas com o banco de sequências de referência dos grandes bagres migradores amazônicos, mantido pelo LTBM/INPA e às sequências nucleotídicas obtidas por Huergo *et al.*, 2011.

## 3. RESULTADOS

Foram obtidos 500 pb da região controle do DNA mitocondrial para cada exemplar coletado. Após comparado ao banco de dados de referência do LTBM as às sequencias de Huergo *et al.*, 2011, foram identificadas 35 amostras de *B. filamentosum* em São Gabriel da Cachoeira e 29 em Itaituba. Das 71 amostras, sete foram geneticamente identificadas como *B. capapretum*, sendo três em São Gabriel da Cachoeira e quatro em Itaituba (Tabela 1).

Desta forma, a maior proporção encontrada nas duas localidades foi de *B. filamentosum* (Figura 3) com média de 89,99% enquanto que *B. capapretum* ocorreu em menor proporção com 10,01 %.

Tabela 1- Número de amostras identificadas como sendo de *B. filamentosum* e *B. capapretum* para cada região e seus respectivos locais de coleta.

<b>Região</b>	<b>Local</b>	<b>Estado</b>	<b>Total de amostras</b>	<b><i>B. filamentosum</i></b>	<b><i>B. capapretum</i></b>
Rio Negro	São Gabriel da Cachoeira	AM	38	35	3
Rio Tapajós	Itaituba	PA	33	29	4

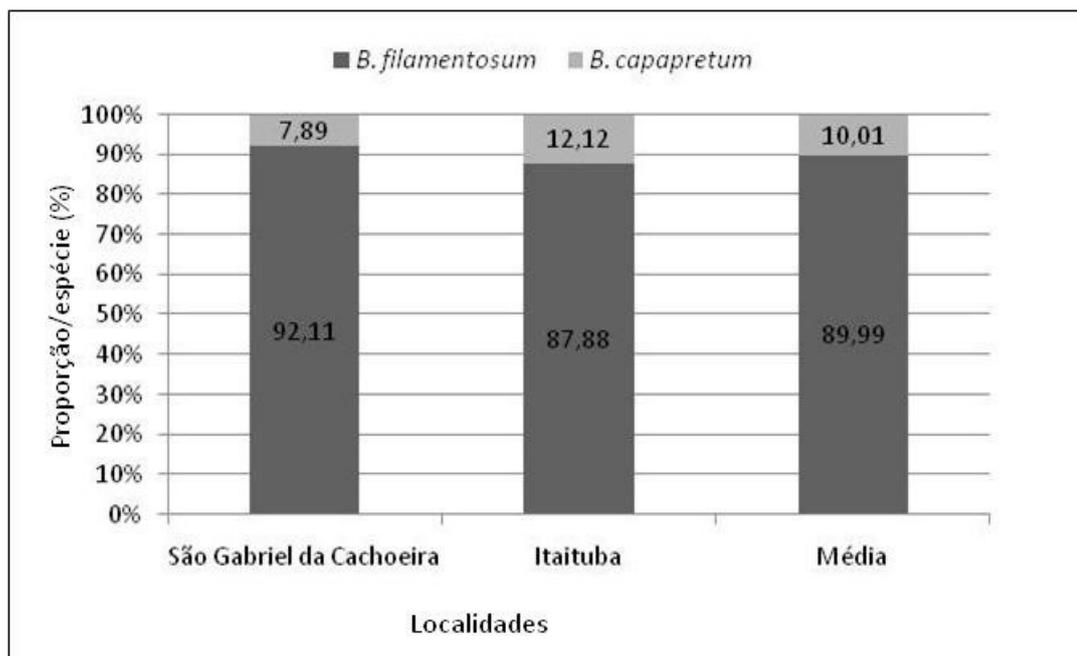


Figura 3- Proporção de *Brachyplatystoma filamentosum* e *B. capapretum* em São Gabriel da Cachoeira e em Itaituba, definidas após identificação molecular com o fragmento nucleotídico Região controle do DNA mitocondrial.

### 3. DISCUSSÃO

As frequências de *B. filamentosum* e *B. capapretum* aqui estimadas, em localidades representativas de água preta e clara, São Gabriel da Cachoeira – AM, no rio Negro e Itaituba-PA, no rio Tapajós, respectivamente, podem ser evidências ou da preferência de *B. filamentosum* por esses tipos de cor de água ou uma evidência de que o estoque de *B. capapretum* possa estar comprometido.

Segundo Petreire *et al.*, (2004), há fortes indícios de que os estoques de piraíba na bacia amazônica encontram-se em sobreexploração. A questão é que até 2005 as informações com relação a piraíbas da região amazônica, eram em comum para as duas espécies, impossibilitando afirmar qual das duas/ou se ambas, estariam nesse quadro.

Análises das sequências da região controle do DNA mitocondrial revelaram que, em média, *B. filamentosum* é mais abundante que *B. capapretum* nos rios de águas brancas da bacia amazônica (Huergo, 2009).

Lundberg e Akama (2005) sugerem que a distribuição de *B. capapretum* abrange somente rios amazônicos de água branca e acima de cota altimétrica de 200m acima do nível do mar. Embora a frequência de *B. capapretum* tenha sido menor que *B. filamentosum* nos rios de água preta e clara, está evidente a presença desta espécie nos rios Negro e Tapajós no presente estudo.

Lira-Cordeiro, (2013) estimou as porcentagens relativas à identificação molecular da composição de espécies capturadas como “piraíba”. São compostas por cerca de 52,7% por *B. filamentosum*, 39,17% por *B. capapretum* e 8,13% por outras espécies de bagres pimelodídeos (*B. rousseauxii*, *B. platynemum* e *B. vaillantii*). Huergo *et al.*, (2011), ao relatarem que das 337 amostras comercializadas e identificadas também como “piraíba”, compunham aproximadamente 33% de exemplares de *B. capapretum* comercializadas como *B. filamentosum*, entre os anos de 1998 e 2008. As frequências observadas para as duas espécies no presente estudo, corroboram a hipótese de que *B. capapretum* possui menor frequência que *B. filamentosum*, quando analisamos os três mais recentes estudos destas espécies, que este fato ocorre em localidades onde a água é preta, branca e clara.

## 5. BIBLIOGRAFIA

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

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

BARTHEM, R. B. & GOULDING, M. 1997. Os bagres balizadores: Ecologia, Migração e Conservação de peixes amazônicos, Sociedade Civil Mamirauá; CNPq Brasília, 140p.

HALL, T.A. 1999. Bio Edit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for windows 95/98/NT, *Nucl, Acids, Res.* 27: 95-98.

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

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

LIRA-CORDEIRO, A. 2013 Estimativa da variabilidade genética da piraíba negra *Brachyplatystoma capapretum* (Siluriformes: Pimelodidae), por meio de marcadores mitocondriais e microssatélites, 2013, 107 f, Dissertação (Mestrado em Biotecnologia), Universidade Federal do Amazonas, Amazonas, Brasil.

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

PETRERE Jr. M.; BARTHEM, R. B.; CÓRDOBA, E. A.; GÓMEZ, B. C. 2004. *Review of the large fisheries in the upper Amazon and de stock depletion of piraíba (Brachyplatystoma filamentosum Lichtenstein)*. Reviews in Fish Biology and Fisheries. Brasil. v. 14. p. 403-414.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Springs Harbor Laboratory Press. Cold Springs Harbor. NY.

SANTOS, G. M.; FERREIRA E. J. G.; ZUANON J. A. S. Peixes comerciais de Manaus. Manaus: Ibama/AM, ProVárzea, 2006. p. 144, il.: color.; 27x21cm.

TECHNELISYUM. 1998. Chromas 2.24. ([www.technelisyum.com.au](http://www.technelisyum.com.au)). Acesso: 14/07/2015

**CAPÍTULO III - Estrutura populacional do bagre *Brachyplatystoma filamentosum* (Siluriformes: Pimelodidae), capturado comercialmente na amazônia brasileira, inferida por locos microssatélites.**

**Estrutura populacional do bagre *Brachyplatystoma filamentosum* (Siluriformes: Pimelodidae), capturado comercialmente na amazônia brasileira, inferida por locos microssatélites.**

BRASIL, L. M. N.<sup>1,2</sup>; FORMIGA, K.M.<sup>2</sup>; MARQUES, G. M. G.<sup>2</sup>; BATISTA, J. S<sup>1,2</sup>

*1-Programa de Pós-Graduação em Ciências Pesqueiras nos Trópicos, Universidade Federal do Amazonas, Brasil, Manaus.*

*2-Laboratório Temático de Biologia Molecular (LTBM), Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Brasil, Manaus.*

## **Resumo**

Dez locos microssatélites foram utilizados para as análises de genética populacional de 178 indivíduos de *B. filamentosum* amostrados em seis regiões da bacia amazônica. Foi obtido um total de 80 alelos, com uma média de 8 alelos, média das heterozigosidades observada de 0,548 e esperada de 0,598 por loco. Os resultados obtidos revelam que o estoque de piraíba apresenta segregação genética, porém não permitem afirmar que a segregação está associada ao tipo de água onde ocorre.

**Palavras-Chave:** Piraíba. Microssatélites. Segregação genética. Água clara, branca e preta.

## **1. INTRODUÇÃO**

A Amazônia possui características distintas das demais regiões hidrográficas do Brasil, contendo, em seus 7 milhões de km<sup>2</sup>, 20% de toda água doce do mundo (Piedade *et al.*, 2012). É de fundamental importância ecológica suas, áreas úmidas que representam as principais fontes primárias para as cadeias tróficas que sustentam toda a biodiversidade de peixes da região (Goulding, 1996; Junk *et al.*, 2000). Essa diversidade pode estar relacionada com as transformações na estrutura geológicas da Bacia Amazônica (Lundberg *et al.*, 1998).

Uma das riquezas ictiofaunísticas encontrada na região neotropical e principalmente, na bacia amazônica, é o grupo dos grandes bagres migradores pertencentes à Ordem dos Siluriformes, família Pimelodidae. As principais características morfológicas comuns a esses peixes são o corpo revestido por couro, por isso são também conhecidos como peixes “lisos” e a presença de barbilhões que lhes auxiliam como sensores nervosos para movimentar-se dentro do rio.

O maior dentre os grandes bagres migradores da Amazônia é a piraíba - *Brachyplatystoma filamentosum* (Figura 2, capítulo I) - é uma das espécies de peixe que se destaca pelo seu grande valor comercial (Eigenmann e Eigenmann, 1890).

Através de análises de sequências da região controle do DNA mitocondrial de *B. filamentosum*, Huergo (2009), propôs a existência de três clados de *B. filamentosum* supostamente relacionados com os diferentes tipos de água, que por sua vez se originam em regiões geologicamente diferentes, trazendo a seguinte questão: “os três clados de *B. filamentosum* podem ser classificados como espécies distintas ou populações da mesma espécie?”.

A possibilidade de adaptação fisiológica de *B. filamentosum* aos diferentes tipos de águas é um aspecto a ser considerado para o isolamento genético de cada clado. As diferenças na composição química das águas podem servir como uma barreira ao fluxo gênico mesmo quando não há barreiras geográficas. Em águas como as do rio Negro, sendo pobres em íons e com baixo pH, os peixes necessitam de adaptações fisiológicas para manter a regulação iônica (González, 1996).

Segundo Junk *et al.*, 2011, a classificação de rios pela cor da água feita por populações pré-colombianas, foi adotada por imigrantes europeus, denominadas como Rio Claro, Rio Preto, Rio Negro, Rio Branco e Rio Verde. Essas variações de tipos de água, estão relacionadas com o padrão de diversidade de peixes, fertilidade do solo, a abundância de mosquitos ou a determinadas propriedades ecológicas.

Sioli, (1956), fez a primeira classificação científica dos tipos de água da Amazônia, utilizando fatores como a cor da água, carga sedimentar, pH e condutividade elétrica para explicar características limnológicas dos rios da Amazônia. Classificou como rios de águas brancas, o curso principal do Rio Amazonas e os rios Juruá, Japurá, Purus e Madeira. Eles se originam nos Andes, fonte principal de sedimentos ricos em nutrientes presente nesses rios. Possui um pH próximo da neutralidade e concentrações relativamente elevadas de sólidos dissolvidos, principalmente metais alcalino-terrosos e carbonatos; como rios de água preta, o rio Negro, drenando o escudo pré-cambriano da Guiana com grandes áreas de areia branca. A cor da água é transparente, pobre de matéria em suspensão, rico em ácidos húmicos, que dão à água uma cor marrom-avermelhada e pH ácido, entre 4-5; e como rios de água clara, as Bacias do Tapajós e Xingu. Suas cabeceiras estão no Cerrado do escudo do Brasil Central. As águas são transparentes e esverdeadas, com escassos sedimentos e sólidos dissolvidos e um pH que varia entre 5 e 7. O presente estudo, seguirá o padrão de cor de água citado acima.

Com distribuição em toda a Bacia Amazônica, podendo ser encontrada em todos os tipos de água descritos acima, a piraíba – *Brachyplatystoma filamentosum* é um bagre de caráter migratório reofílico, e que se destaca por seu grande porte, com registros de 360 cm de comprimento total e pelo seu valor comercial em toda a sua distribuição (Agudelo-Córdoba *et al.*, 2000; Lundberg e Littmann, 2003; Eigenmann e Eigenmann, 1890).

A partir de um ancestral comum, o gênero *Brachyplatystoma*, que já existia a oeste da bacia amazônica há cerca de 13 milhões de anos, teve sua distribuição ampliada aos rios dos escudos do Brasil e Guianas, após inúmeras mudanças na estrutura da Bacia Amazônica, como: o rompimento do arco tectônico do Purus, há oito milhões de anos, o que estabeleceu o sentido atual do rio, de oeste para leste (Lundberg, 2005; Lundberg *et al.*, 1998); além de uma transgressão marinha que isolou os rios que drenavam a cordilheira dos Andes e os escudos da Guiana e do Brasil (Hubert e Renno, 2006), podendo ter desencadeando um processo de especiação alopátrica em peixes que habitavam esses rios isolados, incluindo as populações de *B. filamentosum*, dando origem a três clados: ao clado “A” em rios da drenagem Andina, ao clado “B-I” em rios do escudo das Guianas e ao Clado “BII” em rios do escudo Brasileiro (Huergo, 2009).

Huergo também propôs outra hipótese, a de especiação peripátrica, com base na possível existência de um mega fan-delta (porções/cones parciais de sedimentos do rio em alta proporção, funcionando como um divisor de águas) (Wilkinson *et al.*, 2006), localizado entre as bacias leste e oeste da Amazônia, durante oito milhões de anos. Possivelmente esse mega fan-delta se conectava com uma das duas bacias em períodos de tempo alternados, o que pode ter favorecido a disseminação da ictiofauna entre as bacias. O que levou Huergo 2009 a sugerir que o ancestral comum aos três clados de *B. filamentosum* pode ter se estabelecido nos rios que drenavam os escudos do Brasil e Guiana utilizando essas conexões.

A divergência genética encontrada por Huergo (2009), entre os clados A e B-II de *B. filamentosum* foi de 2,9%. É um valor abaixo do encontrado entre as duas espécies de piraíba 10% (Huergo *et al.*, 2011).

Os processos de especiação sugeridas por Huergo 2009, nas águas amazônicas, juntamente com a história geológica da bacia Amazônica, sendo uma das regiões geologicamente menos conhecidas do globo (Tassinari e Macambira, 2004), deixam questões como a influência dos ambientes, lagos isolados formados em decorrência da mudanças gradativas, no processo evolutivo da biota aquática da Amazônia.

Neste contexto, o presente capítulo, se dispõe através de dados advindos dos marcadores moleculares microssatélites, verificar se *B. filamentosum* compõem um único estoque genético, e se há segregação genética associada ao tipo de água onde ocorre.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 Coleta do material biológico**

A fim de obter amostras de tecido muscular da espécie *B. filamentosum*, foram realizadas atividades de coleta em desembarques pesqueiros em algumas regiões da Amazônia brasileira, estrategicamente representando diferentes tipos de cor de água (Junk *et al.*, 2011) (Figura 1): Belém (PA) –ESA (Eixo Solimões-Amazonas), Rio Branco, em Boa Vista (RR), Rio Madeira, em Porto Velho e Guajará Mirim (RO), Rio Negro, em São Gabriel da Cachoeira (AM), Rio Tapajós, em Paranaíta (MT) e Itaituba (PA) e Rio Araguaia, em São Miguel do Araguaia e Santa Isabel (GO) (Figura 1), conforme permissão de coleta e transporte de material biológico concedida pelo IBAMA (SISBIO N° 25890). As regiões amostrada foram agrupadas conforme a classificação por tipo de cor de água da Bacia Amazônica, estão organizadas da seguinte forma:

- Água preta – São Gabriel da Cachoeira;
- Água clara – Rio Branco (RR); Rio Tapajós, no Mato Grosso e Pará; e Rio Araguaia;
- Água branca – Rio Madeira e Belém.

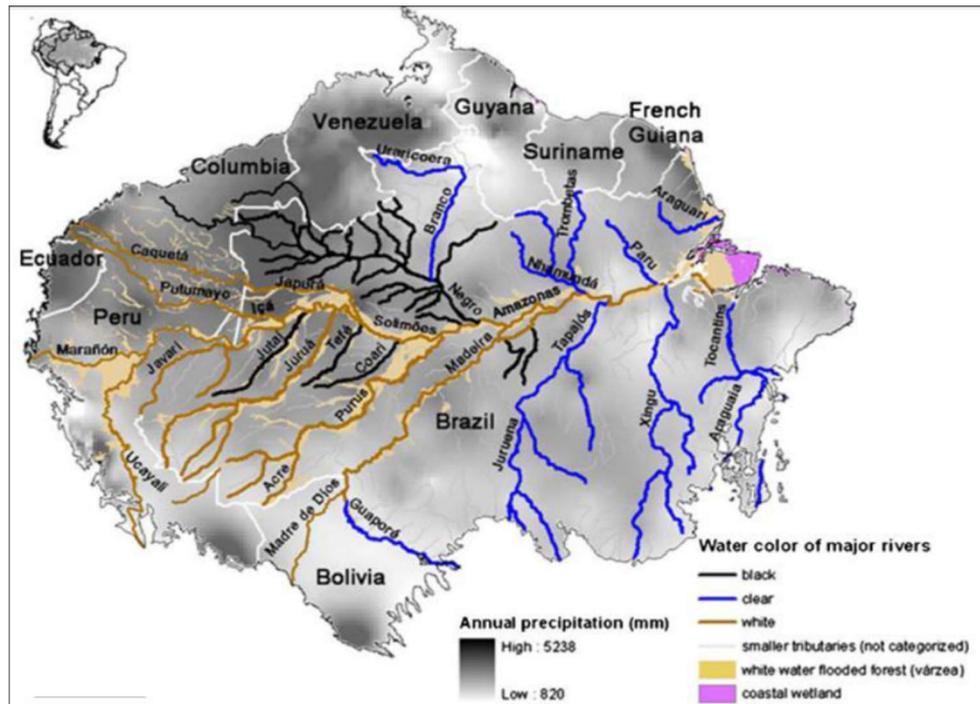


Figura 1- A distribuição dos principais rios de águas branca, preta e clara da bacia Amazônica (Junk *et al.*, 2011).

As regiões e seus respectivos locais de coleta, suas localizações político-geográficas, suas classificações por tipo de água, estão apresentadas na Tabela 1.

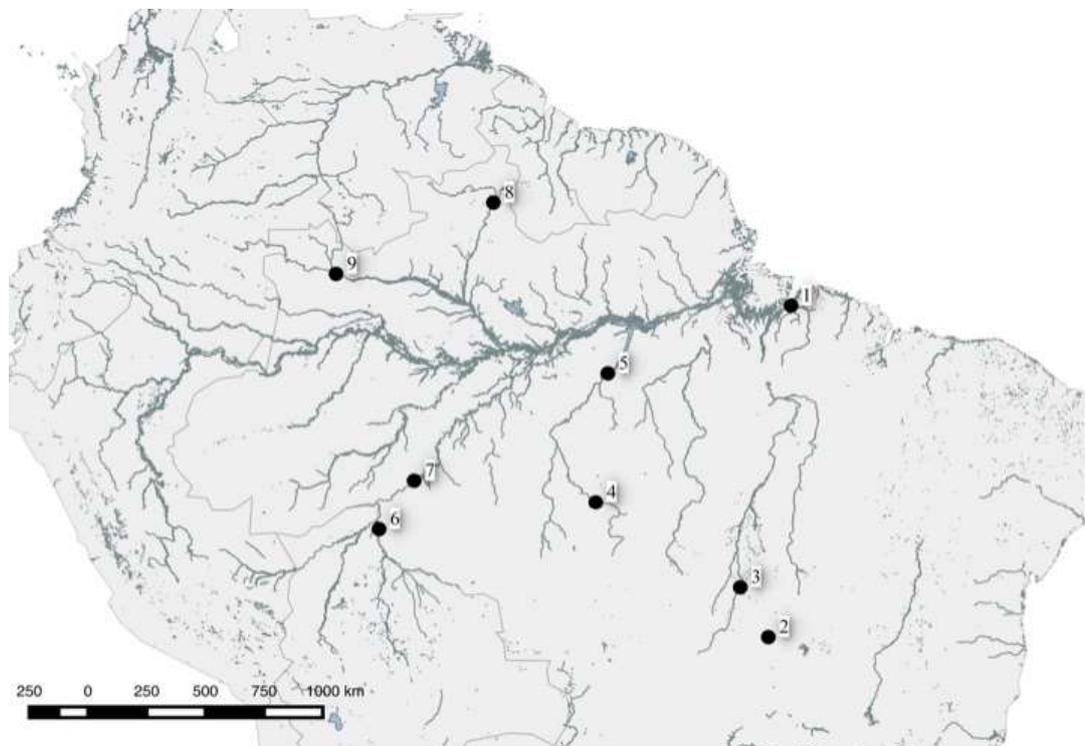


Figure 2- A bacia hidrográfica amazônica e os locais amostrados: 1.Belém (ESA)-PA, 2.Santa Isabel-GO, 3.São Miguel do Araguaia-GO, 4.Paranaitá-MT, 5.Itaituba-PA, 6.Gujará Mirim-RO, 7.Porto Velho-RO, 8.Boa Vista-RR e 9.São Gabriel da Cachoeira-AM.

Para este trabalho, o N (número de exemplares) de *B. filamentosum* foi entre 20-30 de cada região citada acima. De cada exemplar desta espécie, foi retirado pedaços de aproximadamente 1g do tecido muscular e acondicionados em tubos eppendorfs de 1,5ml com etanol 100%. Durante a coleta, as medidas de comprimento furcal dos indivíduos foram registradas e o exemplar fotografado. As amostras coletadas foram transportadas para o Laboratório Temático de Biologia Molecular (LTBM/INPA) e depositadas na coleção de Recursos Genéticos do INPA.

Tabela 1- Regiões, seus respectivos locais de coleta, localizações político-geográficas e classificação por tipo de água

Região	Localidades	Estado	Latitude/Longitude	Tipo de água	Nº de <i>B. filamentosum</i>
Belém (ESA)	Belém	PA	01°27'18,04"S/48°30'08,90"W	Branca	35
Rio Branco	Boa Vista	RR	02°50'23,75"N/60°39'43,61"W	Clara	23
Rio Madeira	Porto Velho	RO	08°45'42,85"S/63°54'06,77"W	Branca	33
	Guajará Mirim	RO	10°47'27,28"S/65°19'56,74"W	Branca	04
Rio Negro	São Gabriel da Cachoeira	AM	00°07'37,44"S/67°05'27,26"W	Preta	28
Rio Tapajós	Paranaíta	MT	09°27'12,18"S/56°29'35,33"W	Clara	10
	Itaituba	PA	4° 16' 33" S/ 55° 59' 2" W	Clara	29
Rio Araguaia	São Miguel do Araguaia	GO	13°12'45,73"S/50°34'21,84"W	Clara	09
	Santa Isabel	GO	15°17' 52"S/49°25'37"W	Clara	09
				Total	180

## 2.2 A extração de DNA dos exemplares de *Brachyplatystoma filamentosum*

O DNA total, foi extraído de cada amostra de nadadeira, tecido muscular, barbilhão ou sangue, seguindo-se o protocolo básico de fenol/clorofórmio/álcool isoamílico, conforme descrito em (Sambrook *et al.*, 1989) e com as modificações de Alves-Gomes (1998). As análise quali-quantitativa do DNA extraído foi realizada por comparação com o DNA do fago lambda, ambos visualizados em gel de agarose a 0,8 % corado com *GelRed (Biotium)* e visualizado em fotodocumentador UVP Biodoc (*Imaging System*).

## 2.3 Amplificação e genotipagem das amostras de DNA de *Brachyplatystoma filamentosum*

Foram selecionados 10 locos microssatélites entre os 17 locos isolados e caracterizados para *B. filamentosum* (Capítulo I Tabela 3).

Foi adicionada uma cauda M13 na extremidade 5' de cada *primer forward* dos 10 locos microssatélites (Tabela 2) no intuito de permitir a marcação por fluorescência de acordo com o protocolo econômico descrito por Schuelke (2000).

Tabela 2- Locos microssatélites utilizados nas análises populacionais de *Brachyplatystoma filamentosum* amostrada em 6 regiões com diferentes tipos de água da Amazônia brasileira.

<b>Locos SSR</b>	<b>Motivo de repetição</b>	<b>Ta (°C)</b>
<b>Bf01</b>	(TG) <sub>11</sub>	65
<b>Bf03</b>	(TG) <sub>10</sub> (CTTT) <sub>4</sub>	57,6
<b>Bf40</b>	(GT) <sub>13</sub> (GA) <sub>11</sub>	60
<b>Bf41</b>	(CA) <sub>6</sub>	60
<b>Bf43</b>	(GT) <sub>10</sub>	60
<b>Bf46</b>	(CT) <sub>13</sub>	61
<b>Bf48</b>	(GA) <sub>16</sub>	60
<b>Bf54</b>	(TG) <sub>11</sub>	60
<b>Bf61</b>	(TG) <sub>6</sub>	60
<b>Bf62</b>	(TG) <sub>9</sub>	60

Os fragmentos contendo microssatélites foram amplificados de acordo com o protocolo descrito em (Batista *et al.*, 2010). Cada reação foi feita com volume final de 10 µL contendo: 1µl de DNA genômico concentrado em 10ng/µl, 0,4 µl de cada *primer forward* e do *primer* M13 marcado (com a fluorescência FAM, HEX ou NED dependendo do loco), 0,8 µl do *primer* reverso, sendo todos os *primers* a 4 µM, 200 µM de cada dNTP (*Thermo Scietific*), 1,5 MgCl<sub>2</sub>, 1X de tampão (10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, pH 8.4) e 0,5 U de *goTaq* DNA polimerase (*Promega*). A reação da polimerase em cadeia, PCR, foi realizada utilizando as seguintes condições de temperatura e tempo: desnaturação do DNA (68 °C, 2min; 92 °C, 30 s) seguida de 30 ciclos de 30 s a 92 °C, 35 s para a temperatura de anelamento (Ta) específica de cada par de *primer* (Tabela 7), e 35 s a 68 °C; posteriormente, 20 ciclos para o *primer* marcado específico com: 20 s a 92 °C, 30 s a 53 °C, 30 s a 72 °C; finalizando com uma extensão final a 72 °C for 15 min e a 68 °C 15 min.

O produto de PCR foi verificado em eletroforese em gel de agarose 1,5%, corado com *GelRed* (*Biotium*) e visualizado em fotodocumentador UVP Biodoc (*Imaging System*). Os produtos de PCR foram diluídos (1:20) e 1 uL dessa diluição, juntamente com 7,0 uL da

solução contendo *Tween 20* 0,1% e 1 uL do padrão de tamanho de alelos (*size ROX-labeled* (Dewoody et al., 2004)), foi eletroinjetado em Analisador automático *ABI 3130xl* (*Thermo Scientific*).

Um sistema *multiplex* (Tabela 3) foi montado para a genotipagem das amostras de DNA a partir da combinação de três fluorescências (FAM, HEX e NED) e do tamanho dos alelos de cada loco. Esse procedimento auxiliou na otimização de tempo e reagentes, uma vez que em um único *poço* da placa de genotipagem (96 poços), é possível a análise de três locos com fluorescências distintas simultaneamente.

Tabela 3- Sistemas Multiplex utilizado para a genotipagem dos indivíduos de *Brachyplatystoma filamentosum* amostrados nas 6 regiões da bacia amazônica, desenvolvidos a partir da combinação do tamanho dos alelos (pb) e das fluorescências FAM, HEX e NED.

<b>Multiplex</b>	<b>Locos</b>	<b>Tamanho (pb)</b>	<b>Fluorescência</b>
<b>1</b>	1	205-213	FAM
	40	131-153	HEX
	41	234-240	NED
<b>2</b>	3	196-220	FAM
	43	237-269	HEX
	54	124-162	NED
<b>3</b>	48	188-202	FAM
	46	92-102	HEX
<b>4</b>	61	193-209	FAM
	62	313-317	HEX

#### **2.4 Estimativa do tamanho dos alelos, tratamento e montagem do banco de dados de genotipagem.**

Os dados das genotipagens foram analisados com o programa *GeneMarker software v 1.97* (*SoftGenetics*), estimando o tamanho dos alelos (em pb), usando o padrão de *size ROX-labeled* (Dewoody et al., 2000). Uma matriz de dados foi gerada em formato de tabela, contendo o genótipo de todos os indivíduos amostrados nas seis localidades. Foi necessário gerar e converter a matriz de dados para que os arquivos fossem reconhecidos e utilizados nos diferentes programas de análises. Para a estimativa de parâmetros genéticos foi utilizado os programas *MSTOOLS* (Park, 2001) e *GENALEX 6.2* (Peakall e Smouse, 2006). Indivíduos idênticos e diferenças de tamanho entre os alelos de cada genótipo foram checados com o auxílio dos programas *MSTOOLS* (Park, 2001) e *MICROCHECKER 2.2.3* (Van Oosterhout et al., 2004) respectivamente. Foram excluídos 18 pb do tamanho de cada alelo que

correspondiam a cauda de M13 fluorescente usada na PCR, conforme sugerido por Schuelke (2000). O programa *MICROCHECKER* 2.2.3 (Van Oosterhout *et al.*, 2004) também foi utilizado para verificar a presença de alelos nulos, *stutters* e *large dropout*, em cada loco e em cada região.

## 2.5 Análises estatísticas e estrutura populacional

O número total de alelos ( $A$ ), o coeficiente de endogamia ( $F_{IS}$ ) para cada loco e em cada região, o desequilíbrio de ligação ( $DL$ ) e a riqueza alélica ( $AR$ ) foram calculados através do programa *FSTAT* 2.9.3.2 (Goudet, 2001). O Conteúdo de Polimorfismo -  $PIC$  (Botstein *et al.*, 1980), a heterozigosidade observada ( $H_O$ ) e a esperada ( $H_E$ ) foram gerados no programa *MSTOOLS* (Park, 2001). O desvio do Equilíbrio de Hardy-Weinberg ( $EHW$ ) foi verificado pelo programa *GENEPOP* v4 (Raymond e Rousset, 1995), o número de alelos exclusivos em cada localidade foi realizado no programa *GENALEX* 6.2 (Peakall e Smouse, 2006). Os níveis de significância estatísticos foram ajustados por meio da correção sequencial de Bonferroni, para os testes de  $EHW$  e  $DL$  (Rice, 1989).

A análise de variância dos dados moleculares – AMOVA, foram verificados através das estatísticas  $F$  de Wright (Wright, 1951), estimada com o auxílio do programa *ARLEQUIN* 3.5 (Excoffier *et al.*, 2005). O fluxo gênico foi estimado a partir do número de migrantes por geração ( $Nm$ ) com o programa *ARLEQUIN* 3.5 (Excoffier *et al.*, 2005).

Para a verificar se a possível segregação genética dos indivíduos de piraibas nas regiões amostradas foi realizada uma análise Bayesiana implementada no programa *STRUCTURE* 2.3.2 (Pritchard *et al.*, 2000), atribuindo aos indivíduos a número  $k$  de populações, assumindo equilíbrio de Hardy-Weinberg e ausência de desequilíbrio de ligação entre os locos analisados dentro de cada população. Para essas análises foi usado o modelo de mistura (*admixture model*), no qual cada indivíduo pode ter ancestrais de mais de uma população, e frequências alélicas correlacionadas, permitindo uma sensível identificação de populações sub-estruturadas (Falush *et al.*, 2003). Foram realizadas 10 réplicas para cada valor de  $k$ , variando de um a 10, com valores de corte (*burnin*) de 50.000 permutações e Markov Chain Monte Carlo (MCMC) com 1.000.000 permutações. O número de clusters ( $k$ ) foi inferido pelo método proposto por Pritchard *et al.* (2000), realizado com o auxílio do programa *STRUCTURE HARVESTER* 0.56.3 (Earl, 2009), disponível no site [http://taylor0.biology.ucla.edu/struct\\_harvest/](http://taylor0.biology.ucla.edu/struct_harvest/). O nível de significância da associação entre a distância genética e a distância geográfica foi estimado com o teste de Mantel (Mantel, 1967)

verificado através do programa ARLEQUIN 3.5 (Excoffier *et al.*, 2005). Uma matriz de distância geográfica entre os pontos de coleta foi estimada seguindo o curso dos rios com o auxílio do programa *GOOGLE EARTH* 4.3.7.3 beta 2008 (Google).

### 3.RESULTADOS

#### 3.1 Diversidade genética em *Brachyplatystoma filamentosum* com o uso de marcadores moleculares microssatélites

Uma matriz de dados foi gerada, contendo o genótipo de 178 indivíduos de *B. filamentosum*, provenientes de 6 regiões na bacia amazônica (Tabela 1) para dez locos microssatélites, a fim de realizar as análises populacionais. A análise realizada no programa MICRO-CHECKER 2.2.3 (Van Oosterhout *et al.*, 2004), indicou a ocorrência de alelos nulos nos locos Bf1, Bf40, Bf41, Bf43, Bf46 e Bf62 em pelo menos uma localidade cada.

Foram observados 80 alelos (A), entre os 178 indivíduos de *B. filamentosum* distribuídos nos 10 locos microssatélites, com uma média de 8 alelos por loco. O número de alelos variou entre três (Bf61) a 13 (Bf43) por loco e o tamanho entre 92 a 317 pb. A heterozigosidade esperada ( $H_E$ ) variou entre 0,138 (Bf41) e 0,837 (Bf40), com uma média de 0,598 por loco, enquanto que a heterozigosidade observada ( $H_O$ ) variou entre 0,107 (Bf41) e 0,971 (Bf48), apresentando uma média de 0,548 por loco. A média do Conteúdo de Polimorfismo Informativo (PIC) foi de 0,552, sendo que o loco Bf40 apresentou o maior índice (0,802) e o Bf41o menor (0,133). Esse loco também apresentou o maior valor para o coeficiente de endogamia  $F_{IS}$  (0,838) (Tabela 4).

Tabela 4 – Heterozigosidade esperada e observada, polimorfismo Informativo (PIC) e o índice de Endogamia ( $F_{IS}$ ) obtidos para cada um dos 10 locos microssatélites em 178 indivíduos de *Brachyplatystoma filamentosum*, amostrados em 6 localidades. As médias para índices também apresentados. cada um desses são

Locos SSR	A	Tamanho (pb)	$H_E$	$H_O$	PIC	$F_{IS}$
<b>Bf01</b>	6	203-213	0,562	0,629	0,465	0,233
<b>Bf03</b>	9	196-220	0,640	0,462	0,577	0,115
<b>Bf40</b>	12	127-155	<b>0,837</b>	0,875	<b>0,802</b>	0,123
<b>Bf41</b>	6	230-244	<b>0,138</b>	<b>0,107</b>	<b>0,133</b>	<b>0,838</b>
<b>Bf43</b>	<b>13</b>	233-277	0,645	0,571	0,607	0,198
<b>Bf46</b>	6	<b>92</b> -104	0,709	0,875	0,643	<b>-0,066</b>
<b>Bf48</b>	9	98-202	0,745	<b>0,971</b>	0,687	0,075
<b>Bf54</b>	12	124-162	0,726	0,743	0,682	0,056
<b>Bf61</b>	<b>3</b>	193-209	0,504	0,857	0,373	-0,724
<b>Bf62</b>	4	311- <b>317</b>	0,553	0,457	0,475	0,174
<b>Total</b>	<b>80</b>	<b>92-317</b>	<b>0,598</b>	<b>0,548</b>	<b>0,552</b>	<b>0,227</b>

Dentre os 80 alelos, 19 alelos exclusivos foram observados distribuídos nas seis regiões amostradas, entre os 178 indivíduos de *B. filamentosum*. O alelo 329 (Bf62), presente no rio Branco, mostrou a maior frequência (0,063). O Rio Tapajós apresentou o maior número de alelos exclusivos (5) e Rio Araguaia e Rio Negro o menor número (2). O loco Bf46 não apresentou nenhum alelo exclusivo em nenhuma das regiões (Tabela 5).

Tabela 5 - Alelos exclusivos (em pb) e suas frequências (valores entre parênteses) observados em nove locos microssatélites de *Brachyplatystoma filamentosum* nas 6 regiões amostradas.

Locos	Regiões						Total
	Belém	Rio Madeira	Rio Branco	Rio Araguaia	Rio Tapajós	Rio Negro	
<b>Bf1</b>				221(0,031)			1
<b>Bf3</b>	222(0,019)	224(0,014)	220(0,022)				3
<b>Bf40</b>					173(0,032)		1
<b>Bf41</b>					248(0,016) 262(0,032)		2
<b>Bf43</b>		259(0,043) 295(0,014)	279(0,023)				3
<b>Bf48</b>					204(0,014) 208(0,014)	116(0,020)	3
<b>Bf54</b>	142(0,014) 174(0,014) 180(0,014)					170(0,023)	4
<b>Bf61</b>				225(0,028)			1
<b>Bf62</b>			329(0,063)				1
<b>Total</b>	4	3	3	2	5	2	19

Foi estimado o número de alelos, as heterozigosidade observada ( $H_O$ ) e esperada ( $H_E$ ), a probabilidade ( $P$ ) para o teste de equilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE) e o coeficiente de endogamia ( $F_{IS}$ ) por loco em cada uma das seis regiões estudadas (Tabela 6). A heterozigosidade observada ( $H_O$ ) e esperada ( $H_E$ ) variaram entre 0,000 (Bf41, nos espécimes oriundos dos rios Madeira e Negro) a 1,000 (Bf46, nas regiões dos rios Branco e Araguaia; e Bf61 no rio Madeira) e 0,070 (Bf43 no rio Negro) a 0,881 (Bf40 na região do rio Tapajós), respectivamente. Os valores de  $F_{IS}$  variaram entre -0,008 (Bf3), observado entre os indivíduos coletados no rio Branco, e 1,00 (Bf41) entre os indivíduos dos rios Madeira e Negro.

Desvio de equilíbrio de Hardy-Weinberg foi observado em todas as 6 regiões amostradas, em alguns locos (Tabela 6), após a correção de Bonferroni ( $P=0,00625$ ) (Rice, 1989).

Tabela 6- Índices de diversidade genética obtidos com 10 locos microssatélites de *Brachyplatystoma filamentosum* amostrada em seis regiões da Bacia Amazônica com diferentes tipos de água. N – Número de indivíduos analisados em cada região; A – Número de alelos;  $H_O$  - Heterozigosidade observada;  $H_E$  - Heterozigosidade esperada;  $F_{IS}$  – Coeficiente de endogamia;  $HWE$  – Probabilidade do teste de Equilíbrio de Hardy Weinberg.

Regiões		Bf1	Bf3	Bf40	Bf41	Bf43	Bf46	Bf48	Bf54	Bf61	Bf62
Belém	N	35	26	32	28	28	33	34	35	35	35
	A	5	6	8	4	7	4	6	11	2	3
	$H_O$	0,629	0,462	0,875	0,107	0,571	0,875	0,971	0,743	0,857	0,314
	$H_E$	0,562	0,640	0,837	0,138	0,645	0,709	0,745	0,726	0,504	0,513
	$F_{IS}$	-0,120	0,282	-0,045	0,228	0,116	-0,238	-0,309	-0,023	-0,720	0,390
	$HWE$	0,761	0,195	0,707	0,040	0,054	<b>0,000</b>	0,010	0,115	<b>0,000</b>	0,011
Rio Madeira	N	28	35	34	28	35	23	34	20	35	18
	A	5	6	11	3	7	5	6	6	2	3
	$H_O$	0,571	0,571	0,676	<b>0,000</b>	0,371	0,870	0,647	0,600	<b>1,000</b>	0,389
	$H_E$	0,660	0,531	0,845	0,543	0,376	0,733	0,694	0,640	0,507	0,414
	$F_{IS}$	0,136	-0,076	0,202	<b>1,000</b>	0,013	-0,190	0,068	0,063	-1,000	0,063
	$HWE$	0,126	0,715	0,037	<b>0,000</b>	0,128	<b>0,000</b>	0,241	0,200	<b>0,000</b>	0,140
Rio Branco	N	20	23	23	20	22	21	21	21	21	16
	A	4	5	7	3	9	5	4	4	2	4
	$H_O$	0,650	0,565	0,652	0,100	0,500	<b>1,000</b>	0,619	0,333	0,864	0,438
	$H_E$	0,679	0,560	0,693	0,497	0,597	0,750	0,710	0,336	0,502	0,579
	$F_{IS}$	0,044	<b>-0,008</b>	0,598	0,803	0,166	-0,344	0,130	0,007	-0,750	0,250
	$HWE$	0,968	0,104	0,400	<b>0,000</b>	<b>0,000</b>	<b>0,000</b>	0,576	0,546	<b>0,000</b>	<b>0,004</b>
Rio Araguaia	N	16	18	18	17	16	17	10	16	18	12
	A	5	5	6	2	6	4	3	6	3	3
	$H_O$	0,250	0,556	0,772	0,059	0,438	<b>1,000</b>	0,333	0,875	0,944	0,500
	$H_E$	0,601	0,565	0,730	0,166	0,476	0,572	0,451	0,734	0,541	0,638
	$F_{IS}$	0,591	0,017	0,011	0,652	0,083	-0,790	0,272	-0,200	-0,784	0,223
	$HWE$	<b>0,000</b>	0,061	1,000	<b>0,100</b>	0,157	<b>0,000</b>	0,541	0,160	<b>0,000</b>	0,012
Rio Tapajós	N	32	37	31	31	39	26	37	28	34	16
	A	5	6	12	6	9	5	7	6	2	2
	$H_O$	0,531	0,486	0,935	0,097	0,205	0,400	0,703	0,607	0,676	0,500
	$H_E$	0,509	0,624	<b>0,881</b>	0,295	0,363	0,675	0,716	0,701	0,454	0,444
	$F_{IS}$	-0,044	0,222	-0,062	0,675	0,437	0,412	0,018	0,136	-0,500	-0,132
	$HWE$	0,782	0,100	0,818	<b>0,000</b>	<b>0,002</b>	<b>0,000</b>	0,115	0,338	<b>0,005</b>	1,000
Rio Negro	N	25	26	21	13	28	21	25	22	28	14
	A	4	3	7	3	2	6	5	5	2	3
	$H_O$	0,120	0,231	0,571	<b>0,000</b>	0,071	0,810	0,320	0,455	0,893	0,571
	$H_E$	0,288	0,215	0,640	0,480	<b>0,070</b>	0,790	0,384	0,450	0,503	0,442
	$F_{IS}$	0,588	-0,075	0,110	<b>1,000</b>	-0,018	-0,025	0,168	-0,010	-0,800	-0,308
	$HWE$	<b>0,000</b>	1,000	0,156	<b>0,000</b>	1,000	<b>0,000</b>	0,084	0,478	<b>0,000</b>	0,630

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

Posteriormente às análises em 10 locos de *B. filamentosum* para as seis regiões da bacia amazônica, o número de alelos totais ( $A_T$ ) foi maior na população do rio Tapajós ( $A_T=60$ ), a maior riqueza alélica ( $A_R$ ) em Belém ( $A_R=4,169$ ), e a maior estimativa de diversidade gênica pode ser vista no rio Tapajós (0,880-0,298) e a menor no rio Araguaia (0,730-0,169). As maiores médias de heterozigosidade observada e esperada foram identificadas em Belém 0,640 e 0,602, respectivamente. Ao analisar os 178 indivíduos de *B. filamentosum*, a maior

média do coeficiente de endogamia ( $F_{IS}$ ) foi registrada no Tapajós com 0,093 e a menor média no rio Araguaia com -0,037 (Tabela 7).

Tabela 7- Índice genético de *B. filamentosum* nas seis regiões da bacia amazônica, utilizando dez locos microssatélites. Número total de alelos ( $A_T$ ), média do número de alelos por loco ou riqueza alélica ( $A_R$ ), diversidade genética média, média da heterosigozidade total observada ( $H_o$ ) e esperada ( $H_e$ ) e o coeficiente de endogamia ( $F_{IS}$ ).

Região	N	$A_T$	$A_R$	Média de diversidade genética	Média $H_o-H_e$	$F_{IS}$
<b>Belém</b>	35	56	4,169	0,837-0,139	0,640-0,602	-0,065
<b>Rio Madeira</b>	35	54	3,977	0,848-0,376	0,570-0,594	0,043
<b>Rio Branco</b>	23	47	3,785	0,744-0,336	0,572-0,590	0,032
<b>Rio Araguaia</b>	18	43	3,598	<b>0,730-0,169</b>	0,568-0,550	<b>-0,037</b>
<b>Rio Tapajós</b>	39	<b>60</b>	4,039	<b>0,880-0,298</b>	0,510-0,570	<b>0,093</b>
<b>Rio Negro</b>	28	40	4,070	0,789-0,070	0,404-0,430	0,055

### 3.2 Análise da distribuição da diversidade genética (AMOVA) em *Brachyplatystoma filamentosum*

Para as análises de  $F_{ST}$  foram considerados que valores entre 0,00 e 0,05 indicam baixa diferenciação genética, valores entre 0,05 e 0,15 indicam média diferenciação, valores entre 0,15 a 0,20 indicam alta diferenciação genética e os valores acima de 0,25 indicam grande diferenciação (Wright, 1951). Os valores de  $F_{ST}$  obtidos para *B. filamentosum* entre cada par das seis regiões amostradas, considerando os 10 locos microssatélites, variou entre 0.003, observados entre Belém e o rio Madeira e 0.219 entre os rios Negro e Araguaia e os números de migrantes ( $N_m$ ) variaram entre 1,783 entre os rios Negro e Araguaia e 166,167 entre Belém e rio Madeira (Tabela 8). As demais comparações entre as regiões apresentaram de média a baixa diferenciação genética, indicando fluxo gênico moderado entre os indivíduos de piraíba.

A análise de variância molecular (AMOVA) foi realizada com os 10 locos microssatélites para estimar a variação genética dentro e entre as localidades, entre os diferentes tipos de água e entre os escudos onde se originaram cada tipo de água. Os resultados estão evidenciados de forma hierárquica na tabela 9. Para testar a hipótese nula deste estudo, em que a piraíba não apresenta segregação, foi feita uma análise com todos os indivíduos divididos entre as seis regiões. Foi constatado que a variação é maior dentro das localidades (rio Araguaia, rio Branco, rio Madeira, rio Negro, rio Tapajó e Belém) com

91,86% de que entre elas com 8,15%, com  $F_{ST}$  0,0815. Posteriormente, para testar a hipótese 2, onde a segregação estaria associada ao tipo de água, foi feita uma AMOVA dividindo as seis regiões em três grupos de acordo com o tipo de cor da água. Grupo 1: rio Araguaia, rio Branco e rio Tapajós (água clara); grupo 2: Belém e rio Madeira (água branca); e grupo 3: rio Negro (água preta). Quando comparados os grupos de acordo com seu tipo de água (clara, branca e preta), obteve-se 2,36% de variação entre esses grupos, 4,36% de variação entre as localidades dentro dos grupos com diferentes tipos de água e 93,28% de variação dentro das localidades. Foi feito também a mesma análise agrupando as seis regiões de acordo com os escudos geológicos das nascentes de seus rios: Grupo 1: Belém e rio Madeira (Andes); grupo 2: Araguaia, Paranaíta, Itaituba (Escudo do Brasil Central); grupo 3: rio Negro e rio Branco, sub-bacia do rio Negro (ambos com a nascente no escudo das Guiana). Obteve-se os seguintes resultados: 3,14% entre os grupos, agora divididos de acordo com o escudo de formação; 3,61% entre as localidades dentro dos grupos; e 93,25% dentro de cada localidade, com  $F_{ST}$  0,0675. Os índices de fixação se mostraram significativos ( $P < 0,005$ ) em cada nível hierárquico das análises. Os dados apontam que há segregação genética entre os indivíduos de *B. filamentosum* distribuídos nas seis regiões da bacia amazônica amostrados neste estudo, de acordo com o resultado da análise de variância molecular e os índices de  $F_{ST}$ , par-a-par serem significativos, não se pode aceitar totalmente que a segregação está relacionada ao tipo de água onde ocorre, uma vez que entre Belém e rio Madeira, ambos de água branca, a diferenciação não foi significativa, e entre os locais oriundo de água clara os valores mostraram-se significativos (Tabela 8) sugerindo que a segregação pode estar associada a outros fatores.

Para verificar se há relação das distâncias genéticas entre os indivíduos de *B. filamentosum*, com a distância geográfica foi realizado o teste de Mantel (Mantel, 1967). De acordo com os valores do coeficiente de correlação ( $r$ ) de 0,544 e de  $P = 0,06$ , não houve correlação significativa entre as distâncias genéticas e distância geográfica, de forma que a estrutura genética encontrada não está relacionada a distância geográfica.

As análises de estruturação das populações foi analisada por meio da análise Bayesiana implementada no programa STRUCTURE 2.3.4 (Pritchard *et al.*, 2000), em 10 locos de *B. filamentosum*. O número de populações ( $K$ ) mais provável foi estimado pelo programa considerando todos os indivíduos amostrados nas seis populações, indicando 5 clusters ( $K=5$ ) (Figura 3).

Tabela 8 – Fluxo gênico com NM = número de migrantes (valores acima da linha diagonal) e  $F_{ST}$  par-a-par (valores abaixo da linha diagonal), estimado entre as seis regiões em que *Brachyplatystoma filamentosum* com 10 locos microssatélites, foi amostrada.

	Rio Araguaia	Rio Branco	Rio Madeira	Rio Negro	Rio Tapajós	Belém
Rio Araguaia	-	3,925	5,056	<b>1,783</b>	9,304	7,697
Rio Branco	0,113*	-	10,138	5,829	8,121	11,695
Rio Madeira	0,090*	0,047*	-	4,450	15,125	<b>166,167</b>
Rio Negro	<b>0,219</b>	0,079*	0,101*	-	3,810	4,708
Rio Tapajós	0,051*	0,058*	0,032*	0,116*	-	70,929
Belém	0,061*	0,041*	<b>0,003*</b>	0,096*	0,007	-

\* valores significativos < 0,005

Tabela 9 – Análise de variância molecular (AMOVA) em *Brachyplatystoma filamentosum*, a partir de distância euclidiana estimada com os valores de  $F_{ST}$ , utilizando 10 locos microssatélites, nas seis regiões distribuídas na Bacia Amazônica.

Análise	Participação dos grupos	Entre os grupos	$F_{CT}$	Entre localidades dentro das regiões		Dentro das localidades	$F_{ST}$
				$F_{SC}$			
	Grupo	%		%		%	
1	Todas as localidades	8,15				91,86	0,0815*
2	Clara+Branca+Preta	2,36	0,024*	4,36	0,045*	93,28	0,0672*
3	Entre Escudos	3,14	0,0314*	3,61	0,037*	93,25	0,0675*

\*Valores significativos ( $P < 0,05$ );  $F_{CT}$ ;  $F_{ST}$ ;  $F_{SC}$  = índices de fixação e estatísticas F de Wright.

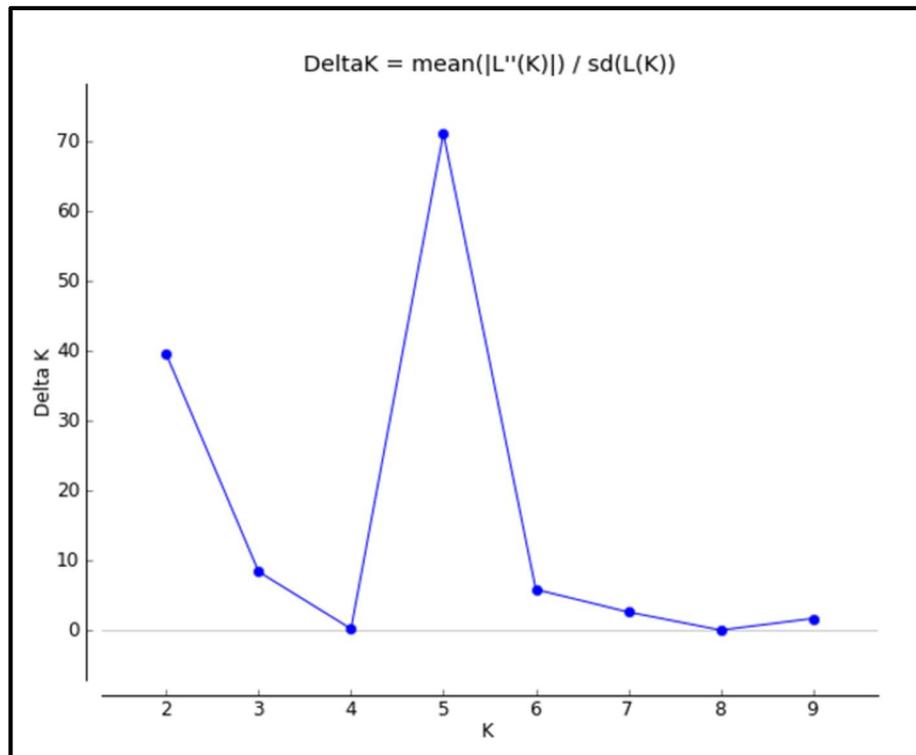


Figura 3- Resultado do STRUCTURE HARVESTER, indicando K=5, como a maior probabilidade para os dados do presente trabalho, resultado para 10 locos microssatélites. Na vertical temos a média da estimativa da distribuição das probabilidades dos dados e na horizontal número de clusters testados (K) e o desvio padrão (SD) da probabilidade média.

No *Barplot* gerado com o programa STRUCTURE 2.3.2, é possível visualizar um padrão de estrutura no rio Araguaia (predomínio da cor amarela), no rio Branco e em parte do rio Negro (predomínio da cor verde). Belém e o rio Madeira e parte do rio Tapajós revelaram o mesmo padrão heterogêneo (com o predomínio das cores vermelha e azul) (Figura 4).

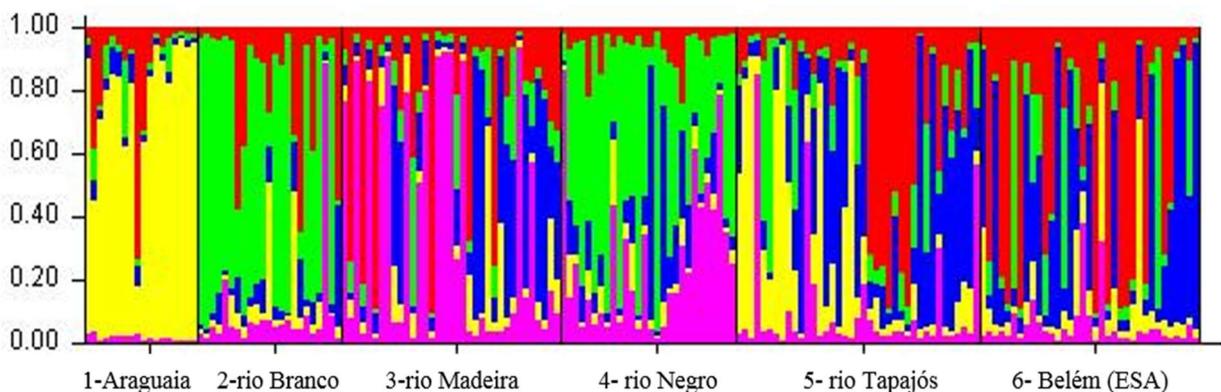


Figura 4- *Barplot* gerado pelo programa STRUCTURE 2.3.2, indicando cinco populações de *B. filamentosum*, de acordo com a análise de 10 locos microssatélites. Cada cor corresponde a um agrupamento e cada localidade é representado por uma barra vertical. As localidades estão evidenciadas no eixo X e o eixo Y representa a probabilidade de atribuição de uma localidade em cada grupo.

#### 4.DISCUSSÃO

Há evidências que a piraíba, *B. filamentosum*, esteja distribuída em grande parte da extensão da bacia amazônica, na maioria dos afluentes, canais e igarapés independentemente do tipo de cor de água.

Para alguns organismos, as diferentes composições químicas das águas são fatores vitais. Para a arraia de água doce *Potamotrygon cf. hystrix*, a adaptação a um tipo de água limita sua distribuição geográfica nas águas do rio Negro acima da confluência com o rio Branco (Silva *et al.*, 2007). Para os gêneros *Symphisodon* e *Cichla*, as diferenças na composição química dos rios amazônicos foram sugeridas como um dos fatores responsáveis pelo padrão filogeográfico (Willis *et al.*, 2007; Farias e Hbrek, 2008). Para Huergo, (2009) os três clados de *B. filamentosum* podem estar associados aos diferentes tipos de água presentes na bacia amazônica.

Devido as modificações na estrutura geológica da bacia amazônica que geraram mudanças como o sentido do curso do rio na calha principal, além de alterações na composição química das águas de acordo com o tempo e o local de sua formação e os resultados obtidos por Huergo, (2009) em que houve a formação de três clados desta espécie, levaram a concluir que esses clados poderiam estar associados ao tipo de água. É necessário considerar que as informações obtidas pelo DNA mitocondrial são heranças quase que exclusivamente maternas, impossibilitando uma afirmação total de que os machos tenham o mesmo comportamento que as fêmeas. Será que ambos os gêneros realizam o mesmo tipo de migração? Será que machos e fêmeas possuem capacidades distintas para se adaptarem aos tipos de água?

Os resultados deste estudo indicaram, a primeira vista, que há segregação genética para *B. filamentosum* amostradas em seis regiões da bacia amazônica. De modo geral os indivíduos apresentaram entre baixo a alto índice de fluxo gênico as localidades amostradas. Porém, quando analisamos os indivíduos de acordo com o tipo de água onde ocorrem, através dos marcadores microssatélites, constata-se que a variação genética é maior entre os indivíduos que entre as localidades amostradas, ou até mesmo entre os grupos de localidades formados de acordo com seu escudo geológico, refutando a hipótese proposta por Huergo, (2009) quando analisou a sequência do DNA mitocondrial dessa espécie, sugerindo segregação genética associada ao tipo de água onde ocorrem.

A ampla distribuição geográfica, o caráter migratório da piraíba, a diversidade genética encontrada no presente estudo, podem ter sido influenciadas pelo resultado das mudanças geológicas da bacia amazônica. A segregação genética existente entre os indivíduos

de *B. filamentosum*, pode ter outras explicações, como por exemplo a hipótese de alopatria, onde há especiação por barreiras geográficas. Para fortalecer esta hipótese para a espécie em questão, seria necessário realizar análises de variação genética de piraíbas provenientes de lugares promissores de barreira geográfica, como por exemplo pontos das corredeiras de São Gabriel da Cachoeira, acima e abaixo delas, para verificar se esse fator é decisivo para elucidar a questão de segregação genética entre os indivíduos de *B. filamentosum* desta localidade.

Em algumas áreas da Amazônia colombiana, as origens geológicas das nascentes dos rios e as diferenças nos parâmetros químicos dos corpos d'água, são considerados os fatores responsáveis pela diversidade e composição das comunidades de peixes de igarapés (Arbeláez *et al.*, 2008). É provável que *B. filamentosum* seja bastante flexível fisiologicamente ao ponto de se adaptar em todos os diferentes tipos de águas, não se limitando ao um único tipo, indicando mais uma evidência de que a segregação não está associada ao tipo de água onde ocorre. Devido os seus barbilhões, os Siluriformes são extremamente sensíveis a percepção de substâncias diluídas na água, como aminoácidos (Caprio, 1977). Principalmente em se tratando de *B. filamentosum*, pois os resultado dos estudos mais recentes sobre as espécies *B. filamentosum* e *B. capapretum*, revelaram que a média da frequência de *B. filamentosum* é maior que *B. capapretum* em toda a bacia amazônica. Segundo Lira-Cordeiro, (2013) as porcentagens relativas à identificação molecular da composição de espécies capturadas e comercializadas como “piraíba”, são compostas por cerca de 52,7% por *B. filamentosum*, 39,17% por *B. capapretum* e 8,13% por demais bagres pimelodídeos (*B. rousseauxii*, *B. platynemum* e *B. vaillantii*) em nove regiões da bacia amazônica, com vários tipos de cor de água. Segundo Huergo *et al.*, (2011), 337 amostras comercializadas e identificadas também como “piraíba”, compunham aproximadamente 33% de exemplares de *B. capapretum* comercializadas como *B. filamentosum*, entre os anos de 1998 e 2008, e que *B. filamentosum* é mais abundante que *B. capapretum* em rios de água branca da Amazônia. No capítulo II deste trabalho, foi estimada a frequência das duas espécies em rios de água preta e clara, rio Negro e Tapajós, respectivamente, constatando em média, maior frequência de ocorrência e por conseguinte de captura e de comercialização de *B. filamentosum* (89,99%), nesses rios, evidenciando fortemente a predominância da piraíba branca em rios de água preta e clara. Os fatores que levam esses peixes a entrarem nas águas escuras do rio Negro ainda são desconhecidos. Para Huergo, (2009) a entrada pode ter caráter aleatório, com os peixes fazendo incursões esporádicas nas águas do rio Negro a partir da foz do rio Branco ou do rio

Solimões, e a subida de *B. filamentosum* pelo rio Negro a partir de Manaus, pode ser induzida pela percepção da composição química da água do rio Branco pelos peixes.

Nesse contexto, segundo os resultados dos marcadores moleculares microssatélites, as diferenças na composição química das águas não serviriam como uma barreira ao fluxo gênico (Tabela 9).

As populações podem ser diferenciadas geneticamente quando o número de indivíduos migrantes ( $Nm$ ), um estimador de fluxo gênico, assumir valores menores de que um, ao passo que as mesmas podem ser consideradas como uma única unidade populacional panmítica quando a estimativa de  $Nm$  assumir valores maiores de que quatro (Kimura e Maruyama, 1971). Nesse estudo as estimativas dos valores das taxas de migração por geração ( $Nm$ ) foram maiores de que 4 em pelo menos 11 pares de localidades (Tabela 8), indicando eventos de migração e/ou mistura, por conseguinte, fluxo gênico entre os indivíduos de *B. filamentosum* oriundos de três tipos de água. O resultado da AMOVA (tabelas 08 e 09), STRUCTURE (Figura 04) associados aos resultados de fluxo gênico (tabela 08) corroboram esse resultado. No entanto, não é possível aceitar a hipótese nula de panmixia, de um único estoque para a espécie, uma vez que as mesmas análises, de forma geral, indicam estrutura entre algumas localidades, principalmente entre rio Araguaia com os rios rio Branco ( $F_{ST} = 0,113$ ) e Negro ( $F_{ST} = 0,219$ ). O rio Negro também apresentou o rio Madeira ( $F_{ST} = 0,101$ ). Os valores de  $Nm$  também foram abaixo de 4 entre essas localidades. Desta forma, sugere-se que *B. filamentosum* seja manejada considerando mais de que um estoque genético, principalmente no rio Negro, Araguaia e Branco. Todavia, não se pode afirmar que essa segregação esteja totalmente associada ao tipo de água.

O padrão apresentado no *Barplot* (Figura 4) gerado pelo programa STRUCTURE 2.3.2, evidencia 5 grupos de *B. filamentosum* representados com cores diferentes. Enquanto que nas localidades dos rios Araguaia, Branco, Madeira, Negro e Tapajós há a predominância de um ou dois grupos, em Belém, os 5 grupos se apresentam de forma homogênea, indicando maior variação dos indivíduos de piraíbas. Esse mesmo padrão foi encontrado em estudos de variabilidade genética para a Dourada e piramutaba, onde a variabilidade genética é maior no estuário amazônico e menor quando migram em direção as cabeceiras do rio Amazonas (Fabr e *et al.*, 2005).

Questões como a panmixia, ou se há mais de uma população para esta espécie, o conhecimento sobre o padrão de estrutura genética para *B. filamentosum* é fundamental para a elaboração de planos de manejo pesqueiro, propostas de conservação e seu possível uso na aquicultura (Waples, 1998; Vrijenhoek, 1998).

## 5. CONCLUSÕES GERAIS

- Foram isolados e caracterizados 17 locos microssatélites e foram eficientes na detecção da variabilidade genética de *B. filamentosum* (Capítulo I);
- A amplificação heteróloga dos locos microssatélites resultou em 1 loco amplificando em todas as seis espécies do gênero *Brachyplatystoma*, O número de locos amplificados variou entre 3 em *B. juruense* e 12 em *B. rousseauxii* e o número de locos polimórficos variou entre 2 em *B. platynemum* a 5 em *B. rousseauxii* (Capítulo I);
- Os marcadores microssatélites obtidos poderão ser utilizados em estudos genéticos podendo contribuir, não só para gerar planos de políticas de conservação e manejo da piraíba, mas também para as demais espécies comerciais do gênero *Brachyplatystoma* (Capítulo I);
- Foi possível identificar com a região controle do DNA mitocondrial 64 exemplares como *B. filamentosum* e 7 como *B. capapretum* entre 71 exemplares coletados como "piraíba" nas cidades de São Gabriel da Cachoeira (água preta) e Itaituba (água clara), destacando o predomínio dessa espécie em ambientes com os tipos de água preta e clara (capítulo II);
- A partir da caracterização genética com locos microssatélites (dez locos; N=178; 6 regiões), foi possível estimar a variabilidade genética de *B. filamentosum* (Capítulo III);
- Os resultados obtidos permitem rejeitar a hipótese nula, pois há segregação genética para a piraíba, porém, impossibilitam afirmar que essa segregação esteja associada ao tipo de água onde ocorrem ( $H_1$ );

## 6. BIBLIOGRAFIA

AGUDELO-CÓRDOBA, E.; Y. SALINAS-COY; C. L. SÁNCHEZ; MUÑOZ-SOSA, D. L.; ALONSO-GONZÁLEZ, J. C.; ARTEAGA-DÍAZ, M. E. A; RODRÍGUES-PIETRO, O. J. R.; ANZOLA-POTES, N. R.; ACOSTA-MUÑOZ, L. E.; NÚÑES-AVELLANEDA, M.; VALDÉS- CARRILLO, H. 2000, *Bagres de la amazonía colombiana: Un Recurso sin Fronteras*, Instituto Amazónico de Investigaciones Científicas-SINCHI, Bogota, Colombia, 253 p.

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

ARBELÁEZ, F.; DUIVENVOORDEN, J. F.; MALDONADO-OCAMPO, J. A. 2008. Geological differentiation explains diversity and composition of fish communities in upland streams in the southern Amazon of Colombia. *JOURNAL OF TROPICAL ECOLOGY*, 24: 505-515.

BATISTA, J.S.; FAIAS, I.P.; FORMIGA-AQUINO, K.; SOUSA, A.C.B.; ALVES-GOMES, J.A. DNA microsatellite markers for dourada (*Brachyplatystoma rousseauxii*, Siluriformes: Pimelodidae), a migratory catfish of utmost importance for fisheries in the Amazon: development, characterization and inter-specific amplification. *Conservation Genet Resour.* 2010. N. 2, p. 5-10.

BOTSTEIN, D.; WHITE, R.; SKOLNICK, M.; DAVIS, R. 1980. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am J Hum Genet* 32: 314-331.

CAPRIO, J. 1977. Electrophysiological distinctions between the taste and smell of amino acids in catfish. *Nature*, 266: 850 – 851.

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

EARL, D.A. 2009. *Structure Harvester* v.3, from website: [http://users.soe.ucsc.edu/~dearl/software/struct\\_harvest/](http://users.soe.ucsc.edu/~dearl/software/struct_harvest/).

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

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

FABRÉ, N.N.; BARTHEM, R.; CARVALHO, A.; ANGELIM, R. 2005. Sistema integrado para o manejo dos grandes bagres migradores. In: Fabr e, N.N.; Barthem, R.B., (Eds.), *O manejo da pesca dos grandes bagres migradores: piramutaba e dourada no eixo Solim es- Amazonas*. IBAMA. Manaus.

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

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

GONZ ALEZ, R. J. 1996. Ion regulation in ion poor water of low pH, 111–122, In: Val, A.L.; Almeida-Val, V.M.; Randall, D.J. (Eds.), *Physiology and Biochemistry of the Fishes of the Amazon*, Instituto Nacional de Pesquisas da Amaz nia, Manaus, Brazil.

GOUDET, J. 2001. *FSTAT, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices (version 2,9,3)*, Available from <http://www.unil.ch/izea/software/fstat.html>, Updated from Goudet (1995).

GOULDING, M. 1996. Pescarias amaz nicas, prote o de habitats e fazendas nas v rzeas: Uma vis o ecol gica e econ mica, Relat rio da reuni o do Banco Mundial, Bel m – PA, Brasil.

HALL, T.A. 1999. Bio Edit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for windows 95/98/NT, *Nucl, Acids, Res.*, 27: 5062-5068.

HUBERT, N.; RENNO, J.F. 2006. Historical biogeography of South American freshwater fishes, *Journal of Biogeography*, 33: 1414 – 1436.

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

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

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

JUNK, W. J.; PIEDADE, M.T.F.; SCHÖNGART, J.; COHN-HAFT, M.; ADENEY, J.M.; WITTMANN, FA. 2011. Classification of Major Naturally-Occurring Amazonian Lowland Wetlands. *Wetlands*. 31. 623–640.

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

LIRA-CORDEIRO, A. 2013 Estimativa da variabilidade genética da piraíba negra *Brachyplatystoma capapretum* (Siluriformes: Pimelodidae), por meio de marcadores mitocondriais e microssatélites, 2013, 107 f, Dissertação (Mestrado em Biotecnologia), Universidade Federal do Amazonas, Amazonas, Brasil.

LOVEJOY, N.R.; ALBERT, J.S.; CRAMPTON, W.G.R. 2006. Miocene marine incursions and marine/freshwater transitions: Evidence from neotropical fishes. *Journal of South American Earth Sciences*. 20: 14–27.

LUNDBERG, J. G. 2005. *Brachyplatystoma promagdalenae*, new species, a fossil goliath

catfish (Siluriformes: Pimelodidae) from the Miocene of Colombia, South America. *Neotropical Ichthyology*, 3(4): 597-605.

LUNDBERG, J. G.; LITTMANN, M. W. 2003. Family Pimelodidae. In: Reis. R. E.; Kullander. S. O. Ferraris. C.J. (Eds). Check list of the freshwater fishes of South and Central America. Porto Alegre. EDIPUCRS. pp. 432 – 435.

LUNDBERG, J.G.; MARSHALL, L.G.; GUERRERO, J.; HORTON, B.; MALABARBA, M.C.; WESSELINGH, F. 1998. The Stage for Neotropical Fish Diversification: A History of Tropical South American Rivers. In: Malabarba. L.R.; Reis. R.E.; Vari. R.P.; Lucena. C.A.S.; Lucena. Z.M.S. (Eds.). Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes. Museu de Ciências e Tecnologia. PUCRS. Porto Alegre. Brazil.

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

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

PEAKALL, R.; SMOUSE, P.E. 2006. Genalex 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes*. v.6. p. 288-295.

PETRERE, M.; BARTHEM, R. B.; CÓRDOBA, E. A.; GÓMEZ, B. C. 2004. Review of the large catfish fisheries in the upper Amazon and stock depletion of Piraíba (*Brachyplatystoma filamentosum* Lichtenstein). *Reviews in Fish Biology and Fisheries*. 14(4): 403 – 414.

PIEADADE, M.T.F.; JUNK, W.J.; SCHÖNGART, J.; PIEADADE, L.R.; WITTMANN, F. 2012. Recursos Hídricos e Áreas Úmidas Amazônicas no Contexto de um Mundo Globalizado. In: Fonseca. O.J.M. & Camargo. A.A.F. (org.). *Temas Contemporâneos de Direito Ambiental*. UEA Edições. Manaus. pp. 21-30.

PRITCHARD, J.K.; STEPHEENS, M.; DONNELLY, P. 2000. Interference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*. v.155. p. 945-959.

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

- RICE, W.R. 1989. Analyzing tables of statistical tests. *Evolution*. 43: 223-225.
- RUFFINO, M. L.; BARTHEM, R. B.; FISCHER, C. F. A. 2000. Perspectivas do Manejo dos Bagres Migradores na Amazônia. In: IBAMA. *Recursos Pesqueiros do médio Amazonas: Biologia e Estatística Pesqueira*. Brasília. pp. 115 – 140.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Springs Harbor Laboratory Press. Cold Springs Harbor. NY.
- SCHUELKE, M. 2000. An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. *Nature Biotechnology*. 18: 233-234.
- SILVA, N.F.; OLIVEIRA, A.T.; GOMES, A.P.; MELO, S.M.V.; SHIBUYA, A.; ARAÚJO, M.L.G.; COSTA, O.T.F.; FERNANDES, M.N.; DUNCAN, W.P. 2007. Determinantes da distribuição geográfica da arraia amazônica, *Potamotrygon cf. hystrix* Muller & Henle 1834 (Potamotrygonidae: Chondrichthyes): evidências ecofisiológicas. *Anais do VIII Congresso de Ecologia do Brasil*, Caxambu – MG, p. 1-3.
- SIOLI, H. 1956. Über Nature und Mensch in brasilianischen Amazonasgebiet. *Erdkunde*. 10(2). 89–109.
- TASSINARI, C.G.C.; MACAMBIRA, M.J.B. 2004. A evolução tectônica do Cráton Amazônico. In: NETO-MANTESSO. V.; BARTORELLI. A.; CARNEIRO. C.D.R.; BRITONEVES. B.B. (Org). *Geologia do continente sul-americano: evolução da obra de Fernando Flávio Marques de Almeida*. p. 471-486.
- TECHNELISYUM. 1998. Chromas 2.24. ([www.technelisyum.com.au](http://www.technelisyum.com.au)). Acesso: 14/07/2008.
- VAN OOSTERHOUT, C.; HUTCHINSON, W.F.; WILLS, D.P.M.; SHIPLEY, P. 2004. Micro-checker: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes*. 4: 535-538.
- VRIJENHOEK, R.C.1998. Conservation genetics of freshwater fish. *Journal of Fish Biology*. 53 (Supplement A): 394–412.
- WAPLES, R.S. 1998. Separating the wheat from the chaff: patterns of genetic differentiation in high gene flow species. *Journal Heredity*. 98: 438–450.

WILKINSON, M.J.; MARSHALL, L.G.; LUNDBERG, J.G. 2006. River behavior on megafans and potential influences on diversification and distribution of aquatic organisms. *Journal of South American Earth Sciences*. 21: 151–172.

WILLIS, S.C.; NUNES M.S.; MONTAÑA, C.G.; FARIAS, I.P; LOVEJOY, N. R. 2007. Systematics, biogeography, and evolution of the Neotropical peacock basses *Cichla* (Perciformes: Cichlidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 44: 291–307.

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