

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PROGRAMA MULTI-INSTITUCIONAL DE PÓS-
GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**



Caracterização da diversidade genética de populações naturais de tambaqui (*Colossoma macropomum*) através de marcadores moleculares: uma contribuição para conservação da espécie.

Maria da Conceição Freitas Santos

**Manaus-Am
Setembro, 2010**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS – UFAM
PROGRAMA MULTI-INSTITUCIONAL DE PÓS-
GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

Caracterização da diversidade genética de populações naturais de tambaqui (*Colossoma macropomum*) através de marcadores moleculares: uma contribuição para conservação da espécie.

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Biotecnologia, área de concentração Conservação e Uso de Recursos Genéticos Animais da Amazônia.

**Orientadora: Izeni Pires Farias, Dr^a
Co-Orientador: Tomas Hrbek, Ph.D**

**Manaus-Am
Setembro, 2010**

Ficha Catalográfica
(Catalogação realizada pela Biblioteca Central da UFAM)

Santos, Maria da Conceição Freitas

S237c Caracterização da diversidade genética de populações naturais de tambaqui (*Colossoma macropomum*) através de marcadores moleculares: uma contribuição para conservação da espécie / Maria da Conceição Freitas Santos. - Manaus: UFAM, 2010.

176 f.: il. color; 30 cm

Tese (Doutorado em Biotecnologia) — Universidade Federal do Amazonas, 2010.

Orientador: Dra. Izeni Pires Farias

Co-orientador: Dr. Tomas Hrbek

1. Tambaqui 2. Marcadores genéticos 3. Peixes de água doce I. Farias, Izeni Pires (Orient.) II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

CDU(1997): 597.554.1 (043.2)

Este trabalho foi viabilizado com a parceria:

Bolsa de estudo concedida pela:

FAPEAM (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas)

Apoio financeiro:

CNPq/CT-Amazônia N° 554057/2006-9

CNPq/PPG7 N° 557090/2005-9

SUFRAMA (Superintendência da Zona Franca de Manaus)

Execução do trabalho:

Universidade Federal do Amazonas- Laboratório de Genética Animal - LEGAL
University of Puerto Rico

Autorização para coleta e transporte de material biológico concedida pelo:

IBAMA/MMA- N° 086/2006 de 08/09/2006

Como bióloga dedico...

Este trabalho a todos os amazônidas
que utilizam o peixe com bases sustentáveis,
para prover o seu sustento, a sua sobrevivência.

Com propósito pessoal dedico...

À minha família, Marcelo e Marcela
que tanto suportaram a minha ausência,
aos quais amo e compartilho a minha vida.

A Amazônia abriga a maior biodiversidade do planeta e 25 milhões de humanos.

Como assegurar às espécies a sobrevivência?

Como assegurar ao homem viver com dignidade?

Estes, talvez, “os maiores dos desafios” de uma região tão grandiosa.

AGRADECIMENTOS

À DEUS, pai e meu protetor, meu refúgio.

A maior sabedoria dos grandes sábios é compartilhar o saber..., então agradeço...

Aos meus orientadores, a Dra. Izeni Pires Farias e Dr. Tomas Hrbek, pelo inestimável aprendizado, pelas oportunidades que me foram concedidas, pelos incentivos sempre constantes. À Cris que me acompanha antes mesmo de nascer o LEGAL, me ensinando o “bê-á-bá” de laboratório e que, eu sei, queria que eu tivesse as experiências de outros lugares, mas que soube compreender minhas limitações. Ao Tomas, pelos ensinamentos preciosos (e foram muitos), pela ajuda excepcional nos programas de análises (he’s the man!) e mostrar-me que podemos ser bons em várias coisas diferentes ao mesmo tempo, como por exemplo, cozinhar.

Ao Dr. Spartaco Astolfi Filho e Dr. José Odair Pereira, pelos conhecimentos que me foram fornecidos ao longo da minha vida acadêmica, por sempre me apoiarem e viabilizarem minhas solicitações. Ambos com toda a notoriedade são acessíveis e dispensam a mesma atenção a todos, por isso por vocês tenho grande respeito e admiração.

À Dra. Maria Imaculada Zucchi, que me ensinou como são interessantes e instigantes os microssatélites. Sua paciência e didática para ensinar, me fez compreender o que parecia tão complexo, além das sugestões valiosas que fez para este trabalho.

Ao Dr. Bruno Adan Sagratzki, pelos ensinamentos básicos sobre a piscicultura de tambaqui.

Ao Drs. Carlos Edwar, Bruno Sagratzki e Doriane Picanço, pelas correções e sugestões na aula de qualificação.

Quem somos? Somos a herança de nossos ancestrais, somos os valores, a conduta, o caráter ensinado por nossos pais....

Aos meus pais, Lourdes e Manoel, no fundo os grandes responsáveis por mais esta conquista, simplesmente pela educação que me destinaram, por mesmo com dificuldade me darem a chance de continuar meus estudos longe de casa, ainda adolescente, certamente fomentaram meus sonhos.

Ao meu marido, Marcelo, que compartilha (lá se vão 15 anos) as alegrias e dificuldades de uma vida a dois. Pelo incentivo e apoio que foram fundamentais para realizar este trabalho, mesmo que às vezes me cobrasse a “presença”. Obrigada pela disponibilidade para resolver vários problemas no decorrer deste estudo, foi difícil né Pá?

À minha filha, Marcela, minha cunhatã, que passou parte de sua infância sem a completa atenção e monitoramento da mamãe. Mas penso que a

dedicação de sua mãe com os estudos possam ser exemplo a ser seguido por você, seja qual for sua escolha.

Às minhas polimórficas irmãs (Dó, Carmen, Cris, Cló, Cássia e Téia) pelo incentivo e suporte que me deram nos momentos que precisei estar longe de casa. A atenção e os cuidados com a Marcela. As horas descontraídas que passei com vocês minimizavam os problemas e as dificuldades. À Rai, pelo cuidado com minha filha, estando eu presente ou não.

Todos queremos chegar ao topo da montanha, mas a felicidade e as maravilhosas experiências acontecem enquanto a escalamos.....

À Dra. Neves Viana, minha amiga para todas as horas e dúvidas.

Ao Mário e Fabrício, pela ajuda nos programas computacionais e disponibilidade sempre que solicitados. Mário, por toda assistência e otimismo para resolver os problemas.

À Wal e Val, minhas companheiras de laboratório e aventuras. O apoio de vocês e os momentos de descontração me mantiveram firme em meu propósito em Porto Rico. Pela ajuda na organização do banco de dados. Vocês são 10!

À amiga Themis, por me restabelecer nas práticas de laboratório, por sua amizade e por ser minha companheira de laboratório no início da pesquisa.

Ao Francisco Brasil, que usou suas habilidades e paciência para compor os mapas que idealizei.

Às “minhas estagiárias”, e hoje colegas, Lisa, Patrícia e Roberta, pela ajuda nas extrações de DNA e PCRs. Espero ter contribuído para seus aprendizados!

Aos colegas que se lembraram de mim em suas excursões quando encontravam tambaqui, coletando amostras pela imensidão amazônica: Izeni, Tomas, Tony Porto, Jaqueline Batista, Kyara Formiga, Valéria, Lisa, Clerot, Aroldo, Galetão, Marcelo, Natasha, Adam, Eduardo, Vivaldo, M^a Dóris, Rosana (Mexiana), Claudia de Deus, Mário, Olavo e Waleska.

Aos técnicos dos laboratórios: Dina, Jonson e Adriano, por facilitarem muitas etapas do meu trabalho. Adriano por aliviar os efeitos de tanto eu pipetar.

Aos meus colegas de laboratório: Adam, Cleyton, Carla, Deyla, Daniela, Ed, Eduardo, Fabíola, Fabinho, Jackeline, Kelmer, Igor, Natasha, Olavo, Nicole, Pedro, Marina, Maria Dóris e Rafaela, que direta ou indiretamente me ajudaram, além de partilhar comigo momentos agradáveis e construtivos.

À SEPROR, EMBRAPA, IPAAM e IBAMA, pelas informações importantes para realizar a discussão deste trabalho.

Muito obrigada!

RESUMO

O ecossistema de várzea amazônica abriga e sustenta a maior parte dos estoques de peixes de importância comercial, como o tambaqui *Colossoma macropomum*. Este peixe é o maior caracídeo da Amazônia e é muito apreciado como alimento pela população local. Atualmente corresponde com 70% da piscicultura regional, mas apesar da crescente produtividade cultivada, esta espécie na natureza vem experimentando uma intensa sobre-exploração. Para gerenciar os estoques naturais de tambaqui é necessário acessar um conjunto de informações de diversas áreas do conhecimento e, concernente à genética, é de fundamental importância acessar a variabilidade genética e a forma como esta variabilidade está distribuída ao longo da região Amazônica. Estas informações são importantes para direcionar estratégias de manejo e conservação para espécie. Para obter tais informações, foram utilizados marcadores moleculares mitocondriais (região controle e gene da ATPase) e nucleares (microssatélites). No presente estudo foram isolados 14 locos de microssatélites altamente polimórficos para tambaqui. Estes marcadores moleculares foram transferidos com sucesso para outras espécies de serrasalmídeos. Para a caracterização genética do tambaqui, 21 localidades foram amostradas na bacia Amazônica, e 1561 pb (região controle + gene da ATPase) foram seqüenciados em 539 indivíduos. Foram encontrados 444 haplótipos, sendo que 440 foram únicos. A diversidade haplotípica foi alta e relativamente homogênea para todas as localidades, mas foi menor em Porto Velho. Para dados de microssatélites foram utilizados 12 locos em 604 indivíduos, sendo encontrada uma média de 21,4 alelos por loco. A H_E total foi de 0,78, sendo em geral, homogênea para as localidades amostrada. Para Porto Velho e Guaporé a H_E apresentou os menores valores. Estes resultados sugerem altos níveis de variabilidade genética em tambaqui. AMOVA e as demais análises para detectar estrutura populacional, com base em ambos marcadores, indicaram que dentro da bacia Amazônica brasileira o tambaqui forma uma única e grande população, suportado por um intenso fluxo gênico entre as localidades. Estes resultados indicam que o manejo da espécie nesta área pode ser unificado. Considerando toda a amostragem do estudo, evidenciou-se um cenário de metapopulação entre as bacias hidrográficas brasileiras e bolivianas. As corredeiras presentes nos rios Tapajós e Madeira não representam uma barreira ao fluxo gênico entre as amostras populacionais de tambaqui. Uma estabilidade populacional foi detectada para a bacia Boliviana e uma expansão para a bacia Amazônica, suportado pelo grande número de haplótipos únicos e a presença de alelos exclusivos nas localidades brasileiras. As taxas de migração foram maiores das localidades dos tributários de água branca para a calha principal, e desta para o rio Tapajós. Os dados genéticos podem estar configurando a migração reprodutiva ou uma dinâmica nos movimentos da espécie. O tamanho efetivo populacional (N_e) foi maior na calha principal, no rio Tapajós e no rio Purus. Não foram detectados sinais de sobre-exploração devido à alta diversidade genética encontrada. No entanto estes achados podem estar mostrando um *status* histórico da espécie compatível a um enorme tamanho efetivo populacional no passado ou que o tempo de sobre-exploração pode ainda ser curto para um registro genético.

Palavras-chave: DNAm, microssatélites, tambaqui, variabilidade genética, panmixia, demografia histórica.

ABSTRACT

The floodplain ecosystem shelters and supports most of the fish stocks of commercial importance, such as the tambaqui, *Colossoma macropomum*, which is considered a key species of this ecosystem. This fish is the largest characin of the Amazon and it is highly appreciated as food by the local population. Currently the tambaqui represents 70% of the regional pisciculture, but despite increasing aquaculture output, wild populations have been experiencing severe over-exploitation. To manage natural stocks of tambaqui it is necessary to access a range of information from diverse areas of knowledge, including genetics. It is thus of fundamental importance to access levels of genetic variability and how this variability is distributed throughout the Amazon region where the species occurs. This information is necessary to guide management strategies and conservation of this species. To obtain such information, mitochondrial (control region and ATPase gene) and nuclear (microsatellites) molecular markers were used. In this study 14 highly polymorphic microsatellite loci for the tambaqui were developed. These molecular markers were successfully transferred to other species of serrasalmids. For the genetic characterization of the tambaqui, 21 localities in the Amazon basin were sampled. We sequenced 1561pb (control region + ATPase gene) from 539 individuals finding 444 haplotypes, of which 440 were unique. The haplotype diversity was high and relatively homogeneous among all localities, however diversity was smallest in Porto Velho. Data from 12 microsatellite loci were collected from 604 individuals, showing an average of 21,4 alleles per locus. Total H_E was 0,78 and heterozygosity levels were homogeneous among sampled localities. Porto Velho and Guaporé showed lower values of H_E . These results suggest high levels of genetic variability in the tambaqui. AMOVA and other tests to detect population structure based on both markers indicated that within the Brazilian Amazon basin, the tambaqui comprises a single large population, supported by high gene flow between localities. These results indicate that species management in this area can be unified. Considering the entire sampling scheme, the data suggest a metapopulation scenario between the Brazilian and Bolivian basins, with low genetic differentiation between the basins and restricted gene flow due to isolation by distance. The rapids of the Tapajós and Madeira Rivers are not barriers to gene flow among population samples of tambaqui. A demographically stable population was detected in the Bolivian basin and a historical demographic expansion in the Amazon basin, supported by the large number of haplotypes and the presence of unique alleles in Brazilian localities. The migration rates were higher from white water tributaries to the main channel, while the opposite was true for the clear waters of Tapajós River. The effective population size (N_e) was greater in the channel, and in Jacareacanga and Boca do Acre. Genetic effects of over-exploitation were not detected in the tambaqui due to the high genetic diversity found. However, these findings are showing the historical status compatible with a large effective population size of the species in the past since the time of over-exploitation is still be short to be registered genetically.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1 A bacia Amazônica.....	3
2.2 A espécie alvo do estudo.....	4
2.3 A biologia do tabaqui.....	5
2.4 O potencial econômico do tabaqui.....	9
2.5 A variabilidade genética.....	12
2.6 O DNA mitocondrial (DNAMt).....	15
2.6.1 A região controle (<i>D-loop</i>).....	18
2.6.2 O gene da ATPase.....	20
2.7 Marcadores Microssatélites.....	21
CAPÍTULO I: Marcadores Microssatélites para tabaqui (<i>Colossoma macropomum</i>, Serrasalimidae, Characiformes) uma espécie economicamente importante e espécie-chave da várzea Amazônica	25
1. INTRODUÇÃO	26
2. OBJETIVOS	27
2.1 Objetivo Geral.....	27
2.2 Objetivos específicos.....	27
3. MATERIAL E MÉTODOS	28
3.1 Isolamento de regiões de microssatélites para tabaqui.....	28
3.2 Preparação dos adaptadores e sua ligação aos fragmentos de DNA genômico.....	28
3.3 Hibridização dos microssatélites.....	29
3.4 Ligação dos fragmentos selecionados ao plasmídeo vetor e clonagem.....	29

3.5 Seqüenciamento dos clones.....	30
3.6 Desenho dos <i>primers</i> e teste de polimorfismo.....	31
3.7 Caracterização dos microssatélites.....	33
4. RESULTADOS.....	33
4.1 Isolamento e Caracterização de locos microssatélites para tambaqui.....	33
4.2 Transferibilidade dos locos microssatélites de tambaqui.....	35
 CAPÍTULO II: Caracterização genética das populações naturais de tambaqui <i>Colossoma macropomum</i>, na bacia Amazônica através de marcadores moleculares mitocondriais e microssatélites.....	36
1. INTRODUÇÃO.....	37
2. OBJETIVOS.....	40
2.1 Objetivo Geral.....	40
2.2 Objetivos específicos.....	40
3. MATERIAL E MÉTODOS	41
3.1 Amostras populacionais e suas localidades.....	41
3.2 Extração e quantificação do DNA de tambaqui.....	43
3.3 Amplificação e Purificação do DNA mitocondrial.....	43
3.4 Seqüenciamento da região controle e do gene da ATPase.....	44
3.5 Genotipagens das amostras de tambaqui.....	45
3.6 Reação de genotipagem.....	47
3.7 Análises estatísticas populacionais.....	48
 DNA mitocondrial	
3.7.1 Diversidade molecular das seqüências nucleotídicas.....	49
3.7.2 Distribuição da diversidade genética.....	49
3.7.3 A distribuição dos haplótipos de tambaqui.....	51
3.7.4 Tamanho efetivo populacional (Ne) e Fluxo gênico.....	52
3.7.5 Testes de Neutralidade e Demografia Populacional.....	53

Microssatélites	
3.7.6 Estimativa dos tamanhos dos alelos e Parâmetros genéticos.....	54
3.7.7 Análises de estrutura populacional.....	55
3.7.8 Demografia, Tamanho efetivo populacional e Fluxo gênico.....	57
4. RESULTADOS.....	60
O DNA mitocondrial	
4.1 A diversidade molecular do tabaqui.....	60
4.2 Análise e distribuição dos haplótipos.....	63
4.3 A diversidade genética do tabaqui.....	66
4.4 A distribuição da diversidade genética.....	68
4.5 Testes de neutralidade e Demografia populacional.....	77
Microssatélites	
4.6 A diversidade genética do tabaqui.....	80
4.7 A distribuição da diversidade genética de tabaqui.....	91
4.8 Demografia, Tamanho efetivo populacional e Fluxo gênico.....	96
5. DISCUSSÃO.....	100
5.1 A Variabilidade genética do tabaqui.....	100
5.2 Estrutura populacional – Distribuição da variabilidade genética.....	107
5.3 Panmixia do tabaqui na bacia Amazônica brasileira.....	111
5.4 Demografia histórica do tabaqui.....	115
5.5 Migração.....	118
5.6 Tamanho efetivo populacional e as estatísticas de desembarque pesqueiro.....	122
5.7 O cenário atual da piscicultura do tabaqui.....	126
5.8 Contribuição para Conservação e Manejo do tabaqui.....	130
5.9 Propondo uma ampliação na distribuição geográfica do tabaqui.....	133
6. CONCLUSÕES GERAIS.....	136
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	138
ANEXO.....	156

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	<i>Colossoma macropomum</i> , o tambaqui.....	1
Figura 2.	Mapa com a distribuição geográfica do tambaqui.....	7
Figura 3.	Modelo esquemático para as migrações reprodutivas de tambaqui na Amazônia Central.....	8
Figura 4.	Tambaqui comercializado na feira Manaus Moderna.....	10
Figura 5.	Esquema gráfico do DNA mitocondrial de peixe.....	17
Figura 6.	Mapa geográfico da bacia Amazônica com as localidades amostradas.....	42
Figura 7.	Sistema <i>multiplex</i> visualizado do <i>software GeneMapper</i>	45
Figura 8.	Esquema da região controle do DNA mitocondrial, evidenciando os três domínios e suas regiões.....	62
Figura 9.	Esquema gráfico do compartilhamento de haplótipos entre as localidades amostradas.....	65
Figura 10.	Resultado da SAMOVA para DNAMt.....	71
Figura 11.	Agrupamento formado pelo programa BAPS 5.1.....	74
Figura 12.	Ausência de estrutura populacional, resultado do BAPS 5.1.....	75
Figura 13.	Árvore de distribuição dos haplótipos.....	76
Figura 14.	Padrão da distribuição das frequências das diferenças par a par (<i>mismatch distribution</i>) observada e esperada para tambaqui.....	78
Figura 15.	Resultados dos parâmetros da análise Bayesiana do programa BEAST convertidos, mostrando um forte sinal de expansão populacional.....	78
Figura 16.	Resultado da SAMOVA para dados microssatélites.....	94
Figura 17.	Resultado do STRUCTURE, mostrando uma única população.....	95
Figura 18.	Esquema ilustrativo indicando o sentido da maior taxa de migração e a diferença entre a promédia do número de indivíduos que saem e entram na população com base nos resultados do programa IMA2.....	98
Figura 19.	Distribuição geográfica de tambaqui vigente.....	135
Figura 20.	Distribuição geográfica proposta por este estudo para tambaqui.....	135

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Caracterização de 14 locos microssatélites de 25 indivíduos de <i>Colossoma macropomum</i>	34
Tabela 2.	Transferibilidade de 14 locos microssatélites desenvolvidos de <i>Colossoma macropomum</i> para outras espécies de serrasalmídeos.....	35
Tabela 3.	Localidades amostradas para <i>Colossoma macropomum</i>	41
Tabela 4.	<i>Primers</i> utilizados para amplificação e seqüenciamento da região controle e do gene da ATPase do DNA mitocondrial de tambaqui.....	44
Tabela 5.	Sistema <i>multiplex</i> nas PCRs de genotipagens das amostras de tambaqui.....	45
Tabela 6.	Indivíduos que apresentaram eventos de inserções e/ou deleções na região controle do DNAm.....	61
Tabela 7.	Lista dos 44 haplótipos compartilhados de tambaqui e suas quantidades entre as localidades amostradas.....	64
Tabela 8.	Diversidade genética por drenagem amostrada.....	66
Tabela 9.	Parâmetros genéticos estimados para <i>Colossoma macropomum</i> , com dados de DNAm.....	67
Tabela 10.	Análise da variância molecular AMOVA para dados de DNAm.....	68
Tabela 11.	Valores de Φ_{ST} par a par entre as localidades amostradas com dados de DNAm.....	69
Tabela 12.	Fluxo gênico a partir dos valores de Nm par a par entre as localidades amostradas com dados de DNAm.....	70
Tabela 13.	Valores de Φ_{ST} par a par entre os rios amostradas com dados de DNAm.....	71
Tabela 14.	Divergência genética entre os <i>clusters</i> sugerido pelo programa BAPS.....	73
Tabela 15.	Parâmetros demográficos estimados para <i>Colossoma macropomum</i>	79
Tabela 16.	Índices genéticos para os 12 locos de microssatélites.....	81
Tabela 17.	Alelos exclusivos representados pelo número de repetições.....	83

Tabela 18.	Parâmetros genéticos para cada localidade amostrada utilizando 12 locos de microssatélites.....	84
Tabela 19.	Índices de diversidade genética resultantes de 13 locos de microssatélites para todas as localidades amostradas.....	87
Tabela 20.	Análise da variância molecular AMOVA para tambaqui com dados microssatélites.....	91
Tabela 21.	Valores de F_{ST} par a par entre as localidades amostradas com dados microssatélites.....	92
Tabela 22.	Parâmetros genéticos estimados pela análise de coalescência no programa IMA2 para dados microssatélites.....	97
Tabela 23.	Parâmetros demográficos estimados a partir dos parâmetros genéticos utilizando o programa IMA2 para dados microssatélites...	97
Tabela 24.	Comparações de índices de variabilidade genética obtidos de DNAMt para tambaqui e outras espécies de peixes amazônicos.....	101
Tabela 25.	Comparações de índices de variabilidade genética obtidos de marcadores microssatélites entre tambaqui e outras espécies de peixes.....	101

1. INTRODUÇÃO

A Amazônia possui um rico sistema hídrico, que, por conseguinte, abriga a maior e mais diversa ictiofauna de água doce do mundo. Soares *et al.* (2008) estimam a existência na bacia Amazônica de mais da metade de espécies de peixes relatada por Reis *et al.* (2003) para a região Neotropical que foi de 4475 espécies descritas. O fascinante suprimento de água, nesta região, além de ser um grande potencial para a produção piscícola, também representa o habitat de um grande número de espécies de peixes usados como fonte de alimento. Neste contexto, destaca-se pelo alto potencial econômico para a região Amazônica, o tambaqui (*Colossoma macropomum*).



Figura 1. *Colossoma macropomum*, o tambaqui. Fotografia de Barthem e Goulding (2007).

Esta espécie tem como principais qualidades a consistência e o sabor da carne, a adaptabilidade ao cativeiro, a boa aceitação do mercado consumidor, a alta prolificidade, o hábito alimentar onívoro (mas, quando adultos alimentam-se de frutos e sementes) e adapta-se muito bem ao policultivo (Araújo-Lima e Goulding, 1998). Apresenta ampla distribuição pelos principais rios da bacia do Orinoco (Novoa, 1990) e da bacia Amazônica (Goulding e Carvalho, 1982), principalmente nos afluentes que drenam meridionalmente a região, certamente participando do equilíbrio ecológico de vários ecossistemas. Por toda sua importância comercial, este peixe vem ao longo dos anos sofrendo sobre exploração, sendo que atualmente os jovens

dessa espécie representam a maior parte das capturas (Barthem e Gouding, 2007). Com o crescimento acelerado da população humana amazônica, principalmente no Estado do Amazonas, uma das conseqüências será a necessidade do aumento da produção pesqueira. Entretanto, esse aumento não deve ser baseado numa maior exploração dos estoques naturais face ao seu declínio, mas no manejo cuidadoso em conjunto com o desenvolvimento eficiente da piscicultura. As recomendações para manejo genético variam de maneira significativa dependendo da estruturação populacional. As populações presentes em diferentes fragmentos de habitat podem ser totalmente isoladas, parcialmente isoladas, podem ser efetivamente uma única população ou podem compor uma metapopulação, dependendo do grau de fluxo gênico (Frankham *et al.* 2002).

Um requisito básico para uma maior probabilidade de sucesso de um programa de seleção ou de reintrodução em espécies ameaçadas é manter a variabilidade genética (Hedrick *et al.* 1986). Deste modo, determinar esta variação é importante tanto para populações naturais quanto para o manejo e a exploração comercial de peixes cultivados. Ao longo da calha principal da bacia Amazônica, o tambaqui apresenta uma alta variabilidade genética (Santos *et al.* 2007), indicando que aparentemente a pesca excessiva ainda não afetou os estoques naturais dessa espécie, ou seja o sinal genético ainda não detectado de redução populacional provavelmente está relacionado ao grande tamanho efetivo populacional de fêmeas da espécie. No entanto, outros marcadores moleculares devem ser usados para confirmar tais achados, como os marcadores microssatélites que têm se mostrado excelente ferramenta para análises em nível intra populacional devido às características de alto polimorfismo, serem multialélicos, co-dominantes e de ampla distribuição no genoma (Lee e Koecher, 1996).

O tambaqui é um peixe amazônico muito importante para a pesca regional e uma das principais espécies da piscicultura brasileira e por isso, estudos genéticos de suas populações na natureza, utilizando dois tipos de marcadores genéticos (DNAmt e microssatélites), mostram-se promissores para análises populacionais e, adicionalmente, para detectar diferentes

processos ecológicos e evolutivos, proporcionando subsídios para piscicultura e direcionamento de políticas públicas ao manejo e conservação da espécie.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 A bacia Amazônica

A bacia Amazônica é o maior sistema hidrográfico do planeta com aproximadamente sete milhões de Km², drenando cerca de 37% do continente Sul Americano. Estende-se por nove países (Brasil, Peru, Bolívia, Colômbia, Equador, Venezuela, Suriname e nas duas Guianas). De toda essa área de drenagem, 63% estão em território brasileiro. Situa-se nos trópicos entre 5° N e 17° S, e sua descarga anual (175.000 m³/seg.) equivale a quase 20% de toda a água doce que deságua no oceano em todo o planeta (Sioli 1975). Três tipos de água principal ocorrem na Amazônia: água branca (barrenta) (pH 6,2 a 7,2), água preta (pH 3,8 a 4,9) e água clara (pH 4,5 a 7,8) (Aride *et al.* 2007), que também apresentam outras diferentes características físico-química.

Os afluentes da margem sul do rio Amazonas, como o Tapajós escoam a partir do escudo brasileiro. O rio Madeira, maior afluente da margem sul, recebe drenagem do oeste e parte do noroeste do escudo brasileiro, mas a maior parte de suas águas são oriundas dos Andes peruano e boliviano. Os rios Purus e Juruá também têm suas origens nos Andes ou próximo dos Andes. Na margem norte do rio Amazonas, afluentes como o rio Parú drenam do sul do escudo da Guiana (Lundberg *et al.* 1998).

O processo de formação da bacia Amazônica é complexo e data de cerca de 15 milhões de anos atrás com a elevação da Cordilheira dos Andes (Lundberg *et al.* 1998). Nos milhões de anos subseqüentes à elevação, esta região tem sofrido grandes mudanças geológicas e ambientais. O levantamento da cordilheira andina produziu uma diversidade de ambientes aquáticos com aspectos ecológicos diferentes (Hoorn, 1994), que juntamente com outros fenômenos geológicos e variações sazonais ambientais influenciaram os processos evolutivos e de diversificação de alguns grupos de animais como os mamíferos, os répteis e, principalmente, os peixes como, por exemplo, os membros da família Characidae, (Lundberg *et al.* 1998). Então esta complexa

inter-relação de fatores climáticos, tectônicos e paleoambientais ocorridos nos últimos estágios de evolução geológica na Amazônia pode ter motivado a evolução de sua biodiversidade (Rossetti *et al.* 2004).

Atualmente, a bacia do Solimões-Amazonas é um típico sistema de grande rio com amplas planícies adjacentes, submetida a um ciclo hidrológico previsível com inundações anuais (Soares *et al.* 2008). Este sistema hidrográfico é complexo e formado por um contingente de rios, lagos de planícies inundáveis, remansos, canais, igarapés e ilhas (Irion *et al.* 1997), destacando uma enorme área inundável denominada localmente como várzea. Há estimativa de 60.000 a 100.000 Km² de floresta de várzea na Amazônia brasileira (Junk, 1997) e uma amplitude média de inundação na Amazônia Central de 10 m (Junk, 1989).

Na várzea, a alternância entre as fases terrestre e aquática resulta em modificações drásticas nas condições ambientais, com profundas implicações no ciclo de vida das plantas e dos animais (Junk, 1997). Os peixes, em geral, são bastante adaptados ao ecossistema amazônico mesmo para espécies com tamanho, forma e estratégia de vida variada (Soares *et al.* 2008). Dessa forma, a heterogeneidade de ambientes associada com as variações sazonais e diárias desta bacia é que mantém a maior ictiofauna de água doce do mundo. Para muitas espécies de peixe, como o tambaqui, a floresta de várzea é a principal fonte de comida e a variação do nível das águas tem implicações diretas no seu ciclo de vida. Val e Almeida-Val (1995) reportaram que o caráter oscilante dos níveis de água constitui o mais importante parâmetro ambiental da Amazônia, afetando a interação dos organismos com o ambiente. O aumento da densidade demográfica frente a novos ciclos de desenvolvimento regionais cria a possibilidade de degradação ambiental como uma nova preocupação tal como o impacto direto da pesca com relação à conservação da biodiversidade de peixes.

2.2 A espécie alvo do estudo

O tambaqui é um Characiforme, grupo de peixes que ocorrem em ambientes de água doce, distribuindo-se no continente americano desde a fronteira México-Estados Unidos até o sul da Argentina e no continente

Africano (Lucena, 1993). Este grupo de peixes corresponde a 43% da ictiofauna Amazônica (Barthem e Fabré, 2004). Dentro desta ordem, o tambaqui pertence à família Characidae, com alta diversidade de espécies e ampla distribuição, e à subfamília Serrasalminae, que só é encontrada na América do Sul (Greenwood *et al.* 1966; Britski, 1977 e Machado-Allison, 1982). Alguns autores consideram que os serrasalmídeos têm características suficientes para ocupar uma posição taxonômica de família (Géry, 1972, 1977, 1984; Jégu e Santos, 1987, 1988; Jégu *et al.* 1991, Calcagnotto *et al.* 2005), e recente revisão taxonômica apontam 15 gêneros e 80 espécies (Reis *et al.* 2003), para a região Neotropical e consideram que sua presença em outras partes do mundo é resultado de introdução.

A subfamília Serrasalminae compreende um grupo de peixes que ainda têm sua taxonomia mal definida. Para Araújo-Lima e Goulding (1998), a classificação do tambaqui (*Colossoma macropomum*), dos pacus, das piranhas e de outras várias espécies de peixes amazônicos é confusa. Hipóteses filogenéticas para esta subfamília, com base em caracteres morfológicos mostraram *Colossoma* como grupo-irmão de *Piaractus* (Machado-Alison, 1982), enquanto que com base em seqüência de genes mitocondriais e nucleares, *Mylossoma* é que está mais relacionado com *Colossoma* (Calcagnotto *et al.* 2005, Ortí *et al.* 2008).

A bacia Amazônica abrange todos os gêneros de serrasalmídeos, sendo que os mais importantes para pesca comercial e piscicultura são *Colossoma*, *Piaractus* e *Mylossoma* (Reis *et al.* 2003). O tambaqui jovem parece com os pacus adultos na forma geral e ocasionalmente podem ser confundidos com piranhas e a pirapitinga (Araújo-Lima e Goulding, 1998). Existe ainda um grande número de outras espécies na subfamília Serrasalminae que não são comercializadas, mas que contribuem para a manutenção dos ecossistemas aquáticos amazônicos.

2.3 A biologia do tambaqui

O tambaqui é um típico peixe amazônico que apresenta sua biologia especialmente adaptada às condições especiais encontradas nesse

ecossistema. Este peixe é o maior caracídeo da Amazônia, alcança comprimentos maiores que 1m e peso superior a 30 Kg, sofrendo mudanças morfológicas consideráveis à medida que cresce (Goulding e Carvalho, 1982).

Embora não seja o único peixe amazônico que mereça atenção especial, é a primeira espécie a qual se conhece o suficiente, ressalvo as inferências genéticas, para manejar os estoques naturais e para criação em cativeiro. Vários pesquisadores vêm estudando esta espécie sob diferentes aspectos: biológicos (Carvalho, 1981; Goulding e Carvalho, 1982; Machado-Allison, 1982; Freitas e Gurgel, 1985; Bello *et al.* 1989; Heredia e González, 1990; Gunther e Boza, 1993; Moreira, 1997; Araújo-Lima e Goulding 1998), fisiológicos (Saint-Paul, 1983; Almeida-Val e Val, 1993; Almeida-Val *et al.* 1996; Aride *et al.* 2007, Kochhann, 2010) produção em cativeiro (Silva *et al.* 1975; Saint-Paul, 1990), dinâmica populacional em ambientes naturais (Goulding e Carvalho, 1982; Petrere Jr., 1983; Ruffino e Isaac, 1994; Isaac e Ruffino, 1996, Loubens e Panfili, 1997; Reinert e Winter, 2002), citogenéticos (Kossoswki *et al.* 1983; Almeida-Toledo *et al.* 1987; García-Parra, 2000), genéticos (Teixeira e Jamieson, 1985; Leitão, 1998; Calcagnotto e Toledo-Filho, 2000; Santos *et al.* 2007; Farias *et al.* 2010) e biotecnológicos (Bezerra *et al.* 2001; Sousa, 2009).

O tambaqui é um peixe essencialmente de águas tropicais, distribuindo-se largamente pelos principais rios da bacia do Orinoco (Novoa *et al.* 1984; Novoa, 1990) e da bacia Amazônica (Goulding, 1980; Goulding e Carvalho, 1982), como o Solimões-Amazonas e o rio Madeira e ainda em outros afluentes que drenam meridionalmente a Amazônia Central (Figura 2). Araújo-Lima e Goulding (1998) destacam que esta espécie depende da água barrenta, ou de algum componente ecológico associado a ela, para sua sobrevivência. Em termos de geografia política a espécie habita a Venezuela, Colômbia, Peru e Bolívia, com as mais variadas denominações tais como: cachama (na Colômbia), gamitana (no Perú) ou pacu (na Bolívia). Atualmente é encontrado também em Cuba, República Dominicana, Honduras, Jamaica e Panamá, mas resultado de introdução (Reis *et al.* 2003).

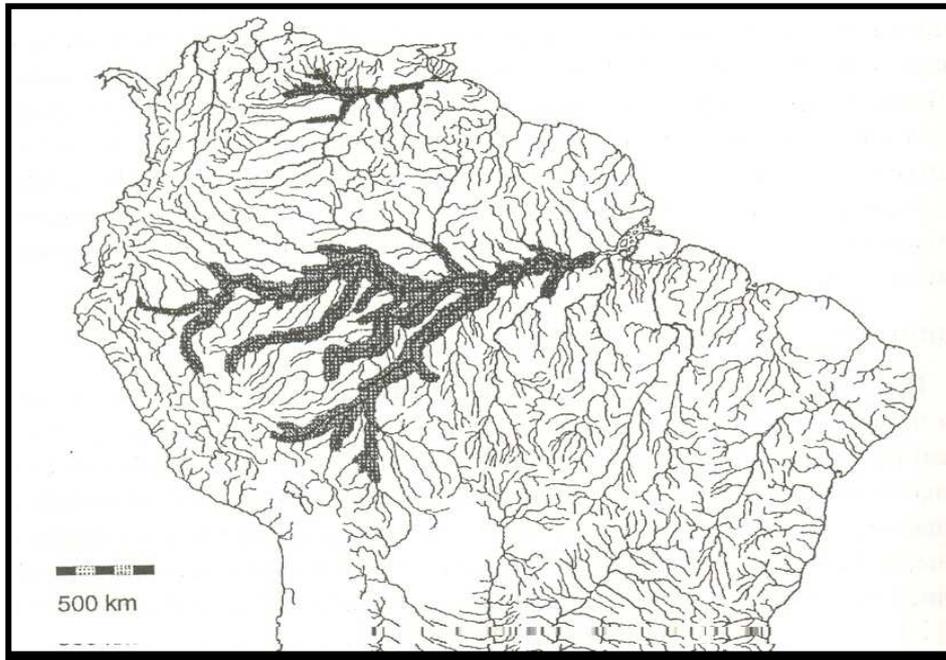


Figura 2. Mapa com a distribuição geográfica do tambaqui (Araújo-Lima e Goulding, 1998)

As populações jovens de tambaqui são restritas às planícies inundadas e aos lagos de várzea da bacia Amazônica. Com a chegada do período das chuvas dá-se o início a migração reprodutiva, durante a qual os peixes adultos procuram o canal principal dos rios para desovarem. No período da seca, o canal principal é usado como refúgio principalmente pelos adultos (Araújo-Lima e Goulding, 1998).

A reprodução ocorre no período em que as águas dos rios apresentam maior volume (Castagnolli, 1992), geralmente em fevereiro/março, devido à expansão da área de vegetação submersa fornecendo abrigo contra predadores e suprimento alimentar para os indivíduos recém eclodidos. Goulding (1979) e Araújo-Lima (1984) acrescentam que a espécie desova em algum ambiente no rio principal, acreditando-se que os ovos fertilizados e as larvas sejam carregados rio abaixo para alcançarem a tempo a várzea recém-chegada, onde se desenvolvem (Figura 3). Araújo-Lima e Goulding (1998) sugerem que o nível dos rios e outros fatores ambientais induzem a maturação de suas gônadas nas populações silvestres. As fêmeas iniciam processo de maturação sexual entre 55 e 61 cm de comprimento, com idade média entre

3,5 a 5 anos (Isaac e Ruffino, 2000). É uma maturação tardia se comparada com outras espécies amazônicas, o que implica um custo para uma população explorada, pois, um grande número de indivíduos pode estar sendo capturado sem nunca terem se reproduzido, o que influencia na capacidade da população de suportar a pesca intensiva.

A desova é total e a fecundação externa com uma fecundidade que varia de 1.007.000 a 1.200.000 ovócitos (Araújo-Lima e Goulding 1998; Vieira *et al.* 1999) e a proporção sexual é praticamente 1:1 (Vieira *et al.* 1999). A alta fecundidade desta espécie justifica-se por não apresentar cuidado parental e muitas de suas larvas não conseguem chegar até as áreas de várzea, ficando mais sujeitas a não sobreviver por falta de alimentação no canal dos rios (Wootton, 1992).

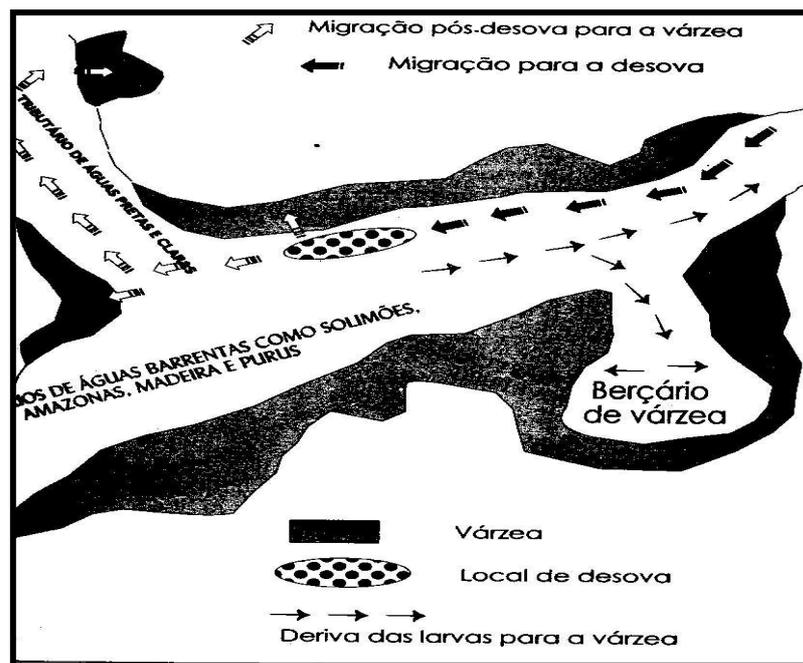


Figura 3. Modelo esquemático para as migrações reprodutivas de tambaqui na Amazônia Central (Araújo-Lima e Goulding, 1998).

Na natureza, a alimentação dos juvenis baseia-se em algas filamentosas, insetos e uma grande variedade de vegetais superiores e os

adultos consomem principalmente frutos, sementes e zooplâncton (Goulding, 1979; Carvalho, 1981; Goulding e Carvalho, 1982; Moreira, 1997, Araújo-Lima e Goulding, 1998), por isso a floresta de várzea constitui a principal fonte de comida para esta espécie. O potencial nutricional e sabor peculiar da carne desse peixe é devido à sua dieta se basear principalmente em frutos e sementes. Gunther e Boza (1993) destacam que a taxa de crescimento depende, entre alguns fatores, da quantidade e qualidade de proteína na dieta dessa espécie. O crescimento é assimétrico, sendo que durante a cheia é mais rápido devido à abundância de alimento na floresta inundada. No período da seca ocorre escassez de alimento, tornando seu crescimento mais lento (Araújo-Lima e Goulding, 1998), passando por longos períodos de privação alimentar, momento em que se utiliza das reservas de gordura acumuladas durante o período de cheia (Santos *et al.* 2006).

Das espécies de grande porte conhecidas, o tambaqui é a única que possui um sistema de rastros branquiais desenvolvidos e dentes molariformes fortes. Esta combinação anatômica permite que o peixe quebre castanhas e sementes muito duras para então comer a polpa (Kubitzki e Ziburski, 1994), no entanto muitas sementes acabam passando intactas pelo seu trato digestivo e com isso possibilita a dispersão de sementes de muitas espécies de plantas (Araújo-Lima e Goulding, 1998).

2.4 O potencial econômico do tambaqui

Os recursos pesqueiros da Amazônia representam a base de produção de um setor econômico que mobiliza mais de U\$ 200 milhões/ano (Barthem e Fabré, 2003). Isto porque o peixe é o recurso mais promissor para aumentar significativamente a produção de proteína animal na bacia Amazônica e também o principal gerador de renda para os caboclos ao longo dos rios.

O tambaqui é uma das espécies de peixes mais apreciada pela população local, sendo considerado como alimento de primeira classe. Apresenta-se como uma referência na culinária amazônica e ascendente

destaque na culinária nacional e internacional, devido sua carne apresentar excelente sabor e consistência. A carne do tambaqui é bem magra. O teor de lipídio no tecido muscular do indivíduo silvestre é menos de 1,5% (Junk, 1985), no entanto, no peixe cultivado aumenta para 2-6% (Freitas e Gurgel, 1985; Lanoue e Choubert, 1993). O valor de comercialização apresenta oscilações, mas em geral é encontrado em uma média de U\$ 5/Kg, podendo atingir valores expressivos para indivíduos acima de 15 kg, como este na fotografia abaixo (Figura 4).

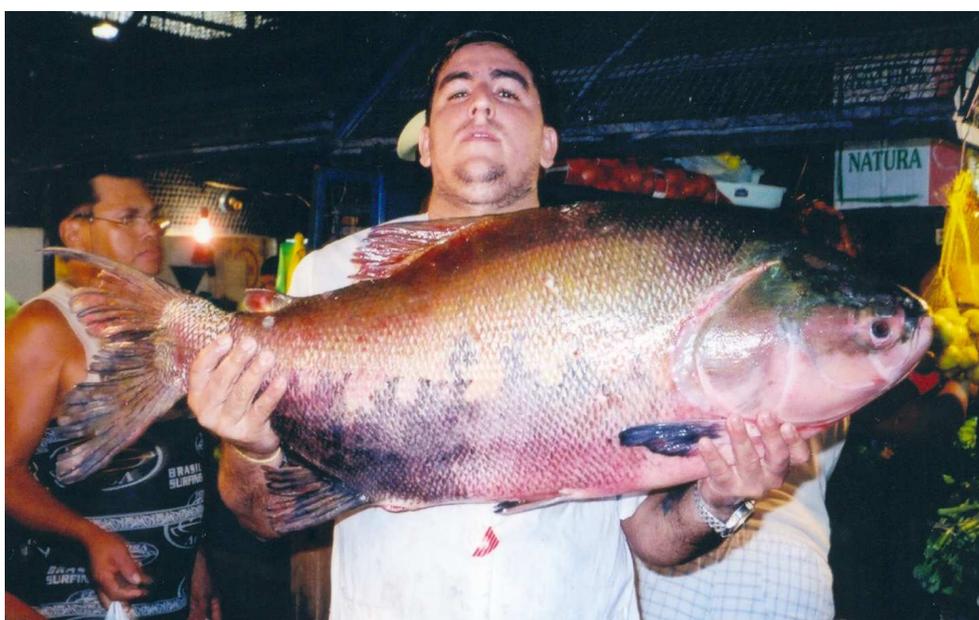


Figura 4. Tambaqui comercializado na feira Manaus Moderna (Janeiro de 2004, Manaus-AM)

No Estado do Amazonas, a pesca do tambaqui se dá numa área que cobre toda a extensão da planície de inundação do rio Solimões-Amazonas (Merona e Bittencourt, 1988). Representa elevada importância na pesca comercial nos rios Solimões, Madeira, Purus, Juruá e Japurá (Goulding, 1979).

Em meados dos anos 70, esta espécie sozinha era responsável por mais de 40% de todo pescado consumido em Manaus (Petreire Jr., 1983). No entanto, na década de 80 ocorreu um grande declínio na captura do tambaqui para 20,39% (principalmente adulto), o que levou a uma suspeita de sobre

pesca da espécie (Merona e Bittencourt, 1988). De fato, ao longo dos anos, tem sido constatada, uma contínua diminuição no desembarque pesqueiro dessa espécie que nos anos 90, decresceu para 9% (Batista, 1998) e no ano 2003, em nove municípios monitorados pelo IBAMA no Estado do Amazonas atingiu somente 1,96% da produção pesqueira total (Ruffino *et al.* 2006). Além disso, os indivíduos capturados desta espécie em 2001, 2002 e 2003 apresentaram uma média de comprimento furcal de 45 cm (Pro-Várzea-IBAMA, comunicação pessoal), ou seja, inferior aos 55 cm que corresponde ao tamanho necessário para o peixe atingir sua primeira maturação sexual. Essa comercialização de peixes jovens é danosa ao potencial reprodutivo da espécie, pois reduz o estoque desovante (Issac e Ruffino, 1996) e minimiza a produtividade dos pescadores.

Estes valores indicam sinais claros de declínio na captura, um efeito da sobre pesca, cuja conseqüência é haver um maior esforço de pesca em busca por locais pouco explorados para capturar tambaqui, encarecendo o valor do pescado (Batista, 1998), e ainda levaria a aniquilação dos estoques naturais. Na tentativa de conter a situação de sobre exploração, o tambaqui vem sendo protegido pela legislação ambiental (IBAMA) por meio da Portaria Nº8 de 2 de fevereiro de 1996 que proíbe a captura inferior a 55 cm de comprimento e da Instrução Normativa Nº 35 de 29 de setembro de 2005 que estabelece período de defeso de 1º de outubro a 31 de março na bacia hidrográfica do rio Amazonas.

No entanto, uma forma de reduzir a pressão sobre as populações naturais e ainda produzir alimento com valores mais acessíveis é a criação de peixes em cativeiro. Neste seguimento, o tambaqui tem se destacado como a espécie brasileira mais indicada para o policultivo, pela capacidade de aproveitar vários tipos de alimentos disponíveis no viveiro, e sua plasticidade fenotípica como tolerar baixas concentrações de oxigênio dissolvido na água. Atualmente representa a maior produção na piscicultura regional com tendência a ultrapassar a produção pesqueira no Estado do Amazonas. Em 2003, a piscicultura no Estado teve uma produção estimada de 3.130 toneladas de tambaqui (IBAMA, 2004), contra 709,7 toneladas oriundas da natureza (Ruffino *et al.* 2006). Se considerado às condições físicas ambientais da região

Amazônica, a produção de tambaqui no cativeiro pode ser muito maior e mais rentável, desde que sejam adotados planejamentos, investimentos e organização do setor. Pesquisas na área biotecnológicas utilizando o próprio tambaqui, mostram-se bastante promissoras para impulsionar a piscicultura, seja desenvolvendo tecnologias através de ação enzimática de proteases para o desenvolvimento de melhores farinhas de peixes e melhor aproveitamento de seus subprodutos (Bezerra *et al.* 2001) ou a utilização do hormônio de crescimento desta espécie, que foi isolado e expressado, podendo ser aplicado como fator de aceleração no crescimento de peixes na piscicultura (Sousa, 2009).

O melhoramento genético é outra metodologia que tem mostrado um potencial de ganho de crescimento de 15% por geração na piscicultura brasileira (EMBRAPA). Para condução de uma seleção dirigida é necessário a identificação da variabilidade genética da espécie de interesse, que no caso, foi uma das propostas deste estudo. Embora a melhoria de algumas qualidades produtiva específica, induza a diminuição da variabilidade genética, é extremamente importante manter níveis aceitáveis de variação para sobrevivência das populações confinadas, pois ao contrário traduziria diretamente em contratempo na piscicultura.

2.5 A variabilidade genética

A variabilidade ou diversidade genética é a variedade de alelos e genótipos presente no grupo sob estudo, e constitui a força que dá às populações capacidade de suportar pressões ambientais, diminuindo o risco de extinção. Pode ser medida usando-se estimativas genéticas como polimorfismo, heterozogosidade média e diversidade alélica (Frankham *et al.* 2002). Assim, como as condições ambientais podem variar de forma não previsível, quanto maior o repertório de alelos diferentes em uma população maior será as chances dos indivíduos dessa população sobreviverem a essas variações.

As populações naturais normalmente têm níveis altos de variabilidade genética e essa variação é introduzida por mutação ou migração de indivíduos de outras populações e é perdida por deriva genética, endocruzamento e seleção natural. A alta variação também está relacionada a um grande tamanho populacional, ambientes heterogêneos e características ligadas à história de vida da espécie que favorece um crescimento populacional rápido (Nei, 1987; Frankham *et al.* 2002). As quantidades relativas de variações dentro e entre populações mudam de espécie para espécie, dependendo da história evolutiva e do ambiente (Griffiths *et al.* 2001). Para que haja evolução adaptativa, a variação genética torna-se uma condição fundamental entre as populações e entre espécies.

A determinação da variabilidade genética é importante tanto para populações naturais quanto para manejo e comercialização de peixes cultivados. Isto é significativo uma vez que pode mostrar a relação genética entre indivíduos, populações e até mesmo em espécies diferentes (Ferguson *et al.* 1995). Muir e Roberts (1993) acrescentam a necessidade de uma previsão para manter a variabilidade genética do estoque, pois tanto a seleção intencional quanto a não intencional afetam os níveis de variabilidade da população.

A redução da diversidade genética em populações naturais é decorrente basicamente das modificações naturais no meio ambiente e/ou da ação antrópica, cujas conseqüências são efeitos genéticos como endogamia, “efeito gargalo de garrafa” e alterações no padrão do fluxo gênico (Frankham *et al.* 2002). Esta situação é muito preocupante em populações confinadas como as criadas em cativeiro, pois aumentam as chances de endocruzamento, diminuindo a variação genética, tornando os peixes mais vulneráveis a parasitoses, menos tolerantes a mudanças ambientais, menor sucesso reprodutivo entre outros que só reduzem as chances de sobrevivência.

Concernente às estratégias de manejo e conservação dos recursos pesqueiros da várzea amazônica, fica comprometida se não existem estudos sobre como a variabilidade genética intra e interpopulacional de uma dada espécie está distribuída geograficamente. Estimativas confiáveis da diferenciação populacional são primordiais na biologia da conservação na qual

se considera a necessidade continuada de entender se as populações são geneticamente isoladas ou se constituem uma única população.

Os níveis de variabilidade genética e divergências genéticas dentro e entre as populações podem ser estimados por intermédio de marcadores genéticos e moleculares. Somente com o acesso dos marcadores genéticos de DNA a partir da década de 80 até a atual, foi possível se obter estimativas mais precisas do grau de variação, estrutura genética e da história evolutiva de populações. A avaliação direta do genótipo permite detectar a ocorrência natural de polimorfismo na seqüência de nucleotídeos do DNA. Assim, as informações contidas no DNA podem ser usadas para estudos filogenéticos, de fluxo gênico, especiação e estruturas de populações. Para o tabaqui, existem poucos trabalhos com enfoque genético e a maioria foi realizado em populações de cativeiro. A seguir será descrito um histórico desses estudos, a começar com a citogenética para a espécie.

O tabaqui apresenta um número diplóide de cromossomos $2n=54$ (Kossowski *et al.* 1983; Almeida-Toledo *et al.* 1987; Garcia-Parra, 2000). O cariótipo desta espécie está constituído por 12 pares de cromossomos tipo metacêntrico e 15 pares do tipo submetacêntrico. A heterocromatina constitutiva (bandas C) encontra-se na região pericentromérica da maioria dos cromossomos. A região organizadora de nucléolo (RON) apresenta-se localizada em posição terminal nos braços longos de 2 pares de cromossomos metacêntricos (Garcia-Parra, 2000).

Teixeira e Jamieson (1985) analisaram a diversidade alélica no loco da transferrina na amostra populacional constituída por 103 espécimens de tabaqui do lago Manaquiri na região Amazônica. Foi constatado um total de seis alelos co-dominantes, indicando a ocorrência de um único estoque geneticamente equilibrado. Calcagnotto e Toledo-Filho (2000) também utilizaram este marcador genético-bioquímico (transferrina) para caracterizar geneticamente cinco estoques cultivados de tabaqui. Eles detectaram três alelos no estoque mais antigo cultivado, enquanto que nos outros quatro estoques derivados do mais antigo foi detectada a presença de apenas um alelo fixado para a transferrina, indicando a necessidade de adoção de estratégias de manejo para aumentar o potencial genético desses estoques.

Leitão (1998) analisou nove sistemas isoenzimáticos para *Colossoma macropomum* silvestres e cultivados. Os índices de heterozigidade e polimorfismo para os peixes da natureza foram da ordem de 0,125 e 33,33% respectivamente, enquanto que os peixes de cativeiro apresentaram 16,7% de polimorfismo, indicando uma acentuada queda dos locos polimórficos dentro dos seus estoques cultivados.

D' Assunção *et al.* (2003) analisando seqüências do gene de hormônio de crescimento do genoma nuclear de *C. macropomum*, em oito localidades da bacia Amazônica, constataram uma alta variabilidade genética e verificaram que o tambaqui compartilha com os bagres (Siluriformes) a falta de 10 aminoácidos no segmento do éxon 4, do referido gene.

Aliaga (2004) estudou o *C. macropomum* na Amazônia boliviana, utilizando oito íntrons do genoma nuclear, encontrando pouca diferenciação genética entre as populações estudadas provavelmente devido ao isolamento por distância, uma tendência para panmixia naquela região.

Santos *et al.* (2007) estimaram a variabilidade genética de cinco amostras populacionais de tambaqui ao longo da calha principal da bacia Amazônica, através do polimorfismo da região controle do DNA mitocondrial. Uma alta variabilidade genética e um grande fluxo gênico foram constatados para todas as amostras populacionais, indicando que ao menos ao longo do eixo rio Solimões-Amazonas, esta espécie é panmítica.

Farias *et al.* (2010) utilizando a região controle do DNA mitocondrial verificaram que as corredeiras do rio Madeira não representam uma barreira ao fluxo gênico entre os tambaquis da Amazônia brasileira e boliviana e constataram que as taxas de migração são assimétricas, sendo maior no sentido da bacia Amazônica para a bacia Boliviana.

2.6 O DNA mitocondrial (DNAMt)

O genoma mitocondrial é constituído por moléculas circulares de DNA, encontrando-se aderido à matriz interna da mitocôndria. Estas moléculas estão presentes em cópias múltiplas por organela numa organização simples e

com tamanho variado entre as diferentes espécies (Awise *et al.* 1984; Hayashi *et al.* 1985), devido a presença de inserções/deleções (*indels*) e rearranjos de seqüências (Awise, 2004). O DNAm_t é haplóide e sexualmente herdado de linhagem materna, o que permite traçar genealogias de fêmeas de uma população natural (Lasman *et al.* 1981; Awise *et al.* 1986, Awise, 1994). Apresenta facilidade para isolamento, grande número de cópias por célula, e a vantagem de não ser recombinante (Awise *et al.* 1984), proporciona estudo de diferenciação genética recente.

O DNAm_t nos vertebrados, possui seu próprio código genético distinto do código genético nuclear, além de não apresentarem íntrons (Meyer, 1993). Haavie *et al.* (2000) relatam que o tamanho do genoma mitocondrial é menor que o genoma nuclear. No entanto, os genes mitocondriais possuem taxa evolutiva ou de mutação de 5 a 10 vezes maior ($5,7 \times 10^{-8}$ substituição por sítio por geração) que os genes codificantes do genoma nuclear (Perler *et al.* 1980; Brown *et al.* 1982). Isto porque 95% do oxigênio molecular metabolizado é processado nas mitocôndrias, sendo este oxigênio altamente reativo podendo provocar danos no DNA e aumentar a quantidade de erros durante a replicação (Richter *et al.* 1988), uma vez que este genoma apresenta baixa eficiência no sistema de reparo. As divergências acumuladas nas seqüências nucleotídicas entre populações de uma certa espécie ou entre espécies de um certo gênero têm sido amplamente utilizadas, conferindo informações sobre estrutura populacional e história evolutiva para um vasto número de organismos.

O DNA mitocondrial nos peixes é constituído por 13 genes codificadores de proteínas (7 subunidades da NADH desidrogenase, 3 subunidades da citocromo C oxidase, 2 subunidades da ATP sintetase e o citocromo b), 22 de RNA transportadores (RNAt), 2 de RNA ribossômicos (12S e 16S). Existe ainda uma região não codificadora denominada região controle ou alça D (*D-loop*) que contém os sítios de iniciação para replicação do DNAm_t e transcrição do RNA (Meyer, 1993) (Figura 5).

2.6.1. A região controle (*D-loop*)

A região controle do DNA mitocondrial está localizada entre as regiões codificadoras do RNAt da prolina e o RNAt da fenilalanina. Apresenta um tamanho que varia de 856 a 1500 nucleotídeos (Lee *et al.* 1995). Especificamente em peixes, esta região é constituída em torno de 1.100 pares de bases, apresentando um domínio central conservado e duas porções nas extremidades 5' e 3' que são extremamente variáveis e ricas em A+T (Meyer, 1993). Uma parte da região controle é chamada *D-loop* (*displacement loop structure*) ou alça-D porque nela estão contidos os sítios de iniciação da replicação da fita pesada (H) e os promotores de transcrição das fitas leve e pesada (Brown *et al.* 1986)

A região controle apresenta taxa de mutação muito mais elevada que as regiões codificadoras dessa molécula, devido ao acúmulo de substituições nucleotídicas ser muito mais rápido. A taxa de substituição de um gene é um bom indicativo de sua importância funcional. Por causa da elevada variabilidade, a região controle tem sido amplamente utilizada para análises de estrutura populacional e relação entre diferentes espécies de peixes (Johnson, 2001; Chen *et al.* 1998; Meyer *et al.* 1990) inclusive para o tambaqui (Santos *et al.* 2007).

O DNA mitocondrial (DNAm) foi extensivamente usado nas últimas três décadas como ferramenta para deduzir evolução e passado demográfico de populações e espécies (Ballard e Whitlock, 2004). Com relação aos peixes da Amazônia, vários trabalhos têm sido realizados utilizando-se este marcador, com o objetivo de responder a diversas questões tais como: estrutura populacional de espécies, biogeografia, dispersão, fluxo gênico e colonização em peixes entre outros.

Algumas espécies de peixes de elevada importância na pesca comercial e consequente impacto econômico na região Amazônica, vêm sendo estudadas. Os resultados demonstram que ao longo da calha do rio Solimões-Amazonas, dourada *Brachyplatystoma rousseauxii* (Batista *et al.* 2005; Batista, 2009), piramutaba *Brachyplatystoma vaillantii* (Batista *et al.* 2005; Rodrigues, 2009), pescada *Plagioscion squamosissimus* (Galletti, 2009), jaraqui de escama grossa *Semaprochilodus insignis* (Batalha, 2009) curimatã *Prochilodus*

nigricans (Machado, 2009) e o tambaqui *Colossoma macropomum* (Santos *et al.* 2007) formam um único estoque geneticamente homogêneo ou seja, uma única e grande população. Todas estas espécies exibiram altos níveis de variabilidade genética e em parte o comportamento de serem migrador ou mesmo de habitar um ecossistema sujeito às variações hidrológicas anuais provavelmente estão facilitando o fluxo gênico.

Para a dourada (Batista, 2009), piramutaba (Rodrigues, 2009), jaraqui de escama grossa (Batalha, 2009) e curimatã (Machado, 2009), a panmixia encontrada também se estendem aos tributários amostrados dentro da bacia Amazônica, exceto para curimatã *Prochilodus nigricans* que apresentou diferenciação genética dentro das bacias do rio Madeira e Tapajós, uma provável influência das corredeiras presentes nestes tributários, ou mesmo a possibilidade de ocorrência de outra espécie.

Entretanto, as espécies não migradoras, e exploradas comercialmente como o acará-disco *Symphysodon* spp. e a espécie de tucunaré *Cichla monoculus* apresentaram populações geneticamente diferenciadas, e em alguns casos sugerindo a presença de novas espécies ou de unidades evolutivas significantes (Farias *et al.* 2005).

Como se pode observar, os enfoques genéticos acessados para os peixes amazônicos são muito recentes, mas já sinalizam para um “padrão” de ausência de estruturação que é lógico tem a contribuição da biologia de cada espécie, de eventos contemporâneos e certamente também tem a influência de eventos históricos diretamente relacionados com a formação da bacia Amazônica.

2.6.2. O gene da ATPase

O gene da ATPase codifica a enzima ATPase que é responsável pela hidrólise do ATP produzindo ADP e fosfato na respiração celular. Por ser um gene codificante, tende a ser mais conservado que os outros segmentos do DNAm como o *D-loop*, por exemplo. Os genes das subunidades 6 e 8 da ATPase são sobrepostos e por isso espera-se que a taxa de evolução desses genes seja mais lenta que a encontrada nas seqüências similares com somente uma fase de leitura. A razão é que a proporção de sítios não degenerados é maior nestes genes, reduzindo assim a proporção de mutações sinônimas em relação ao número total de mutação (Miyata e Yasunaga, 1978).

Entretanto, comparando o DNAm e o DNA nuclear, verifica-se que para os genes codificadores, os sítios sinônimos apresentam taxas de substituição 22 vezes superiores para o DNAm, enquanto que os sítios não-sinônimos há uma grande variação de 0,6 a 4,5% nas taxas de substituições nucleotídicas para o DNAm, devido às restrições funcionais (Li, 1997).

A análise dos genes das subunidades 6 e 8 da ATPase têm fornecido informações relevantes em estudos de estrutura populacional de espécies, biogeografia, dispersão, fluxo gênico e colonização em peixes (Sivasundar *et al.* 2001; Hrbek *et al.* 2005; Toffoli, 2007; Silva, 2009) .

A filogenia e padrão biogeográfico do gênero *Prochilodus* nos maiores sistemas de rios da América do Sul, mostrou que a distância genética entre os peixes da bacia do Paraná-Amazonas-Orinoco foram baixas, variando de 0,8 até 2,5%. Os haplótipos representantes de diferentes bacias (e diferentes espécies) formaram grupos monofiléticos e as análises indicaram ausência de subdivisão de população entre os peixes na bacia do Paraná (Sivasundar *et al.* 2001).

Com relação a estudos restritos à bacia Amazônica, para o pirarucu *Arapaima gigas* foi detectado baixos níveis de variabilidade genética como um sinal de sobre exploração dos estoques naturais, porém também foi observado que provavelmente esta espécie deve formar uma grande população panmítica (Hrbek *et al.* 2005). No entanto para a arraia *Potamotrygon motoro* não foi constatado população panmítica na bacia Amazônica, e sim forte estrutura de

população, inclusive dentro de uma mesma drenagem, havendo uma forte relação entre a distribuição geográfica e distribuição da variabilidade genética (Toffoli, 2007).

O aruanã branco *Osteoglossum bicirrhosum*, peixe explorado comercialmente e com comportamento sedentário apresentou maiores níveis de variabilidade genética nas populações a oeste da bacia Amazônica. Foi verificado que existe forte diferenciação genética para esta espécie ao longo de sua distribuição relacionada a isolamento por distância (Silva, 2009).

Alguns exemplos citados acima evidenciam a importância da utilização do DNAmT em estudos genético-populacionais das espécies de importância econômica, e que por isso estimulam o interesse pela suas explorações. No entanto, para caracterização genética e monitoramento dos recursos naturais tem sido bastante promissor o uso simultâneo de dois ou mais marcadores de DNA para avaliar a diversidade genética dessas populações. Uma avaliação confiável da variabilidade genética requer que os marcadores moleculares aplicados sejam altamente polimórficos, abundante em números e distribuição aleatória no genoma inteiro, como por exemplo, os microssatélites (Bohn *et al.* 1999).

2.7 Marcadores Microssatélites

Marcadores microssatélites ou SSR (*Simple Sequence Repeats*) são regiões encontradas ao longo do DNA que consistem em pequenas seqüências com um a seis nucleotídeos de comprimento, repetidas em *tandem* e raramente excedem 200 pares de base no comprimento total (Goldstein e Schlotterer, 1999). São geralmente encontradas nas regiões não codificadoras do genoma, tornando-os marcadores neutros. Estas seqüências são abundantes em genoma de eucariontes e tendem a ser altamente polimórficos, devido às variações do número das unidades de repetição e apresentam o maior conteúdo informativo por loco gênico entre todas as classes de marcadores moleculares disponíveis (Goldstein e Schlotterer, 1999). Possuem

uma taxa de mutação na ordem de 10^{-3} a 10^{-6} por loco por gameta por geração, em comparação com outras regiões do genoma (Schlotterer, 2000).

Este polimorfismo é causado, mais provavelmente, devido à “falha”, um “deslizamento” da DNA-polimerase durante o processo de replicação do DNA, onde ocorre o pareamento errado entre as seqüências vizinhas repetidas, resultando na formação de *loop*. Dependendo da direção que se estabelece, pode resultar em deleção ou duplicação de uma repetição (Tautz e Schlotterer, 1994). Mesmo existindo o mecanismo de reparo realizado pelas exonucleases, existem evidências de que o principal responsável pelo alto polimorfismo dos microsstélites seja atribuído a este processo (Eisen, 1999). Outra causa pode ser o *crossing over* desigual durante a divisão celular, onde ocorre um erro no alinhamento entre cromossomos homólogos devido à presença das repetições e então as cromátides podem apresentar duplicação ou deleção (Brown *et al.* 1996).

Dois modelos têm sido aplicados para o processo de evolução dos microsatélites: o IAM (Modelo de Alelos Infinitos) que considera que as mutações resultam em perda ou ganho de uma ou mais unidade de repetição, originando um alelo novo não encontrado anteriormente na população e sem relação com o alelo original (Kimura e Crow, 1964); e o SMM (Modelo de Mutação Gradativo em Passos) onde a mutação para um novo alelo ocorre em passos, resultando na perda ou ganho de uma única unidade de repetição e assim estes novos alelos teriam relação com o estado alélico anterior presente na população, ou seja, alelos com tamanhos mais próximos seriam mais similares do que alelos com tamanho distantes (Slatkin, 1995). Existe ainda um terceiro modelo, o TPM (Modelo de Duas Fases), um tanto complexo, fundamentado na teoria da coalescência assumindo diferentes processos mutacionais e história demográfica para estimar a variância no número de repetições. Mostra-se como uma extensão do modelo SSM, assumindo que as mutações podem originar a partir de um ou muitos passos mutacionais (Di Rienzo *et al.* 1994).

Pelo alto grau de polimorfismo alélico (são multialélicos) e serem co-dominantes (Goldstein e Schlotterer, 1999) fazem com que qualquer população animal possa ser utilizada como população de referência, inclusive

na piscicultura e aqüicultura onde as diferenças genéticas entre populações são limitadas. Devido à alta homologia encontrada nas seqüências flaqueadoras, os *primers* desenvolvidos para uma espécie também podem ser amplificados em espécies relacionadas (Moore *et al.* 1991). Embora não haja necessidade de que essas espécies sejam intimamente relacionadas, a porcentagem dos locos amplificados decresce à medida que o aumenta o tempo que separa as espécies (Fitzsimmons *et al.* 1995).

Devido ao elevado nível de polimorfismo, herança mendeliana e ao fato de eles aparentemente seguir modelos evolutivos simples, os microssatélites são os marcadores moleculares, mais utilizados atualmente em estudos genéticos de peixes (Yue *et al.* 2002; Skaala *et al.* 2004; Barroso *et al.* 2005; Hatanaka *et al.* 2006; Suganuma, 2008; Calcagnotto e De Salle, 2009, Povh *et al.* 2010) e para acessar a diversidade genética e detecção de estruturação populacional em diferentes espécies de peixes amazônicos.

Hrbek *et al.* (2007) aplicaram análises de autocorrelação espacial de dados microssatélites e dados geográficos para o pirarucu *Arapaima gigas* indicaram significativa estruturação genética para as localidades no extremo da amostragem. A conservação e o manejo da diversidade genética distribuída continuamente sugerem um modelo de metapopulação com áreas separadas por mais do que 2800 km na calha do rio Amazonas. Mais recentemente, esta mesma espécie foi estudada por Leão (2009) em uma ampla área na bacia Amazônica, verificando um padrão heterogêneo na distribuição da variabilidade genética que foi maior na calha principal do que nos tributários. No entanto, verificou que calha e tributários não comportam populações geneticamente diferentes, mas pôde constatar estrutura populacional na forma de gradiente ao longo da bacia permitindo dividi-la em três macroregiões: ocidental, central e oriental. Redução populacional recente foi evidenciada para as populações da Foz rio Amazonas e do rio Araguaia.

Para os peixes acarás-disco do gênero *Symphysodon*, os microssatélites foram extremamente poderosos para ajudar na taxonomia do grupo apoiando a existência de quatro espécies e que uma delas, *Symphysodon tarzoo* (morfotipo verde) formam uma única população

panmítica, enquanto que as demais espécies estão estruturadas geneticamente (Amado, 2008).

Os bagres dourada *Brachyplatystoma rousseauxii* (Batista, 2009) e piramutaba *Brachyplatystoma vaillantii* (Rodrigues, 2009) migradores de longa distância apresentam ausência de diferenciação genética dentro da bacia Amazônica, formando por tanto um único estoque e com elevado níveis de variabilidade genética para ambas as espécies.

Além das questões genéticas abordadas acima, tais marcadores proporcionam uma série de estudos importantes dentro de programas de melhoramento genético, entre eles a estimativa da consangüinidade, sendo que estas estimativas permitem a determinação do tamanho efetivo das populações (N_e) (Norris *et al.* 2000), que é um parâmetro chave na conservação da variabilidade genética das espécies. A redução do N_e pode ocasionar vários impactos negativos em uma população, como a possibilidade de fixação ou aumento da frequência de alelos recessivos deletérios, devido à endogamia. Pode ainda, em longo prazo, levar a uma redução no potencial adaptativo da população às mudanças em seu ambiente, tais como a modificação do habitat, introdução de espécies competitivas, predadores e parasitas (Poulsen *et al.* 2006).

CAPÍTULO I

Marcadores Microsatélites para tambaqui (*Colossoma macropomum*, Serrasalminidae, Characiformes) uma espécie economicamente importante e espécie-chave da várzea Amazônica.

Artigo publicado (Santos *et al.* 2009), em anexo.

PERMANENT GENETIC RESOURCES

Microsatellite markers for the tambaqui (*Colossoma macropomum*, Serrasalminidae, Characiformes), an economically important keystone species of the Amazon River floodplain

MARIA DA CONCEIÇÃO F. SANTOS,* TOMAS HRBEK*† and IZENI P. FARIAS*

*Laboratório de Evolução e Genética Animal, Departamento de Biologia, Universidade Federal do Amazonas, Av. Rodrigo Octávio Jordão Ramos, 3000, 69077-000, Manaus, AM, Brazil, †Biology Department, University of Puerto Rico – Rio Piedras, San Juan, PR 00931, Puerto Rico

1. INTRODUÇÃO

Em virtude da abundância e diversidade de peixes, a pesca sempre foi uma atividade econômica tradicional na bacia Amazônica, principalmente nas áreas de várzeas, e uma das espécies mais apreciadas para alimentação é o tambaqui (*Colossoma macropomum*). Esta espécie tem ampla distribuição pelos rios amazônicos (Goulding e Carvalho, 1982), e nos rios da bacia do Orinoco (Novoa, 1990). É considerado um peixe semi-migratório (Araújo-Lima e Ruffino, 2004) e compreende uma única e grande população na calha principal da bacia Amazônica (Araujo-Lima e Goulding, 1998; Santos *et al.* 2007). A dieta desse peixe é baseada principalmente em frutos e sementes, e assim ele transfere a produção da floresta para o homem diretamente por intermédio da pesca (Araújo-Lima, 2002), aumentando assim o valor agregado da vegetação natural. Tem adaptabilidade ao cativeiro e por isso constitui-se a principal espécie da piscicultura regional.

De acordo com o IBAMA - Thomé *et al.* (2007), nos últimos 30 anos, houve uma contínua diminuição no desembarque pesqueiro dessa espécie, além do fato de o tamanho médio dos peixes desembarcados nos mercados estarem menor que o permitido pela legislação, para garantir a 1ª maturação dos indivíduos dessa espécie. Isto prejudica o potencial reprodutivo do tambaqui, pois reduz o estoque desovante (Issac e Ruffino, 1996) e minimiza a produtividade dos pescadores, sugerindo que as populações naturais de tambaqui estão em depressão devido a um esforço de pesca exagerado. Por isso, para a exploração adequadamente deste potencial, é necessário, antes de tudo, garantir a manutenção e disponibilidade destes recursos na natureza. A identificação e conhecimento da diversidade genética dentro e entre populações de tambaqui são importante para manutenção a longo prazo dos estoques exploráveis e da variabilidade necessária para o melhoramento genético de espécies em cativeiro. Calcagnotto *et al.* (2001), isolaram e caracterizaram microssatélites em pacu *Piaractus mesopotamicus*, com aplicação para outras espécies de serrasalmídeos, como o tambaqui, onde seis locos mostram-se polimórficos.

Em virtude do enorme potencial econômico que este peixe tem para a região Amazônica, quer para pesca tradicional ou para a piscicultura, nós entendemos que o isolamento e desenvolvimento de marcadores microssatélites específicos para o tambaqui é de grande importância. A utilização de um número maior de microssatélites para os estudos genéticos dessa espécie implica suportar com maior robustez os futuros resultados de nossos estudos. Estes marcadores são ferramentas seguras para se estimar parâmetros genéticos fundamentais ou características importantes para conservação como estimativas do tamanho efetivo populacional e a constatação de populações que sofreram recente redução no tamanho populacional (Hedrick, 2004), além de evidenciar estrutura de população, inferindo padrão de dispersão entre os peixes com grande confiabilidade.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Desenvolver marcadores microssatélites para tambaqui (*Colossoma macropomum*)

2.2 Objetivos específicos

- ✓ Isolar os marcadores de microssatélites para tambaqui.
- ✓ Caracterizar os marcadores de microssatélites para tambaqui.
- ✓ Amplificar os marcadores de microssatélites desenvolvidos para o tambaqui em outras espécies de serrasalmídeos.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Isolamento de regiões de microssatélites para tabaqui

Todo desenvolvimento dos marcadores moleculares de microssatélites seguiu a metodologia modificada de Farias *et al.* (2003). Aproximadamente 10 µg do DNA genômico de indivíduos de tabaqui de diferentes amostras populacionais foram digeridos com a enzima *Sau3AI* (2 U/µg) numa reação de volume total de 200 µL (100 µL de DNA, 10 µL de tampão da enzima, 2µL de enzima *Sau3AI* (2 U/µg), 88 µL de água Milli-Q autoclavada). Esta enzima possui o sítio de restrição 5' ↓GATC 3' e 3' CTAG↑. A reação foi homogeneizada e incubada a 37°C por 4 horas. Para a construção da biblioteca genômica enriquecida com regiões microssatélites foram obtidos fragmentos de tamanhos variados, entre 300 e 900 pb. Para tanto, todo o produto da restrição (200µL) foi submetido à eletroforese em gel de agarose de baixo ponto de fusão a 1% por três horas a 60V. O corte do gel na região correta foi direcionado pela utilização conjunta de um marcador de peso molecular *Ladder* 1 kb. A banda correspondendo aos fragmentos desejados foi cortada e purificada utilizando-se kit de purificação de gel GFX da GE Healthcare, conforme protocolo do fabricante.

3.2 Preparação dos adaptadores e sua ligação aos fragmentos de DNA genômico

Dois oligonucleotídeos adaptadores (Er1Bh1*Blunt* – 5' **CGG AAT TCA GTG GAT CCT GCC** 3'; Er1Bh1*GATCSticky* - 5' **GAT CGG CAG GAT CCA CTG AAT TCC G** 3') foram anelados através de uma reação de PCR (Reação em Cadeira da Polimerase) de 100 µL, passando então a serem chamados de adaptadores ou *linkers*. Depois de anelados, esses oligonucleotídeos formaram um fragmento de DNA dupla fita onde a seqüência **GATC** ficou livre para se ligar aos fragmentos de DNA provenientes da digestão.

A reação de ligação dos adaptadores aos fragmentos de 300 a 900 pares de bases foi realizada com os seguintes reagentes: adaptadores (200

μM), DNA (2-3 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$), T4 Ligase (2 U/ μL), Tampão da T4 Ligase (10X). A reação de ligação ocorreu a 16°C *overnight*. Como o objetivo foi enriquecer o produto da ligação e evitar a seleção e exclusão casual de alguns fragmentos, o produto da ligação de reação foi então reamplificado em uma reação de PCR usando-se apenas um dos *primers* (*Blunt*). O produto dessa reação foi purificado utilizando um kit de PCR GFX da GE Healthcare.

3.3 Hibridização dos microssatélites

A sonda (CT10) foi preparada utilizando-se os seguintes reagentes: sonda-oligo (40 μM), tampão terminal transferase (5X), Biotina dUTP (1 mM) e terminal transferase (20u/ μL), formando um complexo biotina-sonda. Após a preparação, este complexo foi ligado à microesferas magnéticas *Dynabeads® M-280 streptavidin* (DynaL Biotech, Hamburg). Este segundo complexo (sonda-biotina-avidina-*dynabeads*) foi utilizado na etapa da hibridização, onde foram ligadas às repetições de microssatélites correspondentes no DNA genômico. A seleção dos fragmentos ricos em repetições, realizada pela ligação dos fragmentos digeridos de DNA ao complexo sonda/biotina/*dynabeads*, foi feita utilizando-se um protocolo que incluiu: (1) lavagem das esferas magnetizadas que foram misturados aos oligonucleotídeos biotinilados formando um complexo esferas/oligonucleotídeos; (2) hibridização do DNA digerido pré-desnaturado (10 min/95°C) junto com a solução esferas/oligonucleotídeos para a hibridização a 55°C por 4 horas; (3) lavagem do complexo para o isolamento do DNA com as repetições de microssatélites. Os fragmentos selecionados pelo protocolo descrito acima foram desligados do complexo por lavagem com tampão TE.

3.4 Ligação dos fragmentos selecionados ao plasmídeo vetor e clonagem

Os produtos da hibridização que contiveram fragmentos potencialmente ricos em microssatélites foram amplificados, sendo que na última etapa da reação de PCR a *Taq* polimerase adicionou uma adenina na extremidade 3' do fragmento. Os fragmentos foram ligados a vetores de

clonagem do Kit TOPO TA *cloning* da Invitrogen®, os quais possuem uma timina extra no final 3', desta forma, este Kit é especialmente desenvolvido para ligar-se a fragmentos de PCR. Depois de ligar os fragmentos ao vetor, estes foram transformados pela metodologia de eletroporação, utilizando células competentes do próprio Kit. As células foram inoculadas em 2mL de meio LB-líquido e incubadas a 37°C sob agitação por uma hora. Após esse tempo o material foi inoculado em placas de meio LB-sólido com ampicilina. A confirmação de que os plasmídeos extraídos possuíam insertos de diferentes tamanhos foi feita através de PCR usando *primers* universais M13. Após essa a confirmação foi realizada a purificação e o seqüenciamento de duas placas contendo 96 clones para a identificação dos microssatélites.

3.5 Seqüenciamento dos Clones

Após a amplificação, os produtos de PCR foram purificados utilizando o protocolo de purificação por EXOSAP (Enzimas *Exonuclease* e *Shrimp Phosphatase Alkaline*) conforme protocolo do fabricante. Para a reação de seqüenciamento, foi utilizado 2 µL dos PCRs de cada colônia já purificados, 2 µL de água e 2 µL do kit de reação *DYEnamic™ ET dye terminator kit* (GE Healthcare). A reação foi realizada basicamente como uma PCR, no entanto quando os nucleotídeos modificados com fluorescência do *ET dye terminator kit* foram inseridos à fita que está sendo construída, esta pára, formando várias cópias da fita molde de vários tamanhos, contendo um nucleotídeo marcado no final. O seqüenciamento dos produtos ocorreu em seqüenciador automático de DNA *MegaBACE™* 1000 (GE Healthcare), onde as bases marcadas com fluorescência são lidas com um raio laser. Para isso quando as amostras são injetadas nos capilares contendo a matriz de corrida, é realizada uma eletroforese de capilar, onde os fragmentos de tamanho menor correm mais rápidos do que os fragmentos de tamanho maior, e à medida que passam pelo laser a base marcada é lida gerando a seqüência. Fragmentos com regiões ricas em microssatélites foram selecionados e os *primers* foram desenhados a partir das seqüências das regiões de flaqueamento das repetições. Para o desenho dos iniciadores (*primers*) das regiões flaqueadoras dos

microssatélites foi utilizado o software *Primer 3* disponível online (http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi). Para tanto foram observadas características como: tamanho (de 18 a 24 nucleotídeos, sem seqüências repetitivas), conter uma percentagem de C/G maior que 40% e a possibilidade mínima de formação de estruturas secundárias dentro dos iniciadores.

3.6 Desenho dos *primers* e teste de polimorfismo

Todos os *primers* foram desenhados de acordo com o método econômico descrito por Schuelke (2000) que utiliza juntamente com o *primer* específico da região microssatélite uma seqüência chamada de cauda M13, onde foi anelado na reação de PCR um *primer* universal M13 marcado com fluorescência, para posterior leitura no seqüenciador automático *MegaBACE™* 1000 (GE Healthcare).

Para os testes de polimorfismo foi realizada uma PCR com volume final de 10 µL contendo 2,5 µL de H₂O, 1,0 µL de MgCl₂ (25mM), 1,0 µL de dNTPs (10 mM), 1,0 µL de tampão 10x (100mM Tris-HCl, 500mM KCl), 1,0 µL do *primer forward* contendo a cauda M13 (2 µM), 1,5 µL do *primer* reverso, 0,7 µL do *primer* M13 marcado com fluorescência azul (FAM), 0,3 µL de *Taq* DNA *Polymerase* (5 U/µl) e 1 µL do DNA (com a concentração variando entre 50ng e 100ng). E as condições da PCR foram as seguintes: desnaturação a 94°C por 20 segundos, temperatura de anelamento dos *primers* variando entre 60 a 65°C dependendo do *primer* por 20 segundos, e extensão a 68°C por 30 segundos, repetidas por 30 vezes, seguidas por outro ciclo para anelamento dos *primers* M13 com as seguintes condições: desnaturação a 94°C por 20 segundos, temperatura de anelamento do *primer* M13 a 50°C por 20 segundos, e extensão a 72°C por 30 segundos, repetidas por 15 vezes, com extensão final de 30 minutos a 72°C. Os testes de polimorfismo dos fragmentos selecionados foram feitos diretamente no seqüenciador *MegaBACE™* 1000 (GE Healthcare). A análise das genotipagens realizadas no seqüenciador foi realizada utilizando-se os Programas *Genetic Profiler* e *Fragment Profiler*.

3.7 Caracterização dos microssatélites

Para a caracterização dos microssatélites em *C. macropomum*, foram utilizados 25 indivíduos desta espécie, oriundos do município de Santarém-PA e arredores, principalmente da ilha de São Miguel. As amostras destes indivíduos foram obtidas através da pesca artesanal ou comercial durante o desembarque neste município.

Todos os locos microssatélites foram avaliados quanto a sua utilização como marcadores polimórficos para o estudo populacional no tambaqui, sendo caracterizados para as seguintes medidas de diversidade genética: (A) – número de alelos, (H_o) – heterozigosidade observada, (H_E) – heterozigosidade esperada. Os parâmetros genéticos, o desequilíbrio de ligação entre os locos, e o equilíbrio de Hardy-Weinberg foram estimados utilizando-se o programa ARLEQUIN 3.11 (Excoffier *et al.* 2005), calculado com 10000 permutações. O programa MICRO-CHECKER 2.3 (Van Oosterhout *et al.* 2004) foi utilizado para identificar possíveis problemas com *stuttering*, *large allele dropout* (alelos com baixa eficiência de amplificação) e com presença de alelos nulos, que são erros que podem ocorrer durante a amplificação com os novos *primers*.

Os locos de microssatélites desenvolvidos especificamente para *C. macropomum* também foram testados e caracterizados para outras espécies de serrasalmídeos que foram: piranha (*Pygocentrus nattereri*), pacu (*Mylossoma aureum*) e pirapitinga (*Piaractus brachypomus*), através de teste de transferabilidade ou amplificação cruzada. Isto devido à alta homogeneidade encontrada nas regiões flaqueadoras, os *primers* desenvolvidos para uma espécie também podem ser amplificados em espécies relacionadas (Moore *et al.* 1991).

4. RESULTADOS

4.1 Isolamento e Caracterização de locos microssatélites para tambaqui

Um total de 79 clones de bactérias contendo o fragmentos de DNA genômico de *Colossoma macropomum*, foram seqüenciados. Desse total, 57 seqüências apresentaram regiões ricas em microssatélites. No entanto, devido nem todas apresentar boas regiões flanqueadoras, apenas 27 foram selecionadas para o desenho destes *primers*. Após a otimização das condições da PCR, para os 27 pares de *primers* testados, foram selecionados 14 pares de *primers* para o tambaqui (Tabela 1).

Os testes de genotipagens foram realizados com 25 indivíduos e mostraram que dos 14 locos de microssatélites desenvolvidos e selecionados para o tambaqui, todos se mostraram polimórficos, com um número de alelos por loco variando de 4 a 21. A heterozigosidade observada (H_o) e esperada (H_e) variaram de 0,32000 a 0,96000 e 0,45061 a 0,95102, respectivamente. Usando ARLEQUIN 3.1.1 (Excoffier *et al.* 2005), verificamos que os pares de locos não estão em desequilíbrio de ligação, mas encontramos valores de P significativo ($<0,016$) para o loco Cm1F5 comparado com o loco Cm1A8. De acordo com os pressupostos do equilíbrio de Hardy-Weinberg, a freqüência dos alelos está dentro do esperado, sugerindo uma grande qualidade desses locos como marcadores moleculares (Tabela 1)

As análises não mostraram a ocorrência de quaisquer problemas referente a *stuttering* ou alelos com baixa eficiência de amplificação. Entretanto, o loco Cm1F5 evidenciou excesso de homozigotos e a possível ocorrência de alelos nulos, usando o programa MICRO-CHECKER 2.3 (Van Oosterhout *et al.* 2004). Desta maneira, sugerimos uma maior atenção com a utilização deste loco para os estudos populacionais (Tabela 1).

Tabela 1. Caracterização de 14 locos microssatélites de 25 indivíduos de *Colossoma macropomum*. (*) $p < 0,0016$ para comparação par-a-par dos locos, após correção de Bonferroni.

Locos	Sequências/primers (5'--3')	Repetições	Tamanho (pb)	Ta(°C)	Nº de alelos (N _A)	H _o	H _E	P value
Cm2B1	F-CAGGCAGTTAGAACGAGTTCAC	(GT) ₁₁	142-158	65	7	0,80000	0,77224	0,93689
	R-GCCTCCACACTGACACTCA							
Cm2G5	F-GTAGCCGTCCTCCGTCCTA	(GA) _{9aa} (GA) ₅	138-144	65	4	0,44000	0,45061	1,00000
	R-GCTCTCACAATATCTCTCACTGTC							
Cm1A8	F-TGCTCTCTGCAGTCTCTCA	(CT) ₁₈ (CA) ₁₂	161-191	65	7	0,32000	0,54531	0,00784
	R-TCATGGTTGCCACTCATCTC							
Cm1A11	F-CCAGCGGGTTAAAGCCTAC	(CT) ₂₁	230-276	65	16	0,80000	0,91102	0,02540
	R-GCAGCCTCACTGATACGTTG							
Cm1C8	F-AGCATGTGTGGAACGTAGGG	(CT) ₂₂	239-273	65	14	0,76000	0,91755	0,00172
	R-CTGCCGATCACAGCACTAGA							
Cm1D1	F-GCAAATGTGCACACCAATAG	(GA) ₁₇	179-209	65	15	0,84000	0,91265	0,02169
	R-GCAGAAGGTGAAGAGTCTTGTTG							
Cm1E3	F-CTGACCGATGCAACACTCC	(CT) ₁₄	313-335	65	9	0,32000	0,55592	0,00872
	R-CCTGAACCAGGCTCCAGAT							
Cm1F4	F-GGGGTGAGTCATTGAGGAGA	(CT) ₁₇	211-245	60	13	0,96000	0,91184	0,00806
	R-CCGATCATGAAGGCAGTCTC							
Cm1F5	F-TTTCGGGAGCAGGACAAG	(GA) ₂₄	268-296	60	13	0,56000	0,86694	0,00000*
	R-CAGTTAAGGGACCCAGTGGA							
Cm1F7	F-CCTATTGTGATGGCAGAGAGAG	(GA) ₉ (CT) ₅	205-219	65	5	0,52000	0,49143	0,34861
	R-CACAGACGTGTACAGCTGGTT							
Cm1G7	F-CCCAGCCTACTACAGGGTCA	(CT) ₁₈	202-238	65	12	0,88000	0,83918	0,72196
	R-CACACATCGCTCTTCTCTCC							
Cm1H8	F-GGTCAAAACACACGCCACTA	(CT) ₁₉	275-331	65	21	0,92000	0,95102	0,28634
	R-CAGCAGACAGTAGGCAGAGAG							
Cm1B8	F-CACAACCCACCTGTTTGATT	(CT) ₂₀	141-169	65	13	0,84000	0,89878	0,10499
	R-CTAATAACAAACCTACTTCCACTTCTC							
Cm1C6	F-TAAAGCCAAGCCAGGTCTGT	(GA) _{8gt} (GA) ₇	264-290	65	13	0,88000	0,90939	0,00639
	R-CGAAACATCAGGCACGAATA							

4.2. Transferibilidade dos locos microssatélites de tambaqui

O teste de transferibilidade foi realizado em três outras espécies de serrasalmídeos, piranha (*Pygocentrus nattereri*), pacu (*Mylossoma aureum*) e pirapitinga (*Piaractus brachypomus*), sendo as duas últimas, espécies com potencial para a piscicultura. Um total de quatro indivíduos de cada espécie foi analisado por loco, mostrando que *M. aureum*, a espécie filogeneticamente mais próxima de *C. macropomum* (Calcagnotto *et al.* 2005), foi a que apresentou o maior número de locos polimórficos (Tabela 2). Dos 14 locos analisados, sete foram polimórficos para as três espécies. Os locos de microssatélites desenvolvidos para o tambaqui mostraram-se marcadores potencialmente informativos para as outras espécies (mesmo de outros gêneros) de serrasalmídeos, viabilizando sua aplicação em estudos genéticos, como a compreensão de comportamento reprodutivo, estrutura populacional, filogeografia, entre outros.

Tabela 2. Transferibilidade de 14 locos microssatélites desenvolvidos de *Colossoma macropomum* para outras espécies de serrasalmídeos: *Pygocentrus nattereri* (piranha), *Mylossoma aureum* (pacu) and *Piaractus brachypomus* (pirapitinga). N= número de indivíduos testados. N_A = número de alelos.

Locos	<i>P. nattereri</i> N=4		<i>M. aureum</i> N=4		<i>P. brachypomus</i> N=4	
	Tamanho (bp)	N_A	Tamanho (bp)	N_A	Tamanho (bp)	N_A
Cm1A8	182-196	5	184-192	3	172-206	4
Cm1A11	238-250	4	244-250	3	244-252	4
Cm1C8	-		-		-	
Cm1D1	-		188-192	3	-	
Cm1E3	-		-		-	
Cm1F4	-		208-210	2	192-196	3
Cm1F5	270-274	2	120-126	2	116	1
Cm1F7	248-254	3	204-208	2	232-242	5
Cm1G7	202-214	2	196-218	4	160-188	4
Cm1H8	-		-		-	
Cm1B8	146-154	4	208-214	4	128-148	4
Cm1C6	132-136	3	132-146	3	116-142	3
Cm2B1	142-156	3	150-154	3	148-152	3
Cm2G5	-		-		-	

CAPÍTULO II

Caracterização genética das populações naturais de tambaqui *Colossoma macropomum*, na bacia Amazônica através de marcadores moleculares mitocondriais e microssatélites.

1. INTRODUÇÃO

O tambaqui (*Colossoma macropomum*) é uma espécie de grande importância econômica e alimentar para população amazônica. Nos últimos anos, a comercialização dessa espécie ultrapassou as fronteiras regionais, com o estabelecimento de vários criadouros privados e em centros de pesquisas ictiológicas espalhados pelo nordeste, centro oeste e sudeste brasileiro. Atualmente, esta espécie de peixe tem alto valor de mercado (R\$ 10/Kg ou US\$ 5/Kg correspondente) no Estado do Amazonas e, apesar do alto custo, é muito procurada e apreciada pela população local. Isto porque, para os consumidores, a carne saborosa do tambaqui silvestre é o principal atrativo para o seu consumo. Além da importância econômica, o frugívoro tambaqui tem um papel relevante nos ambientes de várzeas, pois é um dos principais dispersores de sementes de espécies da flora dessas áreas alagáveis.

Embora a produção em cativeiro do tambaqui tenha crescido nos últimos anos, há fortes indícios de que a população natural desta espécie está deprimida em razão de um esforço de pesca exagerado. Isto pode ser evidenciado na contínua redução do desembarque dessa espécie no porto de Manaus. De acordo com Araújo-Lima (2002), em 1976, o desembarque de tambaqui alcançava 16 mil toneladas/ano e recentemente baixou para 4 mil toneladas. Além disso, outro fator preocupante é que o tamanho médio dos peixes desembarcados também está menor comparado aos exemplares capturados há anos atrás, sugerindo que muitas unidades dessa espécie podem estar sendo capturadas sem ter atingido a maturação. É sabido que a pressão pela pesca excessiva pode reduzir o tamanho e a idade de maturidade, ocasionando efeito drástico na fecundidade e recrutamento para reprodução.

Uma das condições primordiais para adoção de políticas de controle da atividade pesqueira é o conhecimento sobre vários aspectos da espécie de interesse. O estudo das estruturas populacionais através de técnicas moleculares talvez seja a parte mais importante da genética da conservação e tem sido útil tanto no estudo de populações exploradas comercialmente

(exemplo do tambaqui) como para espécies ameaçadas de extinção (Allendorf e Luikart, 2007). Neste trabalho, foram utilizados marcadores moleculares mitocondriais (região controle e genes da ATPase) e nucleares (microsatélite) como ferramentas para ampliar os estudos genético-moleculares em tambaqui. Os marcadores microsatélites são ferramentas seguras para se estimar parâmetros genéticos fundamentais, especialmente aqueles referentes ao tamanho efetivo da população, e que possam indicar a ocorrência de populações que sofreram “*bottlenecks*”, ou seja, recente redução no tamanho populacional (Hedrick, 2004).

Santos *et al.* (2007), além de constatarem alta variação genética, também sustentam que ao longo do rio Solimões-Amazonas existe uma única e grande população de tambaqui. Mas, além de possibilitar a confirmação da grande diversidade genética da espécie, o uso simultâneo desses marcadores deve elucidar os padrões genéticos desse peixe não somente do rio principal da bacia Amazônica, mas também dos tributários onde a espécie ocorre e é bastante explorada. Com isso cria-se uma grande oportunidade para caracterizar geneticamente o tambaqui em uma ampla área de sua distribuição geográfica, e essas informações podem orientar o melhoramento genético na piscicultura e estratégias de conservação e manejo para essa espécie, dentro do modelo de desenvolvimento sustentável, que em longo prazo, representa a mais viável e eficiente alternativa de desenvolvimento para a Amazônia.

HIPÓTESES TESTADAS

H₀= Os altos níveis de variabilidade genética encontrados são condizentes com o comportamento de alta prolificidade e migração da espécie, e não refletem eventos antropogênicos como a pesca extensiva que acomete a espécie.

H₁= Não existe uma alta variabilidade genética para as populações de tambaqui em toda sua distribuição na bacia Amazônica, o que é preocupante em termos de conservação da espécie.

H₀= Não existem populações geneticamente diferenciadas da espécie, tanto no rio Solimões-Amazonas como nos tributários.

H₂= Os parâmetros genéticos em *Colossoma macropomum* mostram ocorrência de populações geneticamente diferenciadas, tanto na calha principal como nos tributários da bacia Amazônica, onde a espécie ocorre.

H₀= As corredeiras presentes no rio Madeira e Tapajós representam uma barreira ao fluxo gênico entre as populações de tambaqui a montante e a jusante das mesmas.

H₃= Ocorre fluxo gênico entre as populações mesmo na presença de barreiras físicas presente nos tributários da bacia do rio Amazonas.

H₀= As populações naturais encontram-se estáveis, ou seja, não está havendo mudanças no tamanho efetivo populacional (N_e) ao longo da história evolutiva da espécie.

H₄= Existem mudanças no tamanho efetivo populacional (N_e) da espécie ao longo do tempo.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Caracterizar a diversidade genética das populações naturais de tabaqui em sua ampla distribuição na bacia Amazônica, através do isolamento de marcadores de microssatélites para a espécie, além da utilização de marcadores mitocondriais, e que esta abordagem possa auxiliar na conservação de recursos genéticos dos estoques naturais.

2.2 Objetivos específicos

Avaliar o grau de variabilidade genética intra e interpopulacional, estimando os níveis de divergências genéticas entre as amostras populacionais do rio Solimões-Amazonas e seus afluentes.

Estimar os níveis de fluxo gênico, verificando se a existência de uma única população de tabaqui ao longo da calha principal da bacia Amazônica, também se estende aos tributários.

Estimar o tamanho efetivo populacional baseado em coalescência e comparar essas estimativas com o número de censos obtidos com dados pesqueiros.

Estimar através de análises de coalescência mudanças temporais no tamanho efetivo populacional ao longo da história evolutiva do tabaqui.

Comparar os resultados dos diferentes marcadores utilizados para detectar e estimar a variação genética nas amostras populacionais estudadas.

Contribuir para o desenvolvimento de metodologias que possam orientar a conservação da diversidade genética dos estoques naturais e cultivados do tabaqui.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Amostras populacionais e suas localidades

As amostras foram obtidas diretamente da pesca artesanal e em mercados/feiras dos municípios ou comunidades arredores. No total, 21 amostras populacionais/localidades foram amostradas (Figura 6), sendo que de cada uma, de 20 a 69 indivíduos foram analisados (Tabela 3). De cada exemplar, foi coletado a nadadeira adiposa ou pedaço de tecido muscular e em seguida preservado em Álcool 100% para as posteriores análises de laboratório.

Tabela 3. Localidades amostradas para *Colossoma macropomum*.

Região	Localidades	Coordenadas geográficas aproximadas	Anos das coletas	N
Bacia Amazônica	Mexiana -PA	0° 05'35.42"S 49° 50'22.03"O	2008	31
	Almeirim-PA	1° 32'13.92"S 52° 34'53.29"O	2008	36
	Santarém-PA	2° 26'21.97"S 54° 41'55.45"O	2002/2006	36
	Itaituba-PA	4° 16'08.87"S 55° 59'22.85"O	2006/2008	32
	Jacareacanga-PA	6° 13'23.89"S 57° 45'28.08"O	2007/2008/2009	30
	Oriximiná-PA	1° 45'35.80"S 55° 52'44.89"O	2002/2008	34
	Nhamundá-AM	2° 12'09.00"S 56° 43'46.00"O	2008	22
	Parintins-AM	2° 37'42.05"S 56° 44'11.29"O	2002/2007	35
	Borba-AM	4° 23'15.96"S 59° 35'38.08"O	2008/2009	23
	Humaitá-AM	7° 30'21.22"S 63° 01'14.98"O	2006/2009	22
	Porto Velho-RO	8° 45'42.57"S 63° 54'07.06"O	2005/2008	21
	Manaus-AM	3° 13'25.89"S 59° 57'34.06"O	2005/2006/2007	35
	Tapauá-AM	5° 37'92.08"S 63° 11'00.61"O	2006/2008	28
	Boca do Acre-AM	8° 45'26.48"S 67° 24'02.70"O	2006/2008	21
	Coari-AM	4° 04'05.58"S 63° 08'30.15"O	2002/2006/2007	29
	Tefé-AM	3° 19'14.62"S 64° 43'24.90"O	2006/2007	20
	Carauari-AM	4° 52'44.64"S 66° 53'00.31"O	2004	25
	Eirunepé-AM	6° 40'37.27"S 69° 52'28.31"O	2008	20
	Fonte Boa-AM	2° 30'51.64"S 66° 05'33.05"O	2007	31
Tabatinga-AM	4° 15'12.05"S 69° 57'18.70"O	2002/2007/2008	37	
Bacia Boliviana	Guaporé	10° 49'57.03"S 65° 21'22.25"O	2006/2008	69
			Total	637

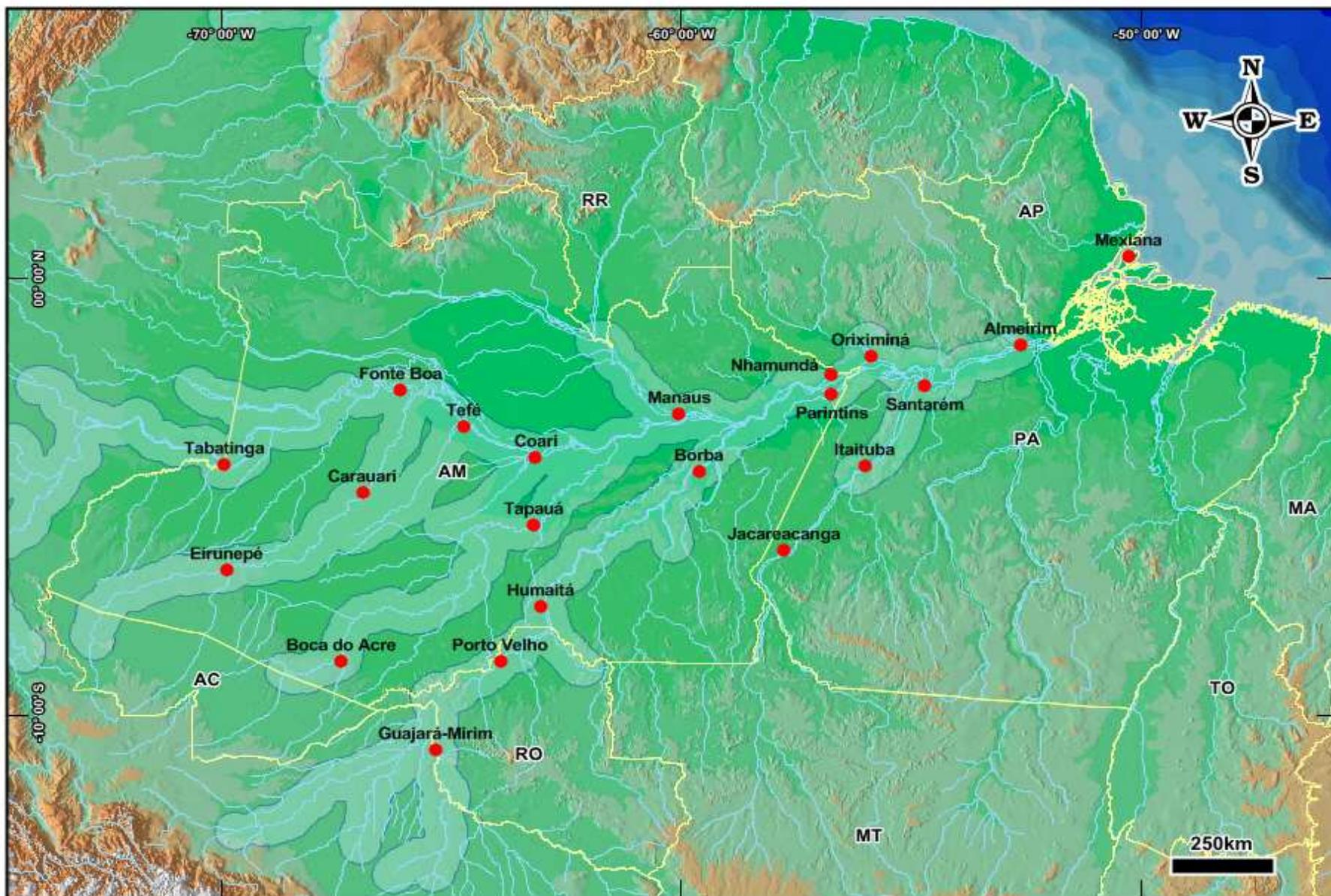


Figura 6. Mapa geográfico da bacia Amazônica com as localidades amostradas. O contorno sombreado ao longo das drenagens representa a área de distribuição de *Colossoma macropomum* de acordo com Araújo-Lima e Goulding (1998).

3.2 Extração e quantificação do DNA de tamabqui

Fragmento de tecido muscular (de 2 a 3mm) de cada indivíduo foi dissolvido e digerido com Proteinase K e solução de SDS, seguido da extração do DNA total por meio de sucessivas lavagens em fenol, fenol/clorofórmio/álcool isoamílico e clorofórmio/álcool isoamílico e foi precipitado com etanol 70% (Sambrook *et al.* 1989). A quantificação (quantidade e qualidade do DNA) foi avaliada e estimada em comparação a um padrão de DNA de concentração definida, em gel de Agarose 0,8% corado com Brometo de Etídio (EtBr). O DNA foi diluído em uma concentração final variando de 10-50ng/ μ L.

3.3 Amplificação e Purificação do DNA mitocondrial

Para amplificação da região controle e do gene da ATPase do DNA mitocondrial, foi usado o mesmo protocolo assim descrito: 1 μ L de DNA, 1,5 μ L de cada *primer* (em uma concentração de 2mM), 1,5 μ L de tampão (Tris-KCL 200mM, pH 8,5), 1,5 μ L de MgCl 25mM, 1,5 μ L de dNTP 25mM, 0,3 μ L de enzima *Taq* polimerase 5U/ μ L e 6,2 μ L de água autoclavada deionizada completando um volume final de 15 μ L de reação em cada tubo *ependorf* de 0,2mL. Os *primers* utilizados para amplificar a região controle foram Chara LDL e Chara RDL; e para o gene da ATPase foram o ATP 8.2 e CO 3.2 (Tabela 4).

O perfil de amplificação tanto para região controle quanto para o gene da ATPase foi no primeiro ciclo uma etapa de dois minutos a 92 $^{\circ}$ C para desnaturação das fitas complementares do DNA. Os demais 35 ciclos foram constituídos de um minuto a 92 $^{\circ}$ C (desnaturação), um minuto a 50 $^{\circ}$ C (anelamento dos *primers*) e dois minutos a 72 $^{\circ}$ C (extensão dos seguimentos amplificados de DNA) e a extensão final a 72 $^{\circ}$ C por cinco minutos.

Para verificar a eficiência da reação amplificada foi utilizado 2 μ L do produto de PCR juntamente com 2 μ L de corante Bromofenol e em seguida, aplicados em gel de agarose 1,0%, com marcador (1Kb) de peso molecular

conhecido, para posterior comparação e estimativa da concentração do DNA em análise. Aproximadamente após 40 minutos de corrida, a 120 volts, o gel foi corado com brometo de etídio por 20 minutos e então visualizado através de um transluminador de luz UV *Image Master*.

Tabela 4. *Primers* utilizados para amplificação e seqüenciamento da região controle e do gene da ATPase do DNA mitocondrial de tabaqui.

D-LOOP		
<i>Primers</i>	Seqüências dos <i>primers</i>	Referências
Chara_LDloop	5'CCCACCACTAACTCCCAAAG 3'	Presente estudo
Chara_RDloop	5'GGTTTTGGGGTTTGAGAGG 3'	Presente estudo
CMF2	5'CATCTGGTTCCTATTTTCAGG 3'	Presente estudo
CMR2	5'GTGACCAAATGTCAGGTGGA 3'	Presente estudo
ATPase		
<i>Primers</i>	Seqüências dos <i>primers</i>	Referências
ATP 8.2_L8331	5'AAAGCRTYRGCCTTTTAAGC 3'	Sivasundar <i>et al.</i> (2001)
CO3.2_H9236	5'GTTAGTGGTCAKGGGCTTGGRTC 3'	Sivasundar <i>et al.</i> (2001)

A purificação dos produtos de PCR foi realizada utilizando-se EXOSAP (Enzimas *Exonuclease* e *Shrimp Phosphatase Alcaline*) seguindo o protocolo do fabricante. Estas enzimas sob temperatura ideal de ação (com o uso do termociclador) eliminam da reação amplificada resíduos de baixo peso molecular tais como sais, restos de *primers* e dNTPs.

3.4 Seqüenciamento da região controle e do gene da ATPase

As amostras foram seqüenciadas utilizando-se o kit de reação *DYEnamic™ ET dye terminator kit* (GE Healthcare). Devido à constituição da região controle para o tabaqui apresentar cerca de 1100 pares de bases, cada amostra foi seqüenciada em duas etapas. Em uma das etapas foi usado o *primer* interno CMF2 (*forward*) e em outra o *primer* interno CMR2 (*reverso*) desenvolvido pelo nosso grupo de pesquisa. A seqüência desses *primers* está

localizada a partir do sítio L 185 no DNAm humano. Para o gene da ATPase foi usado apenas o *primer* ATP 8.2 (*forward*) em uma única etapa (Tabela 4).

Para a reação de seqüência foi utilizado 2 µL do *primer* CMF2/CMR2 (quando se tratar da região controle), ou 2 µL do *primer* ATP 8.2 (quando se tratar do gene da ATPase) 3 µL de pré-mix (*Kit* citado acima), 3 µL de água *Milli-Q* e 2 µL do DNA purificado, resultando num volume total de 10 µL da reação de seqüência para cada amostra.

O perfil da reação foi: uma desnaturação inicial a 95°C por 25 segundos, seguidos de 30 ciclos a 95°C por 15 segundos (desnaturação das fitas complementares), 50°C por 10 segundos (anelamento dos *primers*) e 60°C por um minuto (extensão da região que foi seqüenciada). A precipitação do produto de reação de seqüência foi através de EDTA (125mM) e Etanol (100%) (conforme protocolo de laboratório). O DNA foi submetido a eletro-injeção no seqüenciador ABI 3130xl *DNA Analysis System* (Applied Biosystems), de acordo com a metodologia padrão do fabricante.

3.5 Genotipagens das amostras de tabaqui

As genotipagens foram realizadas em sistema *multiplex* durante a PCR com o propósito de melhor aproveitamento de tempo e reagentes. Depois de otimizados, os grupos de *primers* desenvolvidos por Santos *et al.* (2009) (Tabela 5) foram escolhidos por amplificarem em mesma temperatura, por possuírem alelos em faixas de tamanho diferentes ou estarem marcados por diferentes tipos de fluorescências que foram distinguidos na eletroforese (Figura 7).

Tabela 5. Sistema *multiplex* utilizado nas PCRs de genotipagens das amostras de tabaqui.

<i>Multiplex</i>	<i>Primers</i>	Fluorescência	Tamanho (pb)
Grupo 1	Cm2B1+Cm1E3+Cm1H8	FAM- HEX- FAM	120-170 /200-250 /250-320
Grupo 2	Cm2G5+Cm1D1+Cm1C6	FAM- HEX- FAM	100-150 /150-200 /250-300
Grupo 3	Cm1A8+Cm1G7	FAM-FAM	150-200 /300-350
Grupo 4	Cm1F7+Cm1A11	HEX-FAM	200-220 /220-260
Grupo 5	Cm1F4+Cm1F5	FAM-HEX	200-250 /250-300
Grupo 6	Cm1B8+Cm1C8	FAM-HEX	120-160 /220-260

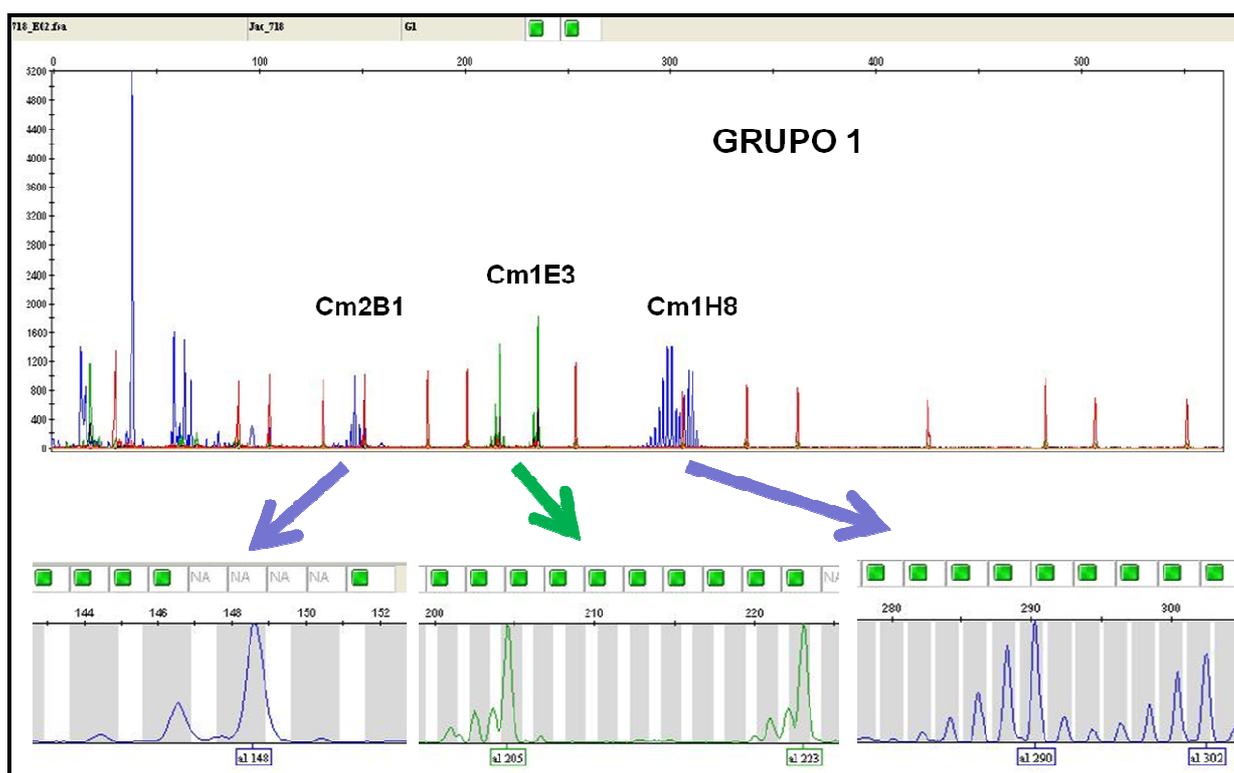


Figura 7. Exemplo de sistema *multiplex* visualizado no software *GeneMapper* mostrando os alelos de cada loco genotipado para um indivíduo de tabaqui.

As condições de amplificação para cada *multiplex* (conjunto de *primers*) com três *primers* foram: 1,5 µL de MgCl₂ (25mM), 1,5 µL de dNTPs (10 mM), 1,5 µL de tampão 10x (100mM Tris-HCl, 500mM KCl), 1,0 µL de cada *primer forward* contendo a cauda M13 (2 µM), 1,5 µL de cada *primer reverso*, 1,5 µL do *primer M13* marcado com fluorescência (FAM), 0,7 µL do *primer M13* marcado com fluorescência (HEX) 0,8 µL de *Taq DNA Polymerase* (5 U/µl) e 1

μL do DNA (com a concentração variando entre 50 ng e 100 ng), com um volume final de 14,5 μL . Com dois *primers* foram: 3,0 μL de água ultra pura, 1,5 μL de MgCl_2 (25mM), 1,5 μL de dNTPs (10 mM), 1,5 μL de tampão 10x (100mM Tris-HCl, 500mM KCl), 1,0 μL de cada *primer forward* contendo a cauda M13 (2 μM), 1,5 μL de cada *primer* reverso, 1,5 μL do *primer* M13 marcado com fluorescência (FAM), ou 0,7 μL de cada *primer* M13 marcado com fluorescência (FAM ou HEX) 0,6 μL de *Taq DNA Polymerase* (5 U/ μl) e 1 μL do DNA (com a concentração variando entre 50 ng e 100 ng), com um volume final de 14 μL .

O perfil da PCR foram os seguintes: desnaturação a 94°C por 20 segundos, temperatura de anelamento dos *primers* variando entre 60 a 65°C dependendo do *primer* por 20 segundos, e extensão a 68°C por 30 segundos, repetidas por 30 vezes, seguidas por outro ciclo para anelamento dos *primers* M13 com as seguintes condições: desnaturação a 94°C por 20 segundos, temperatura de anelamento do *primer* M13 a 50°C por 20 segundos, e extensão a 72°C por 30 segundos, repetidas por 15 vezes, com extensão final de 30 minutos a 72°C. Para verificar a eficiência da reação amplificada e comparação da banda em gel correspondente ao tamanho do microssatélite amplificado, foi utilizado 2 μL do produto de PCR juntamente com 2 μL de corante Bromofenol e em seguida, aplicados em gel de agarose 1,0%, com marcador (100pb).

3.6 Reação de Genotipagem

Os produtos dos PCRs foram diluídos de acordo com o padrão de intensidade das bandas visualizadas em gel de agarose. Os produtos de PCR que apresentaram as bandas com pouca intensidade foram diluídos em 10-30 μL de água ultra pura e os produtos de PCR que apresentaram bandas intensas, foram diluídas em 30-50 μL de água ultra pura. Para cada 1 μL de produto diluído foram adicionados 8,0 μL de formamida Hi - Di (Applied Biosystem, Inc), 1,0 μL de ROX (6-carboxi-X-rodamina (ROX) *size standard*, que

consiste em uma série de fragmentos de tamanho diferente e conhecido amplificados com *primers* específicos a partir de um molde de DNA conhecido pUC19), modificado de De Woody *et al.* (2004), que depois de preparado foi diluídos 1:5. As amostras foram genotipadas em seqüenciador automático ABI 3130xl (Applied Biosystems, Inc).

3.7 Análises estatísticas populacionais

DNA mitocondrial

As seqüências provenientes da região controle e dos segmentos das subunidades 6 e 8 do gene da ATPase do DNA mitocondrial foram alinhadas com o programa CLUSTAL W (Thompson *et al.* 1994), implementado no programa BIOEDIT 7.0.5 (Hall, 1999), onde a edição final foi realizada manualmente. Para a região controle foram acrescentados *gaps*, devido às seqüências de alguns indivíduos, apresentarem eventos de inserções e deleções (*indels*). Depois de concluído o alinhamento, os dois fragmentos de seqüências da região controle foram sobrepostos e em seguida justapostos para a obtenção da seqüência de DNAm final. Na matriz final foram retirados os sítios que apresentaram inserções e deleções para todos os indivíduos, com o propósito de que os indivíduos que apresentaram *indels*, compusessem o banco de dados para as análises populacionais.

O gene da ATPase da espécie em estudo, foi checado e comparado com o mesmo gene do Characiforme *Chalceus macrolepidotus*, cujo genoma mitocondrial completo está disponível no *GenBank*, para fins de identificação do início e final das subunidades 6 e 8 do referido gene. Posteriormente, o gene da ATPase do tambaqui foi traduzido em aminoácidos hipotéticos para verificar códons de parada inesperados, através do programa MEGA 3.0 (Kumar *et al.* 2004). A tradução das subunidades 6 e 8 do gene da ATPase foi realizada separadamente devido a uma sobreposição de 10 bp entre elas. Análises populacionais preliminares foram realizadas com as seqüências da

região controle e do gene ATPase separadamente e como os resultados foram congruentes, estas seqüências foram concatenadas para a realização das análises populacionais como informação do genoma mitocondrial.

O modelo molecular evolutivo de Hasegawa-Kishino-Yano (HKY) (Hasegawa *et al.* 1985), que considera composição molecular desigual entre as bases e diferenças nas taxas de substituição nucleotídica (transição e transversão), foi o melhor modelo intra-específico que se ajustou ao banco de dados das seqüências do genoma mitocondrial para tambaqui. Este modelo foi determinado no programa MODELTEST (Posada e Crandall, 1998).

3.7.1 Diversidade molecular das seqüências nucleotídicas de tambaqui

A diversidade genética foi estimada a partir do número de haplótipos (H), número de haplótipos únicos (Hu), número de sítios polimórficos ou segregantes (S), número total de mutação (ETA), diversidade gênica ou haplotípica (\hat{H}), que é a probabilidade de duas seqüências, escolhidas ao acaso em uma população, serem diferentes (Nei, 1987). Esta medida de polimorfismo é equivalente ao nível de heterozigosidade esperada, quando se trata de marcador com herança co-dominante (como o outro marcador utilizado neste estudo, os microsatélites), diversidade nucleotídica (π), que corresponde ao número de nucleotídeos diferentes por sítio entre seqüências escolhidas ao acaso em uma população (Nei e Li, 1979) e a média das diferenças nucleotídicas par a par (K). Todas estas medidas de variabilidade genética foram estimadas no programa ARLEQUIN versão 3.11 (Excoffier *et al.* 2005) e no programa DNASP versão 5.0 (Librado e Rozas, 2009).

3.7.2 Distribuição da Diversidade Genética em tambaqui

A partição da variabilidade genética nas amostras populacionais de tambaqui foi estimada pelo modelo estatístico de análise de variância molecular (AMOVA) (Excoffier *et al.* 1992), através do programa ARLEQUIN 3.11

(Excoffier *et al.* 2005). Esta análise é uma estimativa da estrutura genética populacional baseada na variação de frequência gênica por meio do número de mutações entre os haplótipos, como uma forma de medir a divergência evolutiva. Para tanto, diferentes níveis hierárquico são analisados, em que a diversidade genética (V_t) é dividida em componentes variantes dentro das populações (V_a) e entre as populações (V_b), e dessa forma o grau de significância da variabilidade genética dentro e entre populações é avaliado. AMOVA utiliza a razão entre os componentes variantes (V_a e V_b), para estimar o índice de fixação Φ_{ST} , que é análogo ao F_{ST} (Weir e Cockherham, 1984). Foram realizadas três combinações de agrupamento para as localidades amostradas, com o propósito de averiguar uma possível contribuição diferenciada para a variabilidade genética total observada, por alguma das localidades. Assim, seguiram-se os exercícios: 1) Todas as 21 localidades foram analisadas em um único nível hierárquico; 2) Retirou-se da matriz de dados a localidade de Guaporé (drenagem boliviana); 3) Agruparam-se as localidades em suas referidas drenagens (rio Solimões-Amazonas, rio Tapajós, rio Parú (Almeirim), rio Madeira, rio Purus, rio Juruá, rio Guaporé).

A partir dos valores de comparação par a par de Φ_{ST} , foi construído uma matriz de distância genética entre as 21 localidades. Esta matriz foi utilizada para inferir associação ou não, com a distância geográfica por meio do teste de Mantel (Mantel, 1967), através do programa ARLEQUIN 3.11. A matriz de distância geográfica (com as medidas em quilômetros) foi viabilizada com o auxílio do programa GOOGLE EARTH (*Google*), seguindo o curso dos rios entre cada par de localidades. Para correção do valor de probabilidade (P), para as comparações múltiplas de Φ_{ST} , foi usada a correção de Bonferroni (Rice, 1989), a fim de evitar “erros do tipo um” (rejeitar a hipótese nula, sendo esta verdadeira), devido ao fato de que várias comparações podem subestimar os valores de probabilidade. A partir do padrão de estruturação entre cada uma das localidades, evidenciado na matriz de comparação par a par de Φ_{ST} , foi possível estimar indiretamente e de forma linear os valores do número efetivo de fêmeas migrantes por geração (Nm). Todas as análises realizadas no

programa ARLEQUIN 3.11, tiveram sua significância avaliada por testes de permutação (10.000 replicações).

Também com o propósito de averiguar a estruturação genética para as amostras populacionais deste estudo, foi utilizada a Análise Espacial de Variância Molecular (SAMOVA), que define o melhor agrupamento biológico, *a posteriori*, a partir de populações geograficamente homogêneas (Dupanloup *et al.* 2002). Para esta análise é definido um número de grupo (K), onde a variância genética pela diferença entre grupos (índice de diferenciação F_{CT}) é maximizada. Considerando as 21 localidades amostradas, fez-se um exercício de computar várias SAMOVAs, variando de dois a 20 o número de K.

Para verificar e avaliar a ocorrência de populações geneticamente estruturadas foi usado um método de agrupamento bayesiano através do programa BAPS (*Bayesian Analysis of Genetic Population Structure*) versão 5.1 (Corander *et al.* 2007). Este método usa o algoritmo Bayesiano para a formação de grupos biológicos a partir da estimativa na distribuição das frequências alélicas de todas as populações. Inicialmente, o programa considera o número de populações como “desconhecido”, para posteriormente inferir o número de *clusters* (grupos) genéticos. À medida que diferenças nas frequências alélicas mostraram-se não significantes, estas foram recalculadas, bem como suas distribuições usando uma combinação de populações (Corander *et al.* 2003). Através da análise de mistura de populações, o agrupamento de indivíduos foi testado e posteriormente uma probabilidade foi usada para escolha do melhor valor para o número de *clusters* encontrados.

3.7.3 A distribuição dos haplótipos de tambaqui

Os haplótipos para as seqüências concatenadas do genoma mitocondrial e suas distribuições foram obtidos através do programa COLLAPSE 1.2 (Posada, 2004). O sistema de haplótipos foi construído com o auxílio do programa TCS versão 1.2.1 (Clement *et al.* 2000). Este programa estima a relação entre haplótipos com base no método da parcimônia,

agrupando-os a partir das mutações em suas seqüências. No entanto, não foi possível obter uma árvore de haplótipos esteticamente apresentável, devido à quantidade de haplótipos ser superior a 80% do total de indivíduos amostrados e às inúmeras conexões entre eles. Então, optou-se por gerar uma árvore de distância de Evolução Mínima (*Minimum Evolution-ME*) sem raiz, onde soma todos os comprimentos dos ramos da árvore (S), e a topologia que apresentar menor valor de S é a escolhida como a melhor árvore, com auxílio do programa MEGA 3.0 (Kumar *et al.* 2004). Para geração dessa árvore foi utilizado 15 haplótipos escolhidos aleatoriamente de cada oito locais (dois grupos formados por haplótipos da calha central e as outras localidades foram Tabatinga, Mexiana, Jacareacanga, Guaporé, Boca do Acre e Eirunepé situadas em pontos extremos da amostragem).

3.7.4 Tamanho Efetivo Populacional (N_e) e Fluxo gênico

As análises que utilizam métodos com base em coalescência permitem acesso às dimensões de tempo através das gerações passadas, e assim a história evolutiva da espécie pode ser reconstruída, ou seja, fornece uma avaliação do número de indivíduos que tenham contribuído à variação da amostra ao longo de uma parte da história da espécie. Conseqüentemente, são mais poderosas que as análises convencionais que estimam o N_e atual usando apenas distribuições das freqüências alélicas atuais e padrões de diferenças na seqüência de DNA (Frankham *et al.* 2002), não levando em conta a mutação histórica que distingue os alelos. As estimativas de N_e com base em coalescência também são mais eficiente (Felsenstein, 1992). Deste modo, análises com estas premissas são altamente eficazes para estimar tempo de divergência do mais recente ancestral nas populações (t), taxa de migração (m) e tamanhos efetivos populacionais (N_e), isto é, o número médio estimado de indivíduos se reproduzindo e contribuindo para a geração futura.

Para investigar padrões de mudança no tamanho efetivo populacional histórico de tabaqui, obtendo estimativas independentes do

parâmetro de diversidade (θ) e tempo do mais recente ancestral da espécie na área estudada (t), foi utilizado o programa BEAST (Drummond *et al.* 2007). As análises foram corridas por 50.000.000 de passos em cadeia de Monte Carlo (MCMC), com descarte (*burning*) inicial de 5.000.000 de passos, amostrando uma topologia a cada 1.000 passos e assumindo o modelo de evolução molecular HKY85 (Hasegawa *et al.* 1985). Foram realizadas 11 corridas independentemente (cada uma com 50.000 topologias) e depois sub-amostradas e combinadas. Através do programa BEAST, pode-se ainda estimar a probabilidade de específicos cenários demográficos como: constante tamanho populacional, crescimento logístico e crescimento exponencial para os dados analisados.

Para converter os resultados das análises de coalescência em informação biológica, foi assumido um tempo de geração de três anos, baseado no tamanho médio de maturidade para *Colossoma macropomum* que ocorre em 50-55 cm (Goulding e Carvalho 1982; Isaac e Ruffino 1996). Também foi assumido uma taxa de evolução para as seqüências do DNAm, baseada numa estimativa conservadora média de $2,0 \times 10^{-8}$ mutações por sítio e por ano (Farias *et al.* 2010).

3.7.5 Testes de Neutralidade e Demografia Populacional

O teste D de Tajima (Tajima, 1989) e o teste F_s de Fu (Fu, 1997) foram utilizados para examinar se as amostras populacionais se encontram em equilíbrio. Estes testes são importantes considerando que um desvio significativo do equilíbrio genético do DNAm é sinal de expansão ou redução do tamanho populacional recente nas situações onde nenhuma vantagem seletiva entre haplótipos existe, ou seja as mutações detectadas no banco de dados são neutras. O teste de D de Tajima compara o número de sítios polimórficos com a diversidade nucleotídica, estimado pela comparação entre pares de bases (Tajima, 1989). Enquanto que o teste F_s de Fu quantifica a polaridade da mutação e faz uma estimativa de θ (parâmetro populacional)

baseado no número de mutações únicas. Este teste mostra-se especialmente sensível para detectar expansão populacional, e a sua significância foi testada por comparações da estatística de F_s . Ambos os testes foram realizados utilizando o programa ARLEQUIN 3.1.1 (Excoffier *et al.* 2005).

Diferentes cenários de história demográfica podem ser revelados a partir da estimativa de distribuição da frequência das diferenças genética par a par (*mismatch distribution*) de cada população com o esperado para populações estáveis, em expansão ou redução. As amostras populacionais que estão em equilíbrio demográfico (estáveis), a distribuição das diferenças são geralmente multimodais (Slatkin e Hudson, 1991). Enquanto que as amostras populacionais que tenham passado por recente expansão ou redução possuem tipicamente distribuição das diferenças unimodais. Nesse caso, para distinguir redução e expansão populacional foram usadas as informações conjuntas de dois testes: o primeiro avalia a distribuição da soma dos quadrados das diferenças (*SSD*) entre a distribuição *mismatch* observada para cada localidade e a distribuição esperada para um modelo nulo de expansão, onde valores significantes para *SSD* indicam desvio do modelo de expansão populacional (Schneider e Excoffier, 1999). O outro teste foi inferido pelo índice de desigualdade de Harpending ($H_{ri}=r$) (Harpending, 1994), que estima a variância da distribuição, testando-as se são multimodais, a partir do pressuposto de que a distribuição possui perfil unimodal. Estas análises foram realizadas nos programas DNASP 5.0 (Librado e Rozas, 2009) e ARLEQUIN 3.11 (Excoffier *et al.* 2005) testado sob a significância de 10.000 permutações e um intervalo de confiança de 95%.

Microssatélites

3.7.6 Estimativa dos tamanhos dos alelos e Parâmetros genéticos

O tamanho dos alelos (em pb) foi estimado e editado usando o *software* específico para genotipagem *GeneMapper*[™] *software* versão 4.0 (Applied Biosystems Inc.). Esse *software* determina o tamanho dos alelos, através da comparação com o marcador ROX *size standard*. Após a formação da matriz de dados com os tamanhos dos alelos, esta foi submetida ao programa MICRO-CHECKER (Van Oosterhout *et al.* 2004) para verificar a ocorrência de artefatos técnicos como a presença de alelos nulos, *stutters*, e *large dropout* de alelo (amplificação preferencial do menor alelo quando a diferença entre os alelos é grande). Para as análises populacionais, foram retirados de todos os alelos (com tamanho em pb) a região referente ao *primer* + fragmento M13 e as regiões flangeadoras ao microssatélite, ficando assim, o tamanho dos alelos exclusivamente com o número de repetições.

Foi calculado o número de alelos (A), a heterozigosidade observada (H_o) e esperada (H_E), o desequilíbrio de ligação entre os pares de locos (quando dois locos estão no mesmo cromossomo e próximos, não há independência na informação genética, super ou subestimando a informação real) e o teste para o equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW). Adicionalmente, foram estimados a riqueza alélica (A_R), o número total de alelos (A_T), a média da diversidade gênica, a média de diferenças par a par das localidades. Todos esses parâmetros foram realizados usando o programa ARLEQUIN 3.1.1. (Excoffier *et al.* 2005). Os níveis de significância para o teste de equilíbrio de EHW e para desequilíbrio de ligação foram corrigidos pelo método de Bonferroni (Rice, 1989). O número de alelos exclusivos e sua frequência (presente apenas em uma localidade) foram obtidos através do programa GENALEX 6.2 (Peakall e Smouse, 2006).

3.7.7 Análises de estrutura populacional

A existência de diferenciação genética (com dados de microssatélites) pode ser verificada usando as medidas de F_{ST} (Wright, 1951) ou R_{ST} (Slatkin, 1995). As distâncias genéticas do R_{ST} são baseadas na variação no número de repetições (tamanho dos alelos) e usa o modelo de mutações gradual em passos – *Stepwise Mutation Model* (SMM), enquanto que as distâncias para o F_{ST} são calculadas com base na frequência de alelos, sob o modelo de mutação por alelos infinitos (IMA). Para análises utilizando menos que 20 locos microssatélites, as estimativas de F_{ST} são melhores (Gaggiotti *et al.* 1999) e, por tanto, foram as utilizadas no presente estudo para a análise de variância molecular (AMOVA) (Excoffier *et al.* 1992), a fim de verificar o grau de diferenciação genética entre as amostras populacionais.

Seguindo os mesmos testes para AMOVA com dados de DNAm, também foram realizadas análises com: 1) todas as localidades e 2) retirou-se Guaporé. A matriz com valores de F_{ST} par a par entre as localidades e uma matriz com as distâncias geográficas foram utilizadas para o teste de Mantel, para averiguar uma possível correlação. Todas essas análises tiveram sua significância estatística testada por 10.000 permutações com um intervalo de confiança de 95%, realizadas no programa ARLEQUIN 3.1.1. (Excoffier *et al.* 2005). As comparações par a par de F_{ST} foram ajustadas com a correção de Bonferroni (Rice, 1989).

Adicionalmente, a Análise Espacial de Variância Molecular (SAMOVA) foi utilizada para averiguar estruturação genética. A premissa da análise é definir o melhor agrupamento biológico (K), *a posteriori*, a partir de populações geograficamente homogêneas (Dupanloup *et al.* 2002), onde a variância genética pela diferença entre grupos (índice de diferenciação F_{CT}), é maximizada. A SAMOVA utilizou o método de distância pela soma do quadrado das diferenças no tamanho dos alelos (R_{ST}), sendo que neste estudo várias SAMOVAS foram executadas, variando de dois a 20 o número de (K).

Para identificar o número de populações geneticamente homogêneas (K), entre as amostras populacionais, foi utilizada uma análise

Bayesiana através do programa STRUCTURE 2.2 (Pritchard *et al.* 2000). O método do programa assume equilíbrio de Hardy-Weinberg e de ligação dentro das amostras populacionais para encontrar um número de grupos (K), *a posteriori*, que melhor se ajusta ao bando de dados. Para tanto, um indivíduo é atribuído a uma população (grupo) a partir de seus genótipos multilocos, de forma que minimize o desvio do EHW e de ligação, usando frequências alélicas correlacionadas em uma amostragem da cadeia de Markov Monte Carlo (MCMC). Foram realizadas 11 corridas independentes para cada agrupamento (valor de K variando de um a 20). A análise foi corrida com 1.000.000 de passos (simulações) para MCMC, descartando 100.000 passos antes de iniciar a corrida, utilizando o modelo de mistura (*admixture model*) que assume que cada indivíduo da amostragem pode ter ancestrais de mais de uma população.

3.7.8 Tamanho efetivo populacional e Fluxo gênico

Análises de coalescência implementada no programa IMA2 (Hey e Nielsen, 2007) foram utilizadas para estimar os parâmetros θ , m e t , sendo que o teta (θ) é um parâmetro populacional relacionado a quantidade de diversidade genética em uma população, pelo tamanho da população e taxa de mutação, onde: $2N \times 2\mu = \theta$. Assim os valores obtidos resultaram de uma distribuição de probabilidade associada a cada parâmetro (diversidade, migração e tempo de compartilhamento ancestral), usados para explicar os padrões observados no presente.

Seguindo o disposto por Farias *et al.* (2010), com dados de DNAm, preliminarmente, foram realizadas corridas para obter valores mais realistas, entre os maiores e menores, para cada um dos parâmetros estimados, implementado pelo modelo KHY 85 (Hasegawa *et al.* 1985) de evolução molecular selecionado pelo programa MODELTEST (Posada e Crandall, 1998). Este modelo calcula as taxas de transição e transversão, considerando que parte dos sítios são invariáveis e que a taxa de mutação dos sítios restantes tenham distribuição gama. Uma vez que os limites foram estabelecidos, foram

geradas 20.000.000 de corridas de cadeias de Monte Carlo - *Markov Chain Monte Carlo* (MCMC), após 1.000.000 de passos descartados. Foram realizadas duas corridas independentes com diferentes pontos de início, para fins de verificar convergência. As duas corridas independentes foram combinadas e os parâmetros θ , m e t , foram estimados. Em seguida, estes foram convertidos em parâmetros demográficos tais como: tamanho efetivo populacional, número de migrantes e o tempo de divergência para as amostras populacionais de tabaqui. Para converter os resultados das análises de coalescência em informação biológica, assumiu-se um tempo de geração de três anos para tabaqui (já justificado acima com dados de DNAm), e taxa de mutação $\mu = 5 \times 10^{-4}$ (taxa média de evolução dos microssatélites; Di Rienzo *et al.* 1994).

Quando detectado uma redução do número de alelos e da heterozigosidade em uma população, infere-se que a mesma tenha experimentado uma recente redução no tamanho efetivo populacional (N_e). Nessa condição, segundo Yu *et al.* (1999), o número de alelos é reduzido mais rapidamente do que a heterozigosidade esperada (H_E), uma vez que os alelos raros são rapidamente perdidos por deriva genética durante uma redução do tamanho efetivo populacional e os mesmos contribuem pouco para a heterozigosidade esperada.

Para verificar se as amostras populacionais de tabaqui experimentaram uma recente redução no tamanho efetivo populacional, realizou-se a análise do teste M , implementada no programa M Value (Garza e Williamson, 2001). Essa análise detecta redução do N_e via redução do número de alelos, com base no cálculo da taxa do número total de alelos k , e na variação no tamanho dos alelos r . Então $M=k/r$, onde $r = S_{\max} - S_{\min} + 1$ (S_{\max} é o tamanho do maior alelo; S_{\min} é o tamanho do menor alelo na amostra populacional). A perda de qualquer alelo contribuirá para a redução em k , enquanto que a perda do maior ou menor alelo contribuirá para a redução de r . Desta forma, espera-se que k seja reduzido mais rapidamente do que r em uma população em vias de diminuição no tamanho populacional, e por tanto,

espera-se que a taxa M seja menor em tais populações (Garza e Williamson, 2001).

Avaliando e comparando vários trabalhos com enfoque de redução no tamanho populacional, Garza e Williamson, (2001) sugeriram que valores de $M < 0.70$, com um banco de dados composto por até sete locos de microsatélite, configuraria a uma recente redução no tamanho populacional para a espécie em estudo. Com os dados deste estudo, o teste M foi simulado sobre o modelo de evolução dos microsatélites *Two Phase Model* (TPM) (Di Rienzo *et al.* 1994). Para este modelo foi assumido que 90% das mutações são obtidas via modelo de mutações gradual em passos (SSM), enquanto que os 10% restantes não são. Para a significância do teste M , foram utilizadas 10.000 permutações e o nível de significância foi corrigido pelo método de Bonferroni (Rice, 1989).

Para realização dessa análise o valor de teta ($\theta = [1/(1-H)^2] - 1$), onde H é a heterozigosidade esperada, foi calculado através do programa ARLEQUIN 3.1.1. (Excoffier *et al.* 2005). Considerando $\theta = 4N_e\mu$, a estimativa desse parâmetro de diversidade genética é o índice sumarizado que representa quatro vezes o tamanho efetivo populacional e a taxa de mutação (Hartl e Clark, 1997). O $\theta = 2,22$ e $\theta = 1,91$ foram os valores calculados para a bacia Amazônica e Boliviana, respectivamente. Com a finalidade de comparação, foi estimado (simulado) um valor de $\theta = 7,00$, aproximadamente três vezes maior que os tetas do presente estudo, e que representaria o antes da sobre exploração da espécie. Com isso, supõe-se que o tamanho efetivo populacional atual é de aproximadamente 30% do tamanho efetivo populacional total do passado. Esta simulação do valor de teta para antes da sobre exploração teve como base o estudo de Hrbek *et al.* (2005) com o pirarucu *Arapaima gigas*.

4. RESULTADOS

O DNA mitocondrial

4.1 A diversidade molecular do tambaqui

A região controle e o gene da ATPase foram seqüenciados em um total de 539 indivíduos, distribuídos em 21 localidades. Para o gene da ATPase, 732 pb foram obtidos, correspondendo a toda a subunidade 8 e cerca de 90% da subunidade 6 do referido gene. Após tradução do gene, houve a formação de 243 aminoácidos, sendo 24 variáveis, e a maioria decorrente de mutação na terceira posição do códon. Para a região controle foram obtidos um total de 940 pb, mas devido a presença de inserções (105 pb) e deleções (6 pb), em alguns indivíduos, 111 pb foram retirados da região controle.

As seqüências referentes aos dois fragmentos gênicos mitocondriais foram concatenadas, resultando em um total de 1561 sítios informativos para as análises populacionais. Destes, 228 foram sítios polimórficos, com um número total de mutação ($ETA=234$), das quais foram constatadas 193 transições e 41 transversões. O maior e menor número de transições foi observado nas amostras de Oriximiná (84) e Fonte Boa (45), respectivamente. Com relação às transversões, o maior número (14) está nas amostras de Tapauá e Tabatinga, e o menor (1) em Almeirim.

A composição de bases nucleotídicas apresentou 27,5% de citosina, 28,4% de timina, 30,5% de adenina e 13,6% de guanina. Esta baixa percentagem de guanina tem sido verificada para diversas outras espécies de peixes com estudos mitocondriais (Hrbek e Farias, 2008; Machado, 2009; Batalha, 2009; Galletti, 2009; Silva, 2009; Rodrigues, 2009; Batista, 2010). A região controle do DNAm_t freqüentemente é rica em A/T (adenina e timina) e exibe uma forte tendência contra guanina que parece ser padrão para o genoma mitocondrial inteiro, inclusive para genes que codificam proteínas (Meyer, 1993). O padrão anti-guanina pode decorrer em parte, devido à seleção contra este nucleotídeo que é menos estável na fita leve, que fica

exposta como fita simples por um considerável período de tempo durante a replicação assimétrica do DNAm (Clayton,1982). Adicionalmente a este padrão, pode ser o resultado da preferência pela adenina (A) durante a transcrição do RNA mensageiro, devido o ATP, ser o ribonucleotídeo mais disponível nas mitocôndrias, o que tornaria a transcrição muito mais eficiente (Xia, 1996).

Tabela 6. Indivíduos que apresentaram eventos de inserções e/ou deleções na região controle do DNAm. (pb= pares de bases).

Indivíduos	Inserção (Sítio 102)	Inserção (Sítio 86)	Inserção (Sítio 606)	Deleção (Sítio 25)
Ori 38	33 pb	-	-	-
Nha 596		1 pb	-	-
Bor 699		1 pb	-	4 pb
Mao 233		1 pb	-	-
Mao 234		1 pb	-	-
Eir 581		1 pb	-	4 pb
Eir 677		1 pb	-	-
Ita 163		66 pb	-	-
Ita 222	1 pb		-	6 pb
Mao 228	-		-	-
Tap 245	1 pb		-	-
Fbo 339	-		-	-
Tab 46	1 pb		-	-
Mex 544	-		-	6 pb
Ita 170	99 pb	1 pb	1 pb	6 pb
Ita 179		1 pb	1 pb	6 pb
Ita 219		1 pb	1 pb	6 pb
Jac 263		1 pb	1 pb	6 pb
Jac 709		1 pb	1 pb	6 pb
Nha 608		-	-	-
Pin 14		-	1 pb	-
Bor 95		-	-	-

Nota: Ori (Oriximina), Nha (Nhamundá), Mao (Manaus), Bor (Borba), Eir (Eirunepé), Ita (Itaituba), Fbo (Fonte Boa), Tap (Tapauá), Tab (Tabatinga), Pin (Parintins), Mex (Mexiana) e Jac (Jacareacanga).

Na região controle, eventos de inserções e/ou deleções foram observados em 22 indivíduos distribuídos em 12 localidades tanto na calha quanto nos tributários amostrados (Tabela 6). A região controle usualmente é

caracterizada por três domínios: 1º) domínio corresponde às regiões TAS (seqüências associadas com a terminação da síntese da fita pesada durante a replicação); 2º domínio corresponde à região central conservada (RCC); e o 3º domínio caracterizado por seqüências conservadas em blocos (CSBs), as quais estão associadas com a origem de replicação (O_H) do genoma mitocondrial (Ray e Densmore, 2003) (Figura 8).

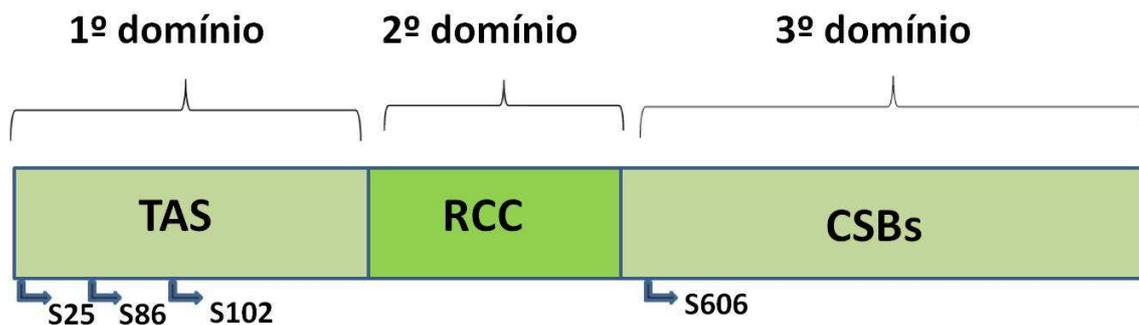


Figura 8. Esquema da região controle do DNAmT, evidenciando os três domínios e suas regiões. TAS- seqüências associadas com a terminação da síntese da fita pesada durante a replicação, RCC- região central conservada, CSBs- seqüências conservadas em blocos associadas com a origem de replicação, S-sítios de inserções/deleções presente nas amostras de tambaqui.

No 1º domínio foram constatadas as deleções de quatro a seis bases (no sítio 25), que está situada dentro de uma região de microssatélite, e as inserções (nos sítios 86 e 102), que estão logo após regiões ricas em A/T. A inserção que ocorreu no sítio 102, compreende um fragmento de 33 pb que se repete em blocos. A última inserção (no sítio 606) foi evidenciada no terceiro domínio, e também após regiões ricas em A/T.

Nos peixes, os domínios TAS e CSBs correspondem às regiões altamente variáveis, onde é mais comum observar eventos de inserções/deleções, seqüências repetidas e seqüências repetidas em tandem (microssatélites), além da alta freqüência de A/T (Meyer, 1993). É sabido que em toda origem de replicação há tendência de alta freqüência de A/T devido as ligações que as unem (pontes de hidrogênio) serem mais instáveis, favorecendo a abertura da fita de DNAmT para replicação. Assim, os dois

domínios em questão parecem está mais propensos a eventos de inserções/deleções, devido ao mecanismo de deslizamento da enzima DNA polimerase durante a replicação ou no despareamento da fita (Li, 1997). Por causa desses *indels*, e da presença de microssatélites, o tamanho da região controle é altamente variável entre espécies muito próximas (Lee *et al.* 1995), e mesmo em nível intra populacional, como o observado para tambaqui.

4.2 Análise e distribuição dos haplótipos

Dos 539 indivíduos analisados, foram encontrados 444 haplótipos, sendo que 400 são haplótipos únicos. Dos 44 haplótipos compartilhados, a maioria compartilha dois haplótipos e apenas o H49 e H66 apresentaram oito haplótipos compartilhados, representando o maior número observado. Um dos haplótipos mais freqüentes (H66) é compartilhado por Itaituba e Jacareacanga, enquanto o H49 é compartilhado por um maior número de localidades, que além das duas já citadas, incluem Santarém, Parintins e Borba (Tabela 7).

De modo geral, o compartilhamento desses 44 haplótipos ocorre praticamente entre todas as localidades (apenas Carauari, no rio Juruá não compartilha haplótipos), e de forma homogênea, onde não há relação apenas com localidades próximas geograficamente, como pode ser visto na Figura 9. Esse padrão de distribuição no compartilhamento de haplótipos, associado aos valores de número de migrante por geração Nm , indica que entre as amostras populacionais de tambaqui está ocorrendo um intenso fluxo gênico. Os valores de Nm foram derivados das medidas de F_{ST} , assim representam um fluxo gênico indireto, com base em uma média de indivíduos que saem e que entram na população (Tabela 12).

A menor percentagem (32%) de haplótipos únicos em relação ao número de haplótipos foi observada em Jacareacanga, enquanto que em Carauari (100%) dos haplótipos foram únicos. Em virtude do alto número de haplótipos encontrado neste estudo, pode-se inferir que em termos de diversidade haplotípica, as amostras populacionais apresentam elevada variabilidade genética.

Tabela 7. Lista dos 44 haplótipos compartilhados de tabaco e suas quantidades entre as localidades amostradas. H=haplótipos

H	Mex	Alm	San	Ita	Jac	Ori	Nha	Pin	Bor	Hum	Pve	Gua	Mao	Tap	Bda	Coa	Tef	Car	Eir	Fbo	Tab	Total	
H2	1															1						2	
H23						1		1			1		1									1	5
H26		1				1																1	3
H27		1			1																		2
H28		2					1												1				4
H29		1			1																		2
H32		1			1																		2
H47			1					1					1										3
H49			1	1	4			1	1														8
H63				2												1							3
H65				1	3								1										5
H66				4	4																		8
H68				1	1																		2
H69				2	2																		4
H70				2	1																		3
H71				2																			2
H78				2	1																		3
H87					1																	1	2
H88					1	1																	2
H90					2								1								1		4
H105						1	1																2
H125							2			2		1		1								1	7
H126							1														1		2
H142							1		1														2
H155								1												2			3
H157								1								1							2
H159								1									1						2
H164									1		1												2
H168									1						1								2
H174									1		1		2				1				1	1	7
H176									1												1		2
H180										1		1											2
H181										2	2												4
H198											7												7
H219													1			1							2
H222													1				1				2		4
H258															1						1		2
H292																1	1					1	3
H294																	2						2
H295																	2						2
H301																	1				1		2
H345																					2		2
H363																						2	2
H427												2											2

Nota: Mex (Mexiana), Alm (Almeirim), San (Santarém), Ita (Itaituba), Jac (Jacareacanga), Ori (Oriximiná), Nha (Nhamundá), Pin (Parintins), Bor (Borba), Hum (Humaitá), Pve (Porto Velho), Gua (Guaporé), Mao (Manaus), Tap (Tapauá), Bda (Boca do Acre), Coa (Coari), Tef (Tefé), Car (Carauari), Eir (Eirunepé), Fbo (Fonte Boa) e Tab (Tabatinga).

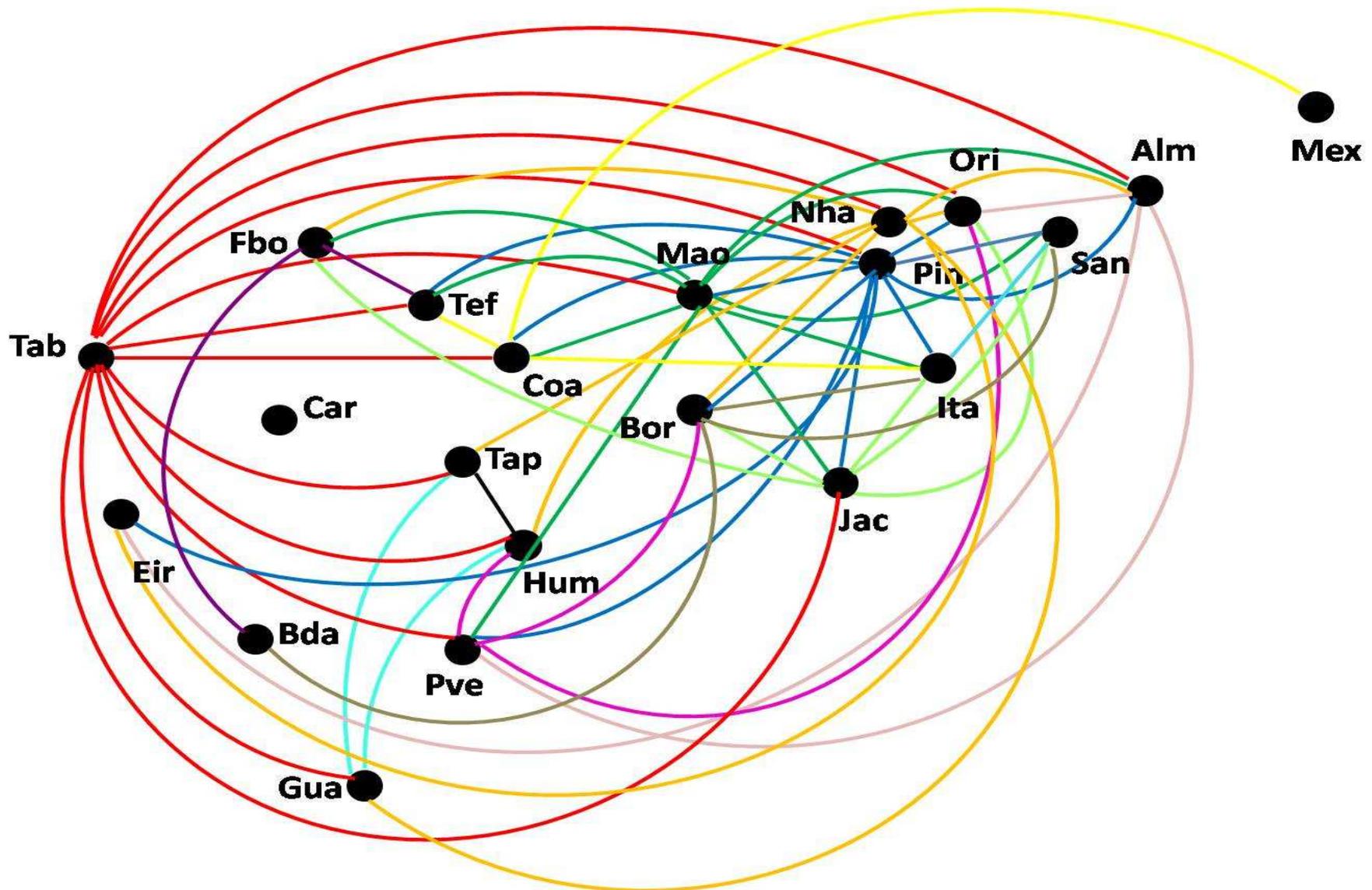


Figura 9. Esquema gráfico do compartilhamento de haplótipos entre as localidades amostradas. Os pontos foram plotados sob um mapa geográfico. Mex (Mexiana), Alm (Almeirim), San (Santarém), Ita (Itaituba), Jac (Jacareacanga), Ori (Oriximiná), Nha (Nhamundá), Pin (Parintins), Bor (Borba), Hum (Humaitá), Pve (Porto Velho), Gua (Guaporé), Mao (Manaus), Tap (Tapauá), Bda (Boca do Acre), Coa (Coari), Tef (Tefé), Car (Carauari), Eir (Eirunepé), Fbo (Fonte Boa) e Tab (Tabatinga).

4.3 A Diversidade genética do tambaqui

Os níveis de variabilidade genética foram estimados com base nos parâmetros genéticos e na análise de polimorfismo do DNA. Os índices de diversidade molecular como número total de mutação (ETA), média das diferenças par a par (K) e diversidade nucleotídica (π), apresentaram menores níveis em Mexiana, na Foz do rio Amazonas (**ETA=51**, **K=14,361±6,822** e **$\pi=0,0092±0.0049$**) e maiores em Tapauá, no rio Purus (**ETA=95**, **K=21,116±9,606** e **$\pi=0,0135±0,0068$**). Quando as análises foram realizadas agrupando as localidades por rio, verificou-se que a diversidade nucleotídica é praticamente homogênea, variando de $\pi=0,0095$ (no rio Parú) para $\pi=0,0133$ (no rio Purus) e a razão entre o número de haplótipos e o tamanho amostral foi superior a 80% para todos os rios, exceto para o rio Tapajós (60%), sendo que a maior razão (100%) foi observada para o rio Purus (Tabela 8).

Níveis altos e relativamente homogêneos de diversidade haplotípica também foram constatados, variando de quase 90% em Porto Velho ($\hat{H}=0,895$) a 100% ($\hat{H}=1,000$) em nove localidades (Tabela 9). Considerando os rios, a menor diversidade haplotípica está no rio Tapajós ($\hat{H}=0,967$) e a maior no rio Purus ($\hat{H}=1,000$). Fazendo-se uma avaliação conjunta dos dados obtidos verificamos que os níveis de variabilidade genética são altos e não estão associados diretamente com determinadas localidades, calha ou tributário, mas parecem ser um reflexo para bacia Amazônica e Boliviana como um todo.

Tabela 8. Diversidade genética por drenagem. N=tamanho amostral, H=número de haplótipos, Hu=número de haplótipos únicos, H/N=razão entre o número de haplótipos e o tamanho amostral, \hat{H} = diversidade haplotípica, π =diversidade nucleotídica.

Rios	N	H	Hu	H/N	\hat{H}	π
Rio Amazonas	117	112	98	0.96	0.999±0.001	0.0116±0.0057
Rio Parú	21	20	14	0.95	0.995±0.016	0.0095±0.0049
Rio Tapajós	61	36	21	0.60	0.967±0.011	0.0104±0.0052
Rio Madeira	62	50	39	0.81	0.984±0.008	0.0116±0.0058
Rio Guaporé	69	68	64	0.98	0.999±0.002	0.0124±0.0061
Rio Purus	49	49	46	1.0	1.000±0.004	0.0133±0.0066
Rio Juruá	41	40	38	0.98	0.998±0.005	0.0126±0.0063
Rio Solimões	119	103	80	0.87	0.996±0.001	0.0121±0.0060

Tabela 9. Parâmetros genéticos estimados para *Colossoma macropomum*, com dados de DNAm.

Região	Localidades	N	H	Hu	S	ETA	\hat{H}	π	K
Bacia Amazônica	Mexiana -PA	15	15	14	51	51	1,000 ± 0,024	0,0092 ± 0,0049	14,361 ± 6,822
	Almeirim-PA	21	20	14	60	60	0,995 ± 0,016	0,0095 ± 0,0049	14,895 ± 6,942
	Santarém-PA	26	26	24	60	60	1,000 ± 0,010	0,0118 ± 0,0060	18,483 ± 8,468
	Itaituba-PA	32	24	15	77	77	0,977 ± 0,014	0,0111 ± 0,0056	17,334 ± 7,911
	Jacareacanga-PA	29	19	6	61	61	0,958 ± 0,020	0,0097 ± 0,0050	15,270 ± 7,026
	Oriximiná-PA	34	34	30	93	93	1,000 ± 0,007	0,0121 ± 0,0061	18,948 ± 8,604
	Nhamundá-AM	22	21	16	73	73	0,995 ± 0,015	0,0105 ± 0,0054	16,541 ± 7,659
	Parintins-AM	20	20	14	66	66	1,000 ± 0,015	0,0120 ± 0,0062	18,731 ± 8,666
	Borba-AM	19	19	13	80	80	1,000 ± 0,017	0,0128 ± 0,0066	20,116 ± 9,306
	Humaitá-AM	22	20	17	59	59	0,991 ± 0,016	0,0106 ± 0,0054	16,610 ± 7,689
	Porto Velho-RO	21	14	9	60	60	0,895 ± 0,061	0,0106 ± 0,0055	16,580 ± 7,691
	Manaus-AM	30	29	22	75	75	0,997 ± 0,009	0,0119 ± 0,0060	18,728 ± 8,537
	Tapauá-AM	28	28	27	94	95	1,000 ± 0,009	0,0135 ± 0,0068	21,116 ± 9,606
	Boca do Acre-AM	21	21	19	73	73	1,000 ± 0,014	0,0130 ± 0,0067	20,352 ± 9,368
	Coari-AM	20	20	15	70	70	1,000 ± 0,015	0,0116 ± 0,0060	18,173 ± 8,418
	Tefé-AM	18	16	9	62	62	0,986 ± 0,022	0,0116 ± 0,0060	18,235 ± 8,488
	Carauari-AM	25	25	25	84	84	1,000 ± 0,011	0,0134 ± 0,0068	21,033 ± 9,605
	Eirunepé-AM	16	15	13	58	58	0,991 ± 0,025	0,0102 ± 0,0054	16,050 ± 7,557
Fonte Boa-AM	20	18	10	49	49	0,989 ± 0,019	0,0105 ± 0,0054	16,431 ± 7,641	
Tabatinga-AM	31	30	24	87	88	0,997 ± 0,008	0,0130 ± 0,0065	20,335 ± 9,234	
Bacia Boliviana	Guaporé	69	68	64	73	75	0,999 ± 0,002	0,0124 ± 0,0061	19,448 ± 8,711
	Todas localidades	539	444	400	228	234	0,998 ± 0,000	0,0124 ± 0,0060	19,416 ± 8,605

Nota: N= número de indivíduos; H= número de haplótipos; Hu= número de haplótipos únicos; S= número de sítios polimórficos; ETA= número total de mutações; \hat{H} = Diversidade haplotípica; π = Diversidade nucleotídica e K= média do número de diferenças nucleotídicas par a par.

4.4 A distribuição da Diversidade Genética

Estimando a variação genética dentro e entre as amostras populacionais, através da AMOVA, pôde-se verificar a distribuição da diversidade genética de tabaqui. Isto posto, verificou-se que nas três simulações de análises realizadas, mais de 90% da variabilidade genética encontra-se dentro das localidades ou tributários (Tabela 10). Considerando-se os valores de F_{ST} proposto por Wright (1978) para inferir níveis de diferenciação genética, e sendo este análogo ao Φ_{ST} , entende-se que há uma baixa diferenciação genética e que foi significativa para todas as combinações analisadas. No entanto, é oportuno ressaltar que, quando Guaporé (na bacia Boliviana) é retirada da análise, o valor de Φ_{ST} é o mais baixo (0.032), praticamente a metade do valor de Φ_{ST} (0.062) quando todas as localidades foram analisadas. Entre os tributários, com características ecológicas e geológicas peculiares, suas amostras populacionais apresentaram 5,27% de diferenciação genética (Tabela 10).

Tabela 10. Análise de variância molecular (AMOVA). Va (Variância entre populações); Vb (Variância dentro das populações); Φ_{ST} (índice de fixação).

Análises	Va	Vb	Φ_{ST}
Todas as localidades	6.23	93.77	0.06231 ($P < 0.05$)
Localidades na bacia Amazônica (sem Guaporé)	3.23	96.77	0.03232 ($P < 0.05$)
Tributários	5.27	94.73	0.05268 ($P < 0.05$)

Tabela 11. Valores de Φ_{ST} par a par entre as localidades amostradas com dados de DNAm. Em destaque os valores significantes, após correção de Bonfferoni ($P < 0.00024$).

	Mex	Alm	San	Ita	Jac	Ori	Nha	Pin	Bor	Hum	Pve	Gua	Mao	Tap	Bda	Coa	Tef	Car	Eir	Fbo	Tab	
Mex																						
Alm	-0.0182																					
San	0.0702	0.0810																				
Ita	0.0178	0.0066	0.0779																			
Jac	-0.0010	-0.0184	0.0639	-0,0075																		
Ori	-0.0111	-0.0031	0.0276	0.0225	0.0058																	
Nha	0.0145	-0.0130	0.1015	0.0275	0.0188	0.0097																
Pin	-0.0000	-0.0052	0.0149	0.0289	-0,0008	-0,0157	0.0217															
Bor	0.0047	0.0066	0.0257	0.0151	0.0159	-0,0049	0.0168	0.0051														
Hum	0.0592	0.0443	0.0702	0.0832	0.0631	0.0281	0.0078	0.0421	0.0379													
Pve	0.1101	0.0842	<u>0.1479</u>	0.1282	0.1099	0.0852	0.0346	0.0929	0.0984	0.0092												
Gua	0.1269	<u>0.1410</u>	<u>0.1744</u>	<u>0.1526</u>	<u>0.1464</u>	<u>0.1405</u>	<u>0.1586</u>	0.1249	<u>0.1124</u>	<u>0.1897</u>	<u>0.1920</u>											
Mao	0.0252	0.0330	0.0037	0.0420	0.0300	0.0027	0.0376	0.0067	0.0044	0.0312	0.0976	<u>0.1654</u>										
Tap	0.0088	0.0224	0.0208	0.0149	0.0233	-0,0078	0.0286	0.0106	0.0110	0.0469	0.0946	<u>0.1097</u>	0.0011									
Bda	0.0259	0.0339	0.0478	0.0518	0.0381	0.0220	0.0341	0.0203	0.0128	0.0362	0.0675	0.1004	0.0187	0.0093								
Coa	-0.0083	0.0020	0.0385	0.0174	0.0101	-0,0062	0.0050	0.0147	-0,0032	0.0357	0.0869	<u>0.1128</u>	0.0075	0.0002	0.0121							
Tef	0.1026	0.1084	-0,0059	0.0874	0.0883	0.0472	0.1119	0.0517	0.0230	0.0768	<u>0.1534</u>	<u>0.1802</u>	0.0121	0.0159	0.0458	0.0543						
Car	0.0545	0.0735	0.0498	0.0705	0.0664	0.0517	0.0927	0.0448	0.0225	0.0914	0.1319	0.0875	0.0333	0.0168	0.0185	0.0330	0.0471					
Eir	-0.0033	-0.0168	0.0712	0.0257	0.0036	0.0019	0.0169	0.0069	-0,0001	0.0092	0.0432	<u>0.1418</u>	0.0161	0.0183	0.0225	-0,008	0.0823	0.0577				
Fbo	0.0113	0.0264	0.0135	0.0266	0.0148	0.0033	0.0445	0.0007	-0,0058	0.0701	0.1327	0.1153	0.0011	-0,0057	0.0206	-0,014	0.0185	0.0244	0.0291			
Tab	0.0165	0.0141	0.0741	0.0443	0.0267	0.0268	0.0360	0.0082	0.0117	0.0654	0.0879	0.0736	0.0422	0.0254	0.0121	0.0131	0.0821	0.0280	0.0169	0.0281		

Nota: Mex (Mexiana), Alm (Almeirim), San (Santarém), Ita (Itaituba), Jac (Jacareacanga), Ori (Oriximiná), Nha (Nhamundá), Pin (Parintins), Bor (Borba), Hum (Humaitá), Pve (Porto Velho), Gua (Guaporé), Mao (Manaus), Tap (Tapauá), Bda (Boca do Acre), Coa (Coari), Tef (Tefé), Car (Carauari), Eir (Eirunepé), Fbo (Fonte Boa) e Tab (Tabatinga).

Tabela 12. Fluxo gênico a partir dos valores de Nm (número de fêmea migrante por geração com base no F_{ST}) par a par entre as localidades amostradas com dados de DNAm.

	Mex	Alm	San	Ita	Jac	Ori	Nha	Pin	Bor	Hum	Pve	Gua	Mao	Tap	Bda	Coa	Tef	Car	Eir	Fbo	Tab	
Mex																						
Alm	inf																					
San	6,61	5,66																				
Ita	27,54	75,31	5,91																			
Jac	inf	inf	7,31																			
Ori	inf	inf	17,57	21,65	84,61																	
Nha	33,95	inf	4,42	17,63	26,07	50,55																
Pin	inf	inf	32,89	16,74	inf	inf	22,45															
Bor	104,96	74,63	18,88	32,6	30,83	inf	29,25	95,79														
Hum	7,94	10,77	6,62	5,5	7,41	17,26	63,33	11,36	12,68													
Pve	4,04	5,43	2,88	3,39	4,04	5,36	13,91	4,88	4,57													
Gua	3,43	3,04	2,36	2,77	2,91	3,05	2,65	3,5	3,94	2,13	2,11											
Mao	19,26	14,61	134,7	11,38	16,12	183,9	12,77	74,01	inf	15,51	4,62	2,52										
Tap	55,96	21,77	23,52	32,95	20,88	inf	16,94	46,65	inf	10,16	4,78	4,05	428,8									
Bda	18,78	14,23	9,95	9,14	12,59	22,21	14,14	24,08	38,41	13,28	6,89	4,47	26,11	52,94								
Coa	inf	243,77	12,47	28,14	48,96	inf	99,17	inf	inf	13,48	5,24	3,92	65,75	2027	40,75							
Tef	4,36	4,11	inf	5,21	5,15	10,07	3,96	9,16	21,21	6,01	2,75	2,27	40,81	30,8	10,41	8,71						
Car	8,66	6,29	9,52	6,59	7,02	9,16	4,88	10,64	21,69	4,96	3,28	3,28	14,47	29,22	26,42	14,62	10,1					
Eir	inf	inf	6,51	18,9	134,92	260,59	inf	71,21	inf	53,33	11	11,64	30,55	26,76	21,69	inf	5,57	8,16				
Fbo	43,48	18,43	36,34	18,29	33,17	149,93	10,73	655	inf	6,62	3,26	3,26	438,9	inf	23,7	inf	26,4	19,95	16,7			
Tab	29,76	34,84	6,24	10,77	18,16	18,14	13,37	60,38	42,17	7,13	5,18	5,18	11,34	19,11	40,57	37,53	5,58	17,32	29	17,24		

Nota: Mex (Mexiana), Alm (Almeirim), San (Santarém), Ita (Itaituba), Jac (Jacareacanga), Ori (Oriximiná), Nha (Nhamundá), Pin (Parintins), Bor (Borba), Hum (Humaitá), Pve (Porto Velho), Gua (Guaporé), Mao (Manaus), Tap (Tapauá), Bda (Boca do Acre), Coa (Coari), Tef (Tefé), Car (Carauari), Eir (Eirunepé), Fbo (Fonte Boa) e Tab (Tabatinga).

A diferenciação genética (Φ_{ST}) par a par entre as localidades mostrou valores muito baixos ou negativos entre as localidades na bacia Amazônica, indicando que as amostras populacionais de tabaqui não se encontram geneticamente diferenciadas (exceto entre Porto Velho/Santarém e Porto Velho/Tefé, onde P é significativo, $P < 0.00024$, após correção de Bonferroni). Situação oposta foi verificada para Guaporé, que mostrou diferenciação significativa com 14 localidades, situadas em pontos distintos na bacia Amazônica brasileira (Tabela 11). Uma segunda análise de diferenciação genética (Φ_{ST}) par a par, foi realizada entre os rios amostrados, onde mais uma vez constatou-se que as amostras do rio Guaporé estão geneticamente diferenciadas de todos os demais rios da bacia Amazônica (Tabela 13).

Tabela 13. Valores de Φ_{ST} par a par entre os rios amostrados. Em destaque os valores significantes, após correção de Bonferroni ($P < 0.0017$).

	Amazonas	Paru	Tapajós	Madeira	Guaporé	Purus	Juruá	Solimões
Amazonas								
Paru	0.00002							
Tapajós	0.02015	0.00336						
Madeira	0.02637	0.02581	0.05804					
Guaporé	<u>0.14495</u>	<u>0.14104</u>	<u>0.15593</u>	<u>0.15996</u>				
Purus	0.01046	0.02029	0.02893	0.02862	<u>0.10216</u>			
Juruá	0.02074	0.02365	0.03650	0.03424	<u>0.09701</u>	0.00242		
Solimões	0.00437	0.01697	0.02693	0.03277	<u>0.12090</u>	0.00167	0.00498	

Na tentativa de verificar uma possível correlação entre as distâncias genéticas das localidades e suas respectivas distâncias geográficas, aplicou-se o teste de Mantel. Porém, os resultados não foram significativos ($r = 0.19057$; $P = 0.1412$), mostrando que não existe uma associação entre as duas variantes (valores de Φ_{ST} e unidade de comprimento, Km) para os locais amostrados.

Os indícios de que Guaporé pode estar diferenciada das demais amostras populacionais foi reforçada pela formação de grupos biológicos, a *posterior*, sugeridos pela análise de variância molecular espacial (SAMOVA).

Os resultados mostraram que o número de grupos testados, correspondente a $K=2$, foi o que apresentou maior valor de diferença entre grupos ($F_{CT}= 0.11440$; $P=0.046$), com suporte significativo ($P<0.05$). Estes grupos estão assim representados: **grupo 1**- todas as localidades da bacia Amazônica e **grupo 2**- Guaporé, na bacia Boliviana. Estes resultados sugerem que 11% da variabilidade genética para a amostragem de tabaqui foi encontrada entre os dois grupos. Relacionando todos os possíveis números de K testados e os valores correspondentes de F_{CT} , a SAMOVA maximizou a diferenciação entre os grupos e minimizou-a dentro dos grupos, evidenciando uma configuração com tendência linear decrescente (Figura 10). A diferenciação encontrada, entre os dois grupos possivelmente é reflexo de um baixo fluxo gênico devido um isolamento por distância, mesmo que este não tenha sido significativo.

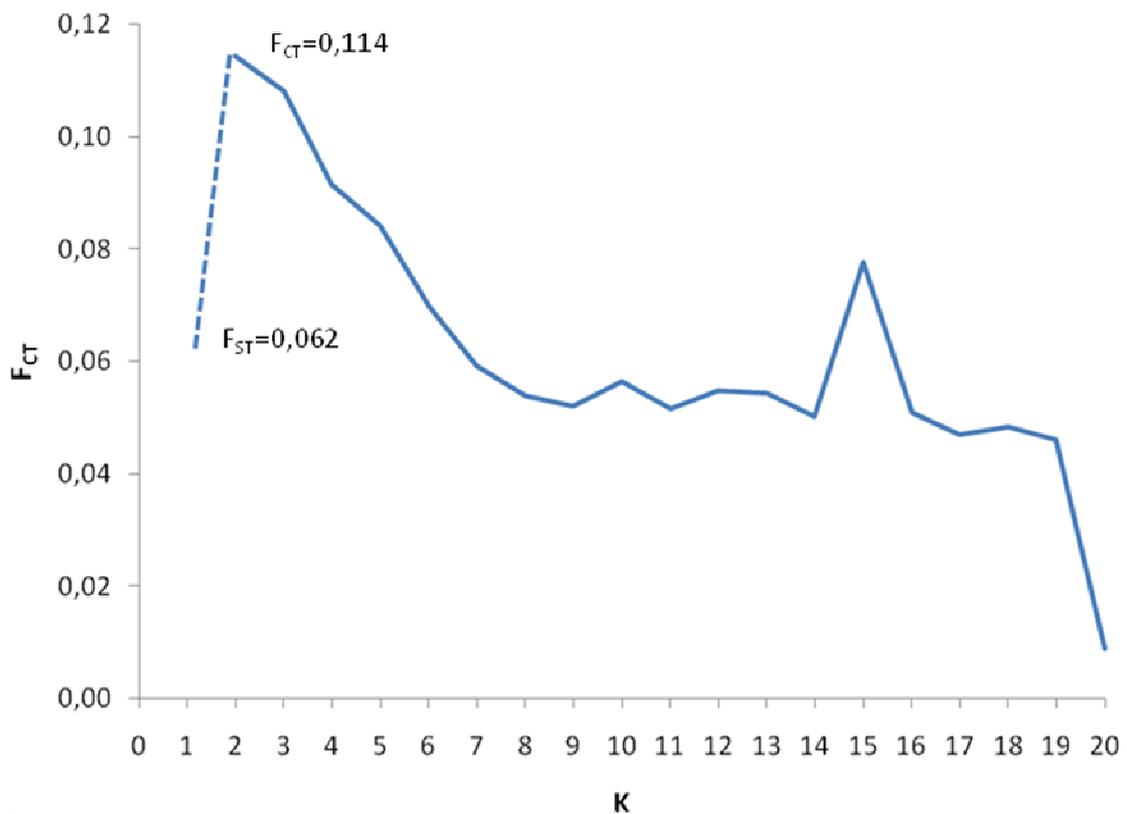


Figura 10. Resultado da SAMOVA para DNAm_t relacionando o número de *clusters* (K) testados e o valor de diferença maximizada entre grupos (F_{CT}), que foi maior para $K=2$.

Análise Bayesiana de Estrutura de População, implementada no programa BAPS 5.1 (Corander *et al.* 2007), foi realizada para agrupamento de amostras populacionais ou grupos de amostras populacionais de tabaqui. As análises agruparam os 539 indivíduos em cinco *clusters*, como a melhor probabilidade (-13608.2697/1.00) de agrupamento, a partir de uma matriz de divergência genética por máxima verossimilhança entre os *clusters* (Tabela 14). (Nesta mesma tabela, também foram mostrados valores por métodos com base em distância, através do programa MEGA).

Tabela 14. Divergência genética entre os *clusters* (sugeridos pelo programa BAPS 5.1) por método baseado na máxima verossimilhança (diagonal abaixo). Na diagonal acima consta os valores por método baseado em distância.

	<i>Cluster 1</i>	<i>Cluster 2</i>	<i>Cluster 3</i>	<i>Cluster 4</i>	<i>Cluster 5</i>
<i>Cluster 1</i>		0.009	0.018	0.015	0.015
<i>Cluster 2</i>	0.024		0.016	0.012	0.011
<i>Cluster 3</i>	0.071	0.055		0.017	0.015
<i>Cluster 4</i>	0.054	0.031	0.055		0.012
<i>Cluster 5</i>	0.042	0.020	0.032	0.024	

O *cluster 1* não inclui as amostras populacionais do extremo leste da calha principal (Santarém, Almeirim, Mexiana), o rio Tapajós (Itaituba e Jacareacanga), Tefé (no rio Solimões) e Eirunepé (no alto rio Juruá). Os *clusters 2* e *3* incluem indivíduos de todas as localidades amostradas. O *cluster 4* não inclui apenas as amostras populacionais de Guaporé, na Bolívia, e o *cluster 5* não apresenta indivíduos de Tefé e Porto Velho (Figura 11).

De modo geral, todos os *clusters* não apresentaram uma configuração de estruturação genética e sim uma homogeneidade que pode ser bem evidenciado no *cluster 2*, que incluiu o maior número de indivíduos (170) e quase todas as localidades têm nesse *cluster* sua maior representatividade. A homogeneidade genética também é claramente visualizada na figura de distribuição desses *clusters* gerada pelo programa BAPS 5.1 (Figura 12).

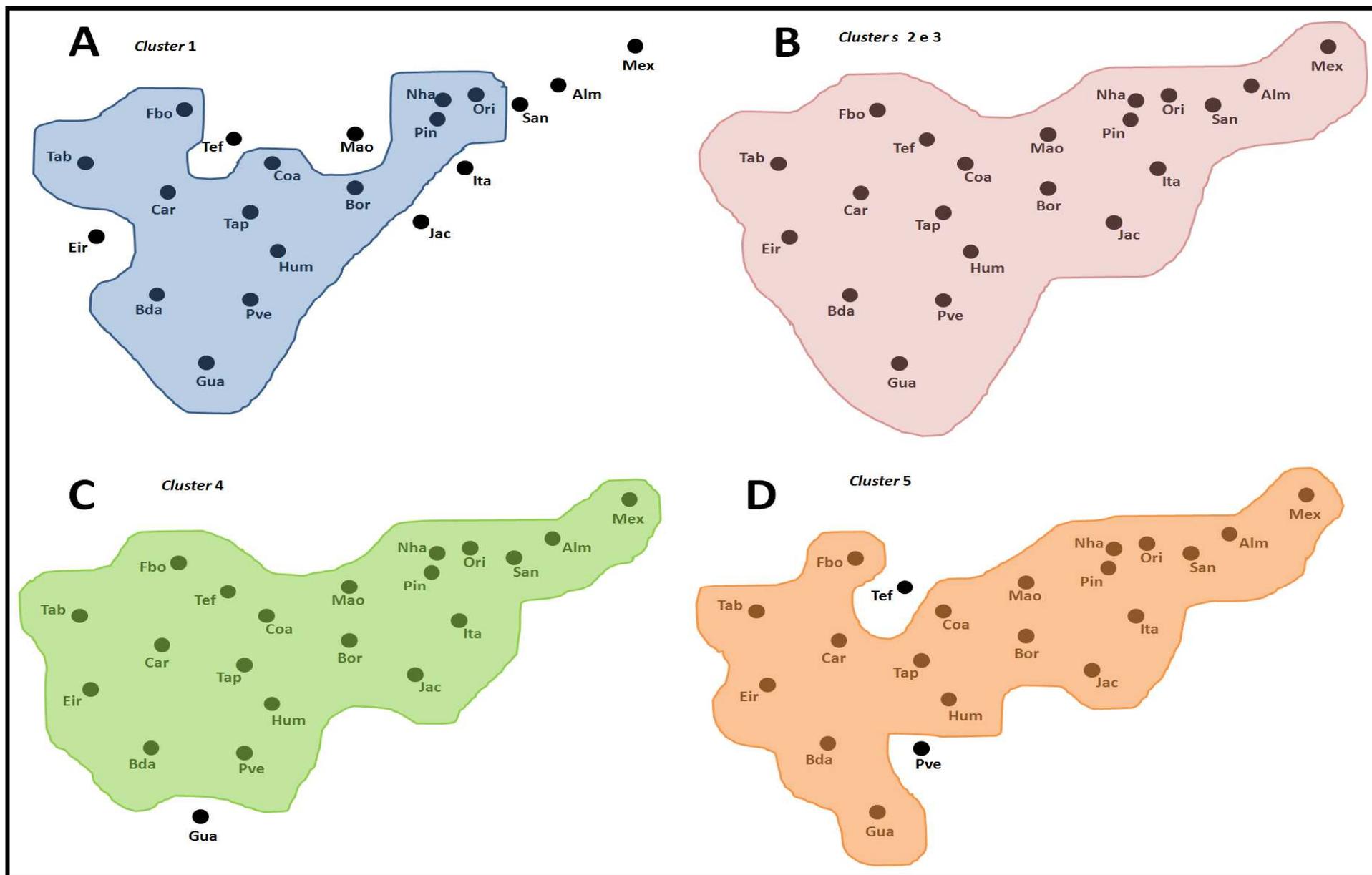


Figura 11. Agrupamentos formados pelo programa BAPS 5.1. **A-** cluster 1; **B-** clusters 2 e 3; **C-** cluster 4 e **D-** cluster 5. Os pontos foram plotados sob um mapa geográfico com amostragem desse estudo.

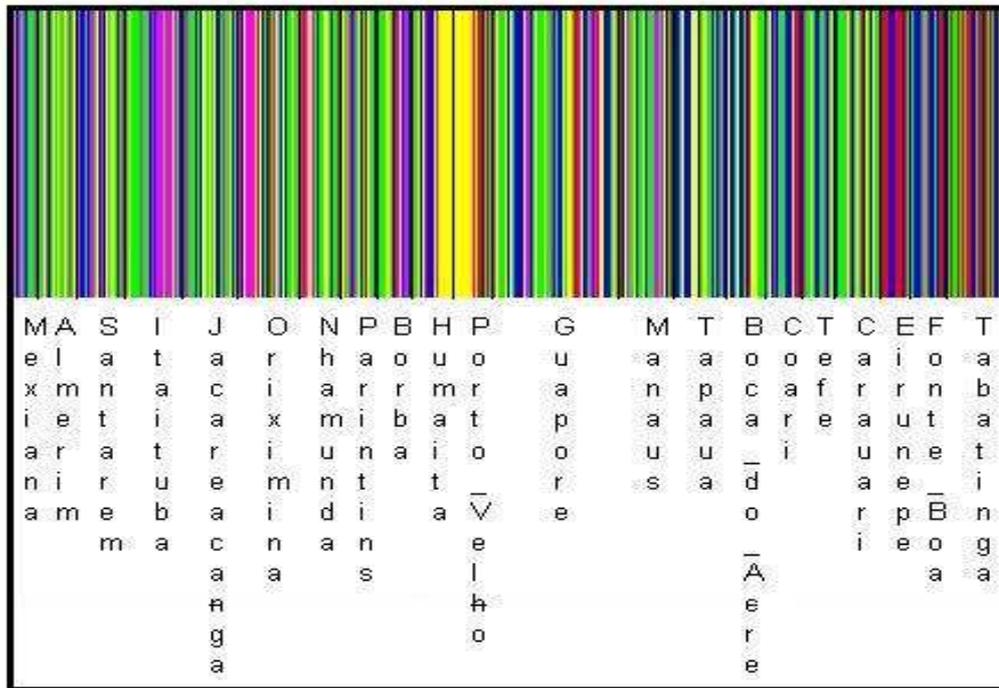


Figura 12. Ausência de estrutura populacional, evidenciada pela homogeneidade genética para os dados de DNAmT de tabaqui. As cores dispostas verticalmente, representam cada um dos cinco *clusters*. *Cluster* 1- vermelho, *cluster* 2- verde, *cluster* 3- azul, *cluster* 4- amarelo, *cluster* 5- rosa.

A árvore de distância de Evolução Mínima (*Minimum Evolution-ME*) sem raiz confirma a homogeneidade na distribuição dos haplótipos. Esta topologia mostrou que mesmo utilizando apenas os haplótipos das localidades situadas em pontos extremos da amostragem desse estudo, fica evidente uma mistura na distribuição desses haplótipos. No entanto, com relação à Guaporé esta distribuição fica restrita praticamente em três clados, sugerindo que existe um fluxo gênico restrito de Guaporé com as localidades da bacia Amazônica brasileira (Figura 13).

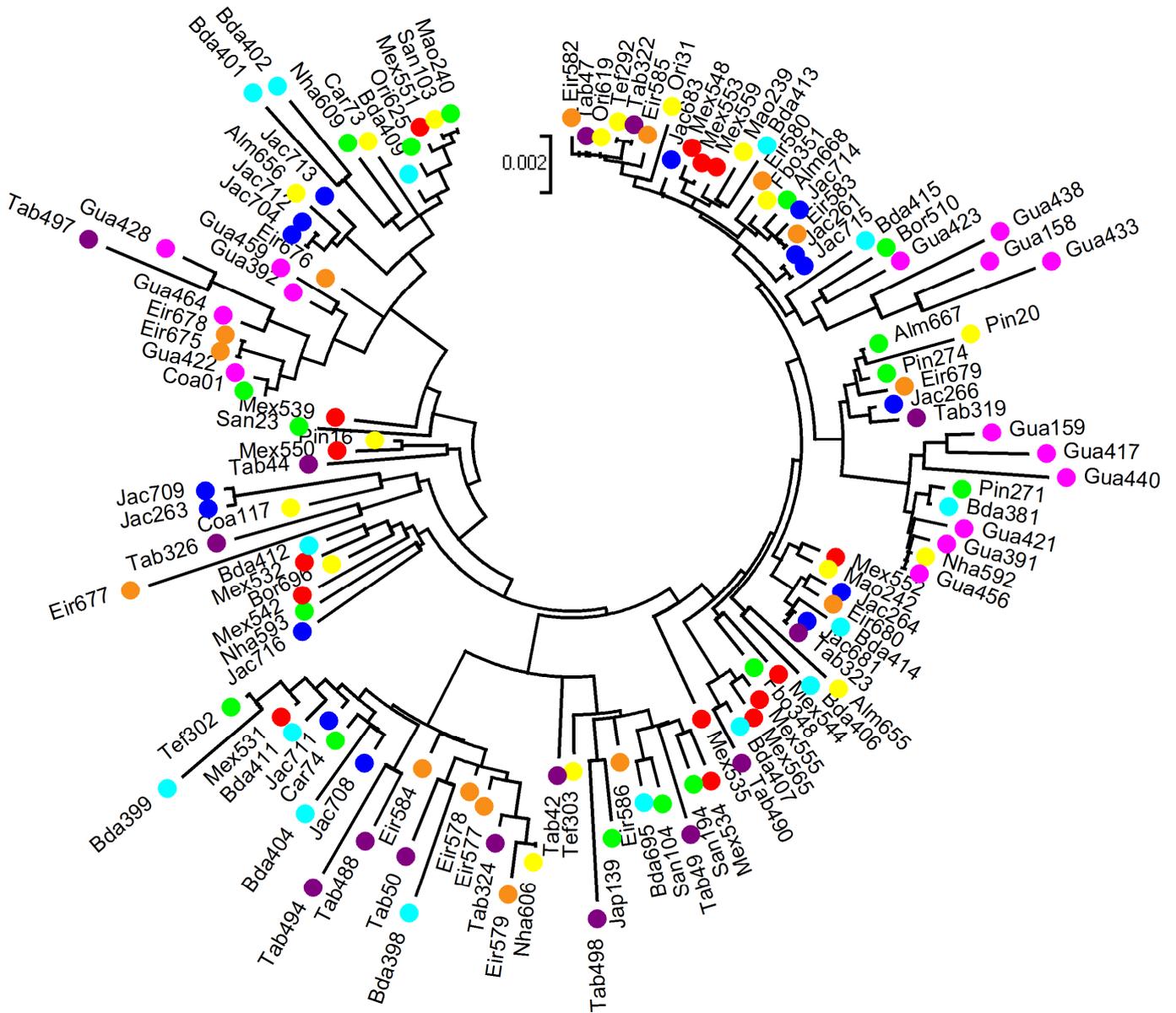


Figura 13. Árvore de distribuição dos haplótipos considerando oito grupos/localidades da amostragem. Dois grupos formados com haplótipos aleatório da calha (calha 1- verde e calha 2- amarelo), Tabatinga (Tab)-roxo, Mexiana (Mex) - vermelho, Jacareacanga (Jac)- azul escuro, Guaporé (Gua)- rosa, Boca do Acre (Bda) – azul claro e Eirunepé (Eir) - laranja.

4.5 Testes de Neutralidade e Demografia populacional

Os valores do teste D de Tajima não foram significantes ($P > 0,05$) para todas as localidades amostradas, indicando que o polimorfismo genético nesses locais está de acordo com o modelo neutro de mutação, ou seja, existe um equilíbrio genético em relação aos haplótipos de DNAm. Analisando-se separadamente as duas bacias hidrográficas, os valores do teste F_s de Fu mantêm-se negativo, mas não significativo para a maioria das localidades na bacia Amazônica ($-23,4461$, $P=0,0134$), sugerindo uma estabilidade genética, e significativo ($-24,0981$, $P=0,0002$) em Guaporé na bacia Boliviana, sugerindo expansão populacional, após correção de Bonferroni ($P < 0,0023$) (Tabela 15). Considerando todas as amostras, este teste corroborou com o D de Tajima.

Segundo Rogers e Harpending (1992), valores de r , baixos e significativos, considerando conjuntamente as localidades da bacia Amazônica ($r=0,00060$; $P=1,0000$), apenas Guaporé ($r=0,0018$; $P=0,9990$) e posteriormente a junção das duas bacias ($r=0,0046$; $P=1,0000$), apresentaram o mesmo resultado, que reforçam o cenário de expansão populacional com relação aos haplótipos de DNAm (Tabela 15). A expansão populacional inferida por este índice não suporta o resultado observado para as curvas da distribuição das diferenças par a par (*mismatch*), que mostrou um padrão de distribuição multimodal para Guaporé na bacia boliviana, indicando uma estabilidade populacional. No entanto, este mesmo padrão de distribuição não foi observado para a bacia Amazônica brasileira, onde uma distribuição unimodal se fez presente, sugerindo expansão populacional (Figura 14). Este padrão configurou-se como o modelo de expansão demográfica que não pode ser rejeitado para as amostras populacionais de tabaqui para a bacia Amazônica, uma vez que a soma dos desvios quadrado $SSD= 0,0021$ ($P=0,6430$) não foi significativo (Schneider e Excoffier, 1999).

A análise resultante do programa BEAST, considerando toda a amostragem evidenciou um forte sinal expansão populacional para o tabaqui, que se inicia lentamente há aproximadamente 1.000.000 de anos atrás. A partir de cerca de 250.000 anos, o tabaqui experimentou um crescimento

demográfico acelerado até aproximadamente 100.000 anos atrás e em seguida o tamanho da população manteve-se constante até o tempo atual. Desde o começo da fase inicial de crescimento, o tamanho populacional desta espécie parece ter aumentado em uma ordem de grandeza de aproximadamente pouco mais de 100 mil a 100 milhões de indivíduos (Figura 15).

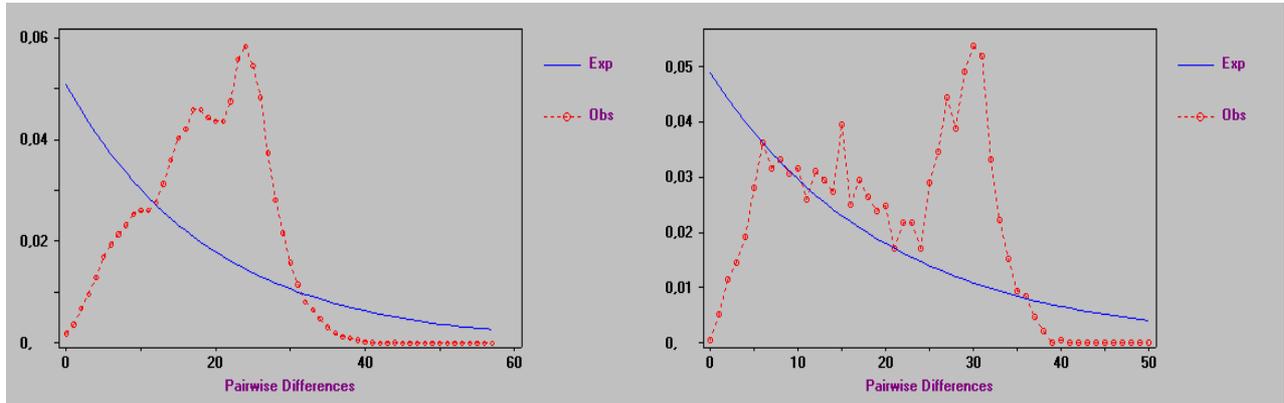


Figura 14. Padrão da distribuição das freqüências das diferenças par a par (*mismatch distribution*) observada e esperada para as amostras populacionais de tambaqui. À esquerda, bacia Amazônica (distribuição unimodal) e à direita Guaporé na bacia Boliviana (distribuição multimodal).

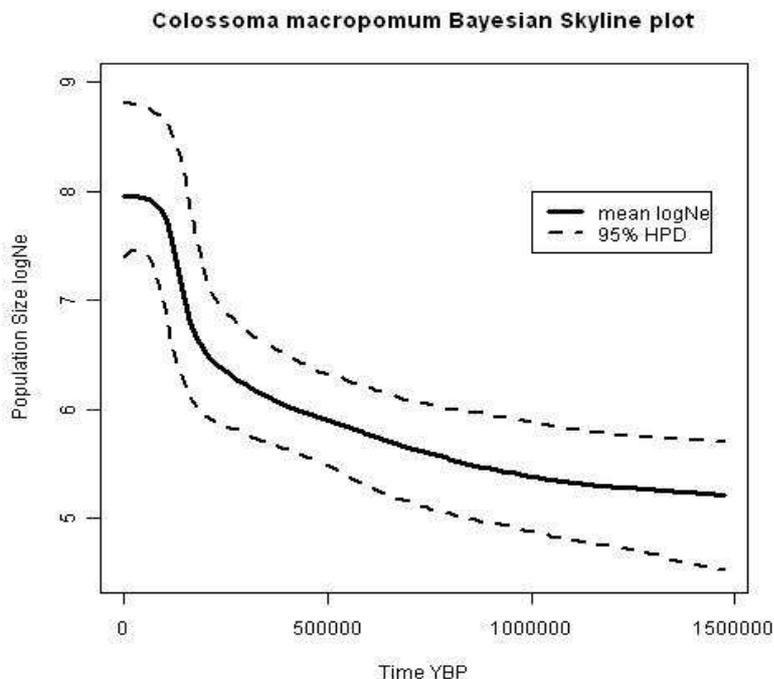


Figura 15. Resultados dos parâmetros da análise Bayesiana do programa Beast convertidos. Logaritmo de número de indivíduos ($\log N_e$): 5=100.000, 6=1.000.000, 7=10.000.000 e 8=100.000.000 de indivíduos em relação ao tempo (em anos), mostrando um forte sinal de expansão populacional.

Tabela 15. Parâmetros demográficos estimados para *Colossoma macropomum*.

Região	Localidades	N	H	Distribuição <i>Mismatch</i>			Testes de Neutralidade	
				Hri (DnaSP)	Hri (Arlequin)	SSD (Arlequin)	D de Tajima	Fs de Fu
Bacia Amazônica	Mexiana -PA	15	15	0.0921 ($P=0.0000$)	0.0183 ($P=0.6970$)	0.0099 ($P=0.6630$)	-0.3633	-5.6331
	Almeirim-PA	21	20	0.0908 ($P=0.0000$)	0.0190 ($P=0.3920$)	0.0124 ($P=0.4090$)	-0.4285	-7.4138
	Santarém-PA	26	26	0.0906 ($P=0.0000$)	0.0063 ($P=0.8370$)	0.0041 ($P=0.5670$)	0.6759	-12.6256*
	Itaituba-PA	32	24	0.0892 ($P=0.0000$)	0.0119 ($P=0.2240$)	0.0043 ($P=0.5430$)	-0.3504	-3.6772
	Jacareacanga-PA	29	19	0.0882 ($P=0.0000$)	0.0163 ($P=0.4080$)	0.0108 ($P=0.5590$)	-0.0637	-1.2647
	Oriximiná-PA	34	34	0.0896 ($P=0.0000$)	0.0021 ($P=0.9990$) •	0.0031 ($P=0.7270$)	-0.6243	-19.8803*
	Nhamundá-AM	22	21	0.0885 ($P=0.0000$)	0.0049 ($P=0.9920$) •	0.0043 ($P=0.8760$)	-0.6959	-7.4689
	Parintins-AM	20	20	0.0921 ($P=0.0000$)	0.0060 ($P=0.9780$) •	0.0070 ($P=0.6550$)	0.0280	-7.7704
	Borba-AM	19	19	0.0890 ($P=0.0000$)	0.0105 ($P=0.8350$)	0.0074 ($P=0.7770$)	-0.5002	-6.6767
	Humaitá-AM	22	20	0.0897 ($P=0.0000$)	0.0061 ($P=0.9120$)	0.0044 ($P=0.8820$)	0.1044	-5.4790
	Porto Velho-RO	21	14	0.0898 ($P=0.0000$)	0.0251 ($P=0.3850$)	0.0233 ($P=0.3610$)	-0.0231	0.3008
	Manaus-AM	30	29	0.0937 ($P=0.0000$)	0.0045 ($P=0.9690$) •	0.0071 ($P=0.5700$)	-0.0405	-12.9266*
	Tapauá-AM	28	28	0.0881 ($P=0.0000$)	0.0067 ($P=0.7370$)	0.0045 ($P=0.6940$)	-0.4853	-13.0369*
	Boca do Acre-AM	21	21	0.0850 ($P=0.0000$)	0.0060 ($P=0.9340$)	0.0075 ($P=0.4240$)	0.0123	-7.9591
	Coari-AM	20	20	0.0896 ($P=0.0000$)	0.0120 ($P=0.6820$)	0.0665 ($P=0.6180$)	-0.3213	-7.9575
	Tefé-AM	18	16	0.0952 ($P=0.0000$)	0.0298 ($P=0.2560$)	0.0177 ($P=0.2690$)	0.0482	-2.7381
	Carauari-AM	25	25	0.0902 ($P=0.0000$)	0.0063 ($P=0.8510$)	0.0034 ($P=0.8900$)	-0.2137	-10.6621*
	Eirunepé-AM	16	15	0.0921 ($P=0.0000$)	0.0232 ($P=0.6630$)	0.0150 ($P=0.6460$)	-0.3480	-3.6541
Fonte Boa-AM	20	18	0.0943 ($P=0.0000$)	0.0244 ($P=0.3590$)	0.0264 ($P=0.0420$)	0.7627	-4.2779	
Tabatinga-AM	31	30	0.0912 ($P=0.0000$)	0.0031 ($P=0.9690$) •	0.0025 ($P=0.8240$)	-0.2506	-12.8994*	
Bacia Boliviana	Guaporé	69	68	0.0898 ($P=0.0000$)	0.0018 ($P=0.9990$) •	0.0047 ($P=0.8420$)	0.9462	-24.0981*
	Todas localidades	539	444	0.0912 ($P=0.0000$)	0.0046 ($P=1.0000$) •	0.0020 ($P=0.6260$)	-1.2345	-23.3960

Nota: * Nível de significância após correção de Bonferroni ($P < 0.0023$); • Nível de significância ($P > 0.95$); N= número de indivíduos; H= número de haplótipos; Hri = índices de irregularidade de Harpending; SSD = soma dos quadrados das diferenças entre a distribuição *mismatch* observada para cada localidade e a distribuição estimada para um modelo de expansão populacional.

Microsatélites

Foram genotipados um total de 604 indivíduos procedentes de 21 localidades, para os quais se utilizaram 13 locos de microsatélites. Após a obtenção dos tamanhos dos alelos, o banco de dados foi submetido ao programa MICRO-CHECKER, sendo que as localidades foram analisadas conjuntamente para cada um dos locos, onde não foi evidenciada a ocorrência de artefatos técnicos como *stutters* e *large dropout* de alelo. No entanto, para quatro locos (Cm2G5, Cm1E3, Cm1F5 e Cm1F7) foi verificado um excesso de homozigotos, possivelmente em função da presença de alelos nulos. Estes locos, exceto o Cm1F5, mostraram que mais de 50% de seus alelos pertencem a uma mesma classe (tamanho) de alelo. Alelos nulos são os alelos de um loco que não amplificaram via PCR, em decorrência de mutações que podem ter ocorrido nas regiões flangeadoras dos *primers* ou nas unidades de repetições, resultando em mudanças do tamanho do produto amplificado. O programa utilizado sugere a presença de alelos nulos considerando o Desequilíbrio de Hardy-Weinberg, com isso pode não estar detectando o real. Por outro lado, a sensibilidade para detectar alelos nulos pelo MICRO-CHECKER pode ter suas vantagens, no sentido de que ao se assumir o uso desses locos para inferir estrutura de população por meio de outras análises, ver-se-á o máximo da estrutura. Estes locos predisõem a aumentar a estrutura observada, logo se houver uma estrutura fraca, ela estará se evidenciando como uma estrutura real, ou seja, de causas biológicas e não de amostragem não aleatória.

4.6 A Diversidade genética do tabaqui

As análises com base nos locos estudados contabilizaram um total de 257 alelos, com uma média de 21,4 alelos por loco. Considerando os locos utilizados, o menor número de alelos (oito) foi encontrado nos locos Cm2G5 e Cm1F7, e o maior número (48) no loco Cm1F5. O loco Cm1F7 apresentou a menor heterozigosidade, tanto a observada como a esperada ($H_O=0,223$ e $H_E=0,373$). No loco Cm1F4 foi encontrado a maior $H_O=0,877$ e no loco Cm1H8

a maior $H_E=0,941$ (Tabela 16). Do total de alelos encontrados, 33 foram alelos exclusivos, distribuídos em todos os locos, sendo que no loco Cm1B8 foi encontrado o maior número (seis) desses alelos. Cinco localidades não apresentaram alelos exclusivos e, entre as demais, Borba apresentou o maior número desse tipo de alelo (Tabela 17).

Tabela 16. Índices genéticos para os 12 locos de microssatélites.

Locos	Tamanho (número de repetições)	A_T	H_O	H_E
Cm2B1	7 - 18	12	0,793	0,769
Cm1G7	6 - 28	20	0,836	0,842
Cm1H8	6 - 43	36	0,869	0,941
Cm2G5	7 - 16	8	0,385	0,443
Cm1D1	8 - 24	17	0,875	0,898
Cm1C6	8 - 30	20	0,842	0,880
Cm1A8	7 - 31	14	0,564	0,540
Cm1F7	13 - 34	8	0,223	0,373
Cm1A11	10 - 38	27	0,860	0,912
Cm1F4	7 - 28	21	0,877	0,902
Cm1F5	16 - 71	48	0,759	0,905
Cm1B8	8 - 39	26	0,864	0,919

Nota: A_T = número total de alelos, H_O =heterozigidade observada, H_E =heterozigidade esperada.

Análises considerando o conjunto de locos para cada uma das localidades mostraram que Porto Velho e Manaus apresentaram o menor (103) e maior (152) número total de alelos (A_T), com uma riqueza alélica (A_R) de 8,58 e 12,66 alelos por loco, respectivamente. A diversidade genética média variou de $0,714 \pm 0,369$ em Guaporé (bacia Boliviana) para $0,797 \pm 0,414$ em Eirunepé (rio Juruá). Por conseguinte estas duas localidades também apresentaram a menor e maior média de diferenças par a par, $8,5691 \pm 4,0042$ (Guaporé) e $9,5653 \pm 4,4798$ (Eirunepé). O coeficiente de endogamia intra populacional (F_{IS}), mostrou uma diferenciação genética moderada apenas para Coari (0,104) e Santarém (0,118), devido ao sistema de reprodução, ou seja, cruzamento entre parentes. Isso se causas biológicas estiverem atuando, pois efeitos de amostragem para estas duas localidades, não podem ser descartados (Tabela 18).

A heterozigosidade observada (H_O) variou de 0,674 em Porto Velho a 0,779 em Mexiana, enquanto que a heterozigosidade esperada (H_E) variou de 0,714 em Guaporé e 0,797 em Eirunepé. A diversidade gênica é equivalente a heterozigosidade esperada, sendo definida como a probabilidade de que dois alelos amostrados aleatoriamente em uma amostragem não seja idêntico por descendência (Nei, 1987). Estes resultados mostram uma homogeneidade nos níveis de variabilidade para todas as amostras populacionais estudadas. A heterozigosidade média sobre todos os locos e todas as localidades foi de $0,777 \pm 0,395$, podendo esta medida ser usada para caracterizar a diversidade genética da espécie em estudo (Tabela 18).

Considerando separadamente cada loco para cada localidade, verificou-se que o menor número de alelos ($A=2$) foi encontrado no loco Cm2G5 nas amostras populacionais de Jacareacanga, Oriximiná, Parintins, Humaitá e Tabatinga, enquanto que o maior número de alelos ($A=24$) encontra-se no loco Cm1H8 em Tapauá. A heterozigosidade observada variou de $H_O=0,09091$ para o loco Cm1F7 em Nhamundá a $H_O=1,0000$ para os locos Cm1A11, Cm1G7 e Cm1D1 em Jacareacanga, Nhamundá e Humaitá. A variação da heterozigosidade esperada foi de $H_E=0,14487$ (loco Cm1F7) a $H_E=0,96327$ (loco Cm1H8) em Tefé e Carauari, respectivamente (Tabela 19).

Tabela 17. Alelos exclusivos representados pelo número de repetições e entre parênteses suas respectivas frequências.

Local/Locos	Cm2B1	Cm1G7	Cm1H8	Cm2G5	Cm1D1	Cm1C6	Cm1A8	Cm1E3	Cm1A11	Cm1F4	Cm1F5	Cm1B8	Total
Mexiana													0
Almeirim													0
Santarém													0
Itaituba			43(0,0156)									26(0,0156)	2
Jacareacanga												35(0,0166)	1
Oriximiná			39(0,0156)					10(0,0156)				37(0,0227)	3
Nhamundá						29(0,0227)						31(0,0227)	2
Parintins						10(0,0142)						28(0,0142)	2
Borba		19(0,0217)	14(0,0217)				17(0,0217)				71(0,0217)		4
Humaitá													0
Porto Velho	7(0,0238)												1
Manaus						25(0,0142)				7(0,0142)		8 (0,0142)	3
Tapauá			41(0,0250)								17(0,0178)		2
Boca do Acre	8(0,0238)	27(0,0238)		10(0,0238)									3
Coari		10(0,0172)											2
Tefé													1
Eirunepé						30(0,0250)							1
Carauari							20(0,0200)	34(0,0200)	38(0,0200)				3
Fonte Boa										29(0,0161)		51(0,0161)	2
Tabatinga						23(0,0135)							1
Guaporé													0
Total	2	3	4	1	1	4	2	2	4	1	3	6	33

Tabela 18. Parâmetros genéticos para cada localidade amostrada, utilizando 12 locos de microssatélites.

Região	Localidades	N	A _T	A _R	Média da Diversidade Gênica	Média das diferenças par a par	Média de H _O - H _E	F _{IS}
Bacia Amazônica	Mexiana -PA	31	139	11,58	0,791 ± 0,407	9,4933 ± 4,4149	0,779 - 0,791	0,015
	Almeirim-PA	36	150	12,50	0,781 ± 0,402	9,3822 ± 4,3585	0,754 - 0,781	0,035
	Santarém-PA	36	143	11,91	0,771 ± 0,397	9,2539 ± 4,3029	0,680 - 0,771	0,118
	Itaituba-PA	32	138	11,50	0,762 ± 0,393	9,1488 ± 4,2637	0,734 - 0,762	0,037
	Jacareacanga-PA	30	134	11,16	0,757 ± 0,391	9,0853 ± 4,2399	0,730 - 0,757	0,036
	Oriximiná-PA	32	139	11,58	0,773 ± 0,399	9,2832 ± 4,3220	0,715 - 0,773	0,075
	Nhamundá-AM	22	127	10,58	0,766 ± 0,398	9,1955 ± 4,3099	0,727 - 0,766	0,050
	Parintins-AM	35	148	12,33	0,768 ± 0,396	9,2227 ± 4,2909	0,719 - 0,768	0,064
	Borba-AM	23	131	10,91	0,776 ± 0,403	9,3120 ± 4,3570	0,775 - 0,776	0,001
	Humaitá-AM	22	110	9,16	0,780 ± 0,405	9,3636 ± 4,3822	0,746 - 0,780	0,044
	Porto Velho-RO	21	103	8,58	0,737 ± 0,385	8,8548 ± 4,1652	0,674 - 0,737	0,085
	Manaus-AM	35	152	12,66	0,785 ± 0,404	9,4252 ± 4,3785	0,738 - 0,785	0,060
	Tapauá-AM	28	144	12,00	0,766 ± 0,396	9,1980 ± 4,2932	0,755 - 0,766	0,014
	Boca do Acre-AM	21	130	10,83	0,771 ± 0,401	9,2520 ± 4,3385	0,742 - 0,771	0,048
	Coari-AM	29	141	11,75	0,762 ± 0,394	9,1518 ± 4,2709	0,683 - 0,762	0,104
	Tefé-AM	20	117	9,75	0,751 ± 0,392	9,0205 ± 4,2419	0,733 - 0,751	0,024
	Carauari-AM	25	141	11,66	0,790 ± 0,409	9,4897 ± 4,4278	0,760 - 0,790	0,038
	Eirunepé-AM	20	113	9,41	0,797 ± 0,414	9,5653 ± 4,4798	0,754 - 0,797	0,054
	Fonte Boa-AM	31	142	11,83	0,773 ± 0,399	9,2771 ± 4,3211	0,736 - 0,773	0,048
Tabatinga-AM	37	146	12,16	0,779 ± 0,401	9,3583 ± 4,3468	0,734 - 0,779	0,058	
Bacia Boliviana	Guaporé	38	123	10,25	0,714 ± 0,369	8,5691 ± 4,0042	0,677 - 0,714	0,051
	Total	604	257	21,41	0,777 ± 0,395	9,3290 ± 4,2887	0,729 - 0,777	

Nota: N=tamanho amostral, A_T=número total de alelos, A_R=riqueza alélica, H_O=heterozigidade observada, H_E=heterozigidade esperada, F_{IS}=coeficiente de endogamia intrapopulacional.

Nas primeiras análises para o teste de equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW), verificou-se desvio para este equilíbrio em alguns locos para várias localidades. Um loco em especial, o Cm1E3, mostrou-se em desequilíbrio para 17 das 21 localidades amostradas, por esse motivo (e por influenciar significativamente nas análises de estrutura populacional) foi retirado das análises populacionais. Novamente, análises para o teste de equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) foram realizadas, mostrando que três locos estão em desequilíbrio (Cm1F7, Cm1F5 e Cm1H8) para sete, seis e cinco localidades, respectivamente. Outros locos, como C1A11 (em Santarém), Cm2G5 (em Itaituba), Cm1F4 (em Humaitá e Guaporé) e Cm1B8 (em Eirunepé), também apresentaram desvios do EHW, após correção de Bonferroni ($P < 0,0041$). Excesso de homozigotos nos locos Cm2G5, Cm1F5 e Cm1F7 e de heterozigotos nos locos Cm1H8, C1A11, Cm1F4 e Cm1B8, nas suas referidas localidades, podem justificar estes resultados.

Os locos em homozigose foram os mesmos para os quais foi sugerido ocorrência de alelos nulos. Os locos Cm1F7 e Cm2G5, além de apresentarem a menor riqueza alélica, são microssatélites imperfeitos, sendo que o Cm1F7 é composto e o Cm2G5 é interrompido, e esta complexidade pode favorecer mutações em suas unidades, ocasionando alelos nulos. O outro loco Cm1F5, também com excesso de homozigotos, embora seja um microssatélite perfeito, ocorre em uma faixa de tamanho extensa, onde os alelos estão separados por até 44 repetições. Este perfil está bastante relacionado com *Large Allele Dropout*, quando ocorre a amplificação preferencial do menor alelo quando a diferença entre os alelos for grande ou *Short Allele Dominance*, onde por competição, durante a PCR, o alelo maior não amplifica, e em ambos os casos resultam em excesso de homozigotos para os alelos de tamanho menor. No entanto estes desvios no EHW podem estar relacionados a acasalamentos não aleatórios ou mesmo captura de indivíduos de mesmo cardume. É difícil conjecturar exatamente a causa da deficiência de heterozigotos nestes locos, provavelmente um ou mesmo vários fatores podem estar contribuindo para o que foi observado, pois na natureza não é simples saber o real comportamento das populações, já que na Amazônia habitam uma diversidade de ambientes.

Os outros locos com desvio do EHW, em virtude do excesso de heterozigotos, indicam uma possível seleção em favor dos mesmos, ou que forças evolutivas como migração e fluxo gênico possam estar atuando. Também não se podem descartar efeitos de amostragem, principalmente se muitos indivíduos que são heterozigotos apresentarem repetidamente o mesmo tamanho de alelos, passíveis por tanto, de mesmo cardume.

Os desvios das frequências genotípicas daquelas esperadas no equilíbrio de Hardy-Weinberg são altamente informativos, no que diz respeito para detectar a ocorrência de endogamia, estrutura de populações, migração e seleção. No entanto, de acordo com Frankham *et al.* (2008), para determinar o potencial evolutivo de uma espécie, é improvável que a informação sobre um ou dois locos (dependendo do número de locos em estudo) de uma espécie represente precisamente a diversidade genética para todos os locos. Como estes desvios do EHW em sete dos 13 locos analisados foram relativamente distribuídos entre as 21 localidades sem um padrão definido, possivelmente o desequilíbrio observado está muito mais propenso aos efeitos de amostragem (seja na captura dos indivíduos ou “falha na amplificação”) do que algo de cunho biológico.

Tabela 19. Índices de diversidade genética resultantes de 13 locos de microssatélites para todas as localidades amostradas. N=número de indivíduos, N_A =número de alelos, H_O =heterozigiosidade observada, H_E =heterozigiosidade esperada, P=significância para o Equilíbrio de Hardy-Weinberg, * Nível de significância após correção de Bonferroni ($P < 0.0041$)

		Cm2B1	Cm1G7	Cm1H8	Cm2G5	Cm1D1	Cm1C6	Cm1A8	Cm1E3	Cm1F7	Cm1A11	Cm1F4	Cm1F5	Cm1B8
Mexiana	N	31	31	31	31	31	31	31	31	31	31	31	31	31
	NA	6	11	21	4	14	11	5	7	7	13	14	18	15
	HO	0.83871	0.83871	0.96774	0.48387	0.90323	0.93548	0.45161	0.25806	0.41935	0.90323	0.93548	0.80645	0.87097
	HE	0.80434	0.82443	0.93443	0.49656	0.90270	0.88630	0.40296	0.60338	0.62665	0.89265	0.91433	0.88683	0.92121
	P	0.70654	0.77693	0.36012	0.53951	0.34530	0.62561	0.51079	0.00000*	0.00034*	0.72823	0.15696	0.06030	0.18075
Almeirim	N	36	36	36	36	36	36	36	36	36	36	36	36	36
	NA	5	11	23	3	15	15	6	7	6	18	15	18	15
	HO	0.80556	0.83333	0.97222	0.44444	0.86111	0.88889	0.55556	0.22222	0.27778	0.88889	0.86111	0.77778	0.88889
	HE	0.79930	0.85055	0.94444	0.44953	0.89358	0.86346	0.49491	0.58294	0.42410	0.91354	0.91197	0.91393	0.92293
	P	0.48088	0.97108	0.85035	0.48365	0.79264	0.53701	0.60103	0.00000*	0.01864	0.88185	0.39909	0.06662	0.03917
Santarém	N	36	36	36	36	36	36	36	36	36	36	36	36	36
	NA	6	12	23	4	13	13	7	7	5	14	13	20	13
	HO	0.77778	0.83333	0.77778	0.36111	0.86111	0.80556	0.38889	0.27778	0.25000	0.75000	0.94444	0.58333	0.83333
	HE	0.79734	0.85642	0.94484	0.40767	0.90689	0.90102	0.44405	0.58764	0.38615	0.91080	0.89202	0.88811	0.91862
	P	0.63415	0.34435	0.01305	0.65332	0.10378	0.00949	0.40373	0.00000*	0.01369	0.00027*	0.98745	0.00000*	0.13287
Itaituba	N	32	32	32	32	32	32	32	32	32	32	32	32	32
	NA	6	9	20	4	12	14	6	7	4	15	11	20	17
	HO	0.81250	0.93750	0.96875	0.25000	0.75000	0.84375	0.65625	0.43750	0.18750	0.87500	0.90625	0.75000	0.87500
	HE	0.70288	0.84077	0.93700	0.54315	0.83036	0.86260	0.56448	0.69990	0.28125	0.89980	0.89038	0.87153	0.92460
	P	0.41263	0.79295	0.62233	0.00015*	0.51536	0.12325	0.91227	0.00117*	0.05406	0.19843	0.19257	0.08096	0.02813
Jacareacanga	N	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30
	NA	6	7	21	2	14	13	6	7	4	18	11	15	17
	HO	0.80000	0.93333	0.90000	0.40000	0.80000	0.76667	0.36667	0.40000	0.23333	1.00000	0.93333	0.76667	0.86667
	HE	0.75593	0.81299	0.95141	0.47232	0.83955	0.90056	0.51638	0.77458	0.27401	0.91695	0.88305	0.83842	0.92373
	P	0.36180	0.27276	0.69234	0.44874	0.29181	0.06973	0.16324	0.00017*	0.27912	0.97075	0.85652	0.25618	0.46660

continuação

		Cm2B1	Cm1G7	Cm1H8	Cm2G5	Cm1D1	Cm1C6	Cm1A8	Cm1E3	Cm1F7	Cm1A11	Cm1F4	Cm1F5	Cm1B8
Oriximiná	N	32	32	32	32	32	32	32	32	32	32	32	32	32
	NA	5	10	23	2	13	13	6	6	5	18	12	18	14
	HO	0.71875	0.71875	0.78125	0.56250	0.81250	0.93750	0.62500	0.28125	0.15625	0.84375	0.87500	0.71875	0.81250
	HE	0.75248	0.78770	0.94296	0.47619	0.90526	0.88095	0.52431	0.54514	0.40327	0.92609	0.89137	0.88690	0.90575
	P	0.54949	0.35197	0.00000*	0.44973	0.53242	0.96720	0.48547	0.00021*	0.00000*	0.35519	0.25570	0.02161	0.32848
Nhamundá	N	22	22	22	22	22	22	22	22	22	22	22	22	22
	NA	5	10	19	3	12	14	5	8	5	11	14	13	16
	HO	0.90909	0.86364	1.00000	0.31818	1.00000	0.81818	0.36364	0.22727	0.09091	0.77273	0.95455	0.72727	0.90909
	HE	0.72939	0.84249	0.94292	0.46934	0.90698	0.92812	0.42389	0.49894	0.32875	0.89746	0.91226	0.89429	0.91966
	P	0.63207	0.59252	0.94735	0.15532	0.89208	0.29699	0.45518	0.00206*	0.00020*	0.02995	0.93811	0.04040	0.83638
Parintins	N	35	35	35	35	35	35	35	35	35	35	35	35	35
	NA	9	10	23	2	14	12	9	7	4	16	12	21	16
	HO	0.82857	0.77143	0.80000	0.45714	0.85714	0.77143	0.62857	0.31429	0.17143	0.80000	0.82857	0.80000	0.91429
	HE	0.84306	0.80911	0.94244	0.47371	0.89896	0.85673	0.51511	0.49648	0.26211	0.90559	0.87660	0.90766	0.93168
	P	0.23099	0.16451	0.06190	100.000	0.24801	0.04180	0.42919	0.00013*	0.02870	0.07424	0.10390	0.03942	0.10865
Borba	N	23	23	23	23	23	23	23	23	23	23	23	23	23
	NA	6	10	20	3	14	10	7	7	5	10	12	22	12
	HO	0.78261	0.95652	0.91304	0.30435	0.95652	0.95652	0.73913	0.39130	0.34783	0.86957	0.78261	0.86957	0.82609
	HE	0.75459	0.82415	0.92174	0.42609	0.90918	0.87923	0.62802	0.60193	0.38357	0.83768	0.90048	0.95169	0.89565
	P	0.38556	0.33521	0.83679	0.35180	0.11077	0.43615	0.48042	0.01270	0.33655	0.66043	0.17557	0.00000*	0.03280
Humaitá	N	22	22	22	22	22	22	22	22	22	22	22	22	22
	NA	7	8	16	2	12	8	5	6	3	10	12	16	11
	HO	0.72727	1.00000	0.77273	0.40909	1.00000	0.72727	0.77273	0.27273	0.18182	0.90909	0.68182	0.86364	0.90909
	HE	0.74841	0.83298	0.89535	0.42600	0.88055	0.81290	0.69450	0.61839	0.54017	0.89641	0.85095	0.91543	0.86998
	P	0.30767	0.31627	0.00650	1.00000	0.08600	0.03652	0.27145	0.00012*	0.00021*	0.01074	0.00257*	0.00004*	0.00441

continuação

		Cm2B1	Cm1G7	Cm1H8	Cm2G5	Cm1D1	Cm1C6	Cm1A8	Cm1E3	Cm1F7	Cm1A11	Cm1F4	Cm1F5	Cm1B8
Porto Velho	N	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21
	NA	7	12	14	3	9	9	4	6	3	11	10	10	11
	HO	0.66667	0.85714	0.85714	0.28571	0.95238	0.85714	0.57143	0.23810	0.09524	0.76190	0.66667	0.66667	0.85714
	HE	0.66086	0.86876	0.92451	0.43089	0.85830	0.85366	0.56330	0.83624	0.25668	0.85134	0.87108	0.81765	0.89779
	P	0.24042	0.14563	0.00299*	0.22524	0.53515	0.22144	0.92765	0.00000*	0.00940	0.01689	0.15690	0.03428	0.31101
	Manaus	N	35	35	35	35	35	35	35	35	35	35	35	35
NA		5	12	23	3	15	15	6	7	5	17	14	22	15
HO		0.74286	0.82857	0.82857	0.37143	0.88571	0.82857	0.57143	0.25714	0.31429	0.91429	0.94286	0.71429	0.91429
HE		0.77019	0.87412	0.95031	0.38551	0.89275	0.87826	0.56812	0.58095	0.46501	0.91636	0.90021	0.92422	0.90021
P		0.83863	0.25648	0.02631	0.79267	0.22438	0.24195	0.07831	0.00000*	0.00374	0.13692	0.97274	0.00068*	0.82077
Tapauá		N	28	28	28	28	28	28	28	28	28	28	28	28
	NA	6	11	24	4	14	12	5	7	5	16	11	20	16
	HO	0.89286	0.85714	0.96429	0.39286	0.89286	0.89286	0.46429	0.25000	0.28571	0.85714	0.89286	0.82143	0.85714
	HE	0.77532	0.82143	0.94935	0.36558	0.88052	0.87922	0.52208	0.66753	0.32013	0.93831	0.90584	0.91169	0.92857
	P	0.54231	0.00514	0.36882	0.59584	0.11058	0.41443	0.42244	0.00000*	0.46334	0.14245	0.14404	0.11140	0.13099
	Boca do Acre	N	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21
NA		6	10	18	4	11	11	6	6	4	15	15	16	14
HO		0.85714	0.85714	0.90476	0.28571	0.71429	0.85714	0.76190	0.23810	0.19048	0.95238	0.85714	0.80952	0.85714
HE		0.79791	0.85598	0.94425	0.33101	0.88618	0.86411	0.62253	0.59698	0.26481	0.94077	0.90708	0.90012	0.93728
P		0.69766	0.75245	0.43832	0.55843	0.04746	0.18315	0.35297	0.00010*	0.09226	0.78212	0.00721	0.04968	0.30380
Coari		N	29	29	29	29	29	29	29	29	29	29	29	29
	NA	8	10	19	4	13	13	6	7	4	16	12	20	16
	HO	0.75862	0.75862	0.68966	0.34483	0.96552	0.86207	0.44828	0.31034	0.10345	0.86207	0.89655	0.62069	0.89655
	HE	0.78584	0.82214	0.93224	0.40351	0.88929	0.89413	0.52511	0.53358	0.28131	0.91349	0.88869	0.88687	0.92922
	P	0.37352	0.32665	0.00484	0.19682	0.54028	0.66646	0.26176	0.01206	0.00034*	0.21772	0.23082	0.00000*	0.70643

continuação

		Cm2B1	Cm1G7	Cm1H8	Cm2G5	Cm1D1	Cm1C6	Cm1A8	Cm1E3	Cm1F7	Cm1A11	Cm1F4	Cm1F5	Cm1B8
Tefé	N	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20
	NA	5	10	15	3	8	12	4	6	3	14	12	17	14
	HO	0.80000	0.70000	0.85000	0.45000	0.95000	0.80000	0.60000	0.35000	0.15000	0.95000	0.90000	0.75000	0.90000
	HE	0.76538	0.84872	0.93333	0.36795	0.85385	0.89744	0.56795	0.67692	0.14487	0.91795	0.89872	0.90256	0.92179
	P	0.39436	0.31869	0.11100	0.63453	0.97316	0.06542	0.81427	0.00268*	1.00000	0.56750	0.99575	0.03460	0.23873
Carauari	N	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25
	NA	5	9	23	3	14	12	7	7	5	16	15	17	14
	HO	0.76000	0.72000	0.96000	0.44000	0.88000	0.84000	0.72000	0.40000	0.32000	0.84000	0.92000	0.92000	0.80000
	HE	0.74449	0.82694	0.96327	0.51347	0.93143	0.87265	0.60163	0.70449	0.35265	0.92490	0.90776	0.92163	0.92898
	P	0.45000	0.10527	0.51133	0.80703	0.10210	0.27364	0.58891	0.00060*	0.52349	0.52734	0.83446	0.79243	0.05155
Eirunepé	N	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20
	NA	5	10	18	3	8	10	6	7	4	11	12	15	11
	HO	0.75000	0.85000	0.90000	0.50000	0.85000	0.85000	0.65000	0.55000	0.30000	0.85000	0.95000	0.85000	0.75000
	HE	0.77692	0.84744	0.93333	0.53718	0.87179	0.87308	0.59487	0.69487	0.55000	0.85897	0.89487	0.93205	0.89487
	P	0.39012	0.05662	0.00025*	1.00000	0.00475	0.28430	0.76006	0.43987	0.00551	0.02199	0.08259	0.00355	0.00220*
Fonte Boa	N	31	31	31	31	31	31	31	31	31	31	31	31	31
	NA	5	11	21	3	13	11	7	6	5	19	14	19	14
	HO	0.77419	0.80645	0.96774	0.25806	0.83871	0.93548	0.48387	0.29032	0.22581	0.93548	0.93548	0.77419	0.90323
	HE	0.74141	0.81438	0.94712	0.36224	0.89318	0.89847	0.50767	0.32099	0.45796	0.92173	0.89847	0.92015	0.91433
	P	0.81380	0.72096	0.93885	0.19880	0.47198	0.93775	0.89825	0.45013	0.00153*	0.46842	0.48140	0.02161	0.91628
Tabatinga	N	37	37	37	37	37	37	37	37	37	37	37	37	37
	NA	5	11	20	2	13	14	6	7	6	16	14	23	16
	HO	0.89189	0.83784	0.89189	0.37838	0.89189	0.75676	0.62162	0.29730	0.18919	0.86486	0.91892	0.67568	0.89189
	HE	0.77638	0.83932	0.94261	0.44428	0.89374	0.87893	0.55572	0.50352	0.39541	0.92373	0.89708	0.87893	0.93225
	P	0.07236	0.35128	0.00118*	0.45682	0.56835	0.02652	0.79571	0.00082*	0.00003*	0.16745	0.74689	0.00158*	0.44330
Guaporé	N	38	38	38	38	38	38	38	38	38	38	38	38	38
	NA	5	10	18	4	11	11	6	8	4	13	12	17	12
	HO	0.73684	0.84211	0.68421	0.36842	0.86842	0.78947	0.57895	0.26316	0.15789	0.73684	0.76316	0.81579	0.78947
	HE	0.67684	0.84842	0.83263	0.38281	0.87193	0.78000	0.51263	0.61368	0.24281	0.83789	0.88807	0.85439	0.84070
	P	0.39722	0.09103	0.00138*	0.04532	0.54984	0.42188	0.39173	0.00000*	0.01018	0.00996	0.00063*	0.81015	0.40564

4.7 A distribuição da diversidade genética em tambaqui

Para estimar a variação genética dentro e entre as 21 localidades, realizou-se a análise de variância molecular AMOVA, para a qual foram utilizados 12 locos, pois o loco Cm1E3 (retirado da análise) mostrou-se em Desequilíbrio de Hardy-Weinberg para quase todas as localidades devido ao excesso de homozigotos. Uma primeira análise de AMOVA envolvendo todas as localidades evidenciou ausência de estrutura genética significativa ($F_{ST}=0,0103$ e $P=0,05802$). O índice de medida de diferenciação genética entre populações, F_{ST} , é calculado pelo modelo de alelos infinitos e assume que qualquer alelo tem a mesma relação evolutiva com qualquer um dos demais alelos. Assim, os resultados apresentados mostraram que 1,04% da variância encontram-se entre as localidades e mais que 93% entre todos os indivíduos. Isso reflete uma alta variabilidade genética nas amostras populacionais estudadas. A exemplo do que foi realizado com dados de DNAmT, AMOVA foi executada retirando-se Guaporé, ficando um cenário de bacia Amazônica brasileira. Como se esperava, não foi evidenciado estruturação genética entre as localidades amostradas. Além disso, verificou-se que a medida de F_{ST} ($F_{ST}=0,00758$ $P=0,0668$) resultou em valores mais baixos e uma maior variação genética (94,04%) foi constatada entre todos indivíduos dentro das localidades (Tabela 20).

Tabela 20. Análise da Variância molecular AMOVA para tambaqui com microsatélite.

Análise	Fontes de variação	Componentes da variância	Porcentagem de Variação
Todas localidades	Entre populações	0,04831 Va	1,04
	Entre os indivíduos/dentro das populações	0,24214 Vb	5,19
	Dentro das populações	0,37666 Vc	93,78
	$F_{ST}=0,01035$ ($P=0,05802$)		
Bacia Amazônica (sem Guaporé)	Entre populações	0,03525 Va	0,75
	Entre os indivíduos/dentro das populações	0,24362 Vb	5,21
	Dentro das populações	4,39753 Vc	94,04
	$F_{ST}=0,00758$ ($P=0,99644$)		

Tabela 21. Valores de F_{ST} par a par entre as localidades amostradas com dados microssatélites. Em destaque os valores significantes, após correção de Bonfferoni ($P < 0.00024$).

	Mex	Alm	San	Ita	Jac	Ori	Nha	Pin	Bor	Hum	Pve	Gua	Mao	Tap	Bda	Coa	Tef	Car	Eir	Fbo	Tab	
Mex	0.0000																					
Alm	0.0027	0.0000																				
San	0.0017	-0.0015	0.0000																			
Ita	<u>0.0155</u>	0.0074	<u>0.0143</u>	0.0000																		
Jac	0.0123	0.0033	0.0084	-0.0029	0.0000																	
Ori	0.0029	0.0005	0.0033	0.0056	0.0004	0.0000																
Nha	0.0004	0.0046	0.0013	0.0088	0.0063	0.0008	0.0000															
Pin	0.0058	0.0005	0.0021	0.0111	0.0083	-0.0016	0.0049	0.0000														
Bor	0.0114	0.0081	0.0058	<u>0.0217</u>	<u>0.0184</u>	0.0076	0.0096	0.0120	0.0000													
Hum	<u>0.0210</u>	<u>0.0178</u>	<u>0.0222</u>	<u>0.0275</u>	<u>0.0279</u>	0.0207	<u>0.0274</u>	<u>0.0215</u>	<u>0.0250</u>	0.0000												
Pve	<u>0.0309</u>	<u>0.0244</u>	<u>0.0206</u>	<u>0.0285</u>	<u>0.0224</u>	0.0183	0.0188	<u>0.0243</u>	<u>0.0220</u>	0.0276	0.0000											
Gua	<u>0.0356</u>	<u>0.0337</u>	<u>0.0279</u>	<u>0.0399</u>	<u>0.0344</u>	<u>0.0244</u>	<u>0.0318</u>	<u>0.0291</u>	0.0145	<u>0.0543</u>	<u>0.0201</u>	0.0000										
Mao	0.0116	0.0011	0.0021	0.0134	0.0081	0.0069	0.0107	0.0101	0.0139	0.0165	<u>0.0235</u>	<u>0.0332</u>	0.0000									
Tap	0.0076	0.0004	0.0026	0.0113	0.0089	0.0036	0.0011	0.0022	0.0122	<u>0.0213</u>	<u>0.0258</u>	<u>0.0355</u>	0.0093	0.0000								
Bda	0.0161	0.0055	0.0065	0.0166	0.0092	0.0085	0.0126	0.0067	0.0121	<u>0.0208</u>	<u>0.0333</u>	<u>0.0357</u>	0.0030	0.0009	0.0000							
Coa	0.0074	0.0022	-0.0011	0.0132	0.0070	0.0024	0.0000	0.0070	0.0069	<u>0.0227</u>	<u>0.0158</u>	<u>0.0230</u>	0.0043	0.0029	0.0039	0.0000						
Tef	0.0171	0.0010	0.0090	0.0093	0.0035	0.0040	0.0057	0.0087	0.0098	<u>0.0238</u>	0.0193	<u>0.0262</u>	0.0038	0.0018	0.0015	0.0014	0.0000					
Car	0.0060	0.0015	0.0035	0.0016	0.0045	-0.0004	0.0039	-0.0014	0.0082	0.0188	<u>0.0235</u>	<u>0.0309</u>	0.0054	0.0042	0.0059	0.0053	0.0080	0.0000				
Eir	0.0100	0.0126	0.0135	0.0148	0.0163	0.0113	0.0103	0.0091	0.0177	<u>0.0286</u>	<u>0.0299</u>	<u>0.0444</u>	0.0154	<u>0.0213</u>	<u>0.0243</u>	<u>0.0177</u>	0.0208	0.0077	0.0000			
Fbo	0.0016	-0.0020	-0.0003	0.0114	0.0080	0.0012	-0.0009	0.0054	0.0045	<u>0.0188</u>	<u>0.0199</u>	<u>0.0268</u>	0.0043	0.0002	0.0087	-0.0010	0.0041	0.0042	0.0155	0.0000		
Tab	0.0024	0.0009	-0.0012	0.0107	0.0076	-0.0002	0.0009	0.0023	0.0061	<u>0.0188</u>	0.0187	<u>0.0290</u>	0.0025	0.0051	0.0030	0.0001	0.0037	-0.0002	0.0094	0.0030	0.000	

Nota: Mex (Mexiana), Alm (Almeirim), San (Santarém), Ita (Itaituba), Jac (Jacareacanga), Ori (Oriximiná), Nha (Nhamundá), Pin (Parintins), Bor (Borba), Hum (Humaitá), Pve (Porto Velho), Gua (Guaporé), Mao (Manaus), Tap (Tapauá), Bda (Boca do Acre), Coa (Coari), Tef (Tefé), Car (Carauari), Eir (Eirunepé), Fbo (Fonte Boa) e Tab (Tabatinga).

Apesar de não haver estruturação genética significativa com os dados de microssatélites, fica claro que Guaporé tende mostrar um grau fraco de diferenciação para com as demais localidades da bacia Amazônica brasileira. Este sinal fraco de diferenciação parece está suportado pelo resultado do teste de Mantel, que se mostrou significativo ($r=0,34260$ $P<0,05$) apenas quando Guaporé está presente na análise. A significância deste teste indica que existe uma correlação entre distância genética e a distância geográfica, ou seja, existe um isolamento por distância que pode estar agindo na dinâmica das amostras populacionais de Guaporé.

A comparação par a par dos valores de F_{ST} entre as localidades, mostrou que Guaporé apresenta um grau moderado de diferenciação genética com quase todas as localidades da bacia Amazônica (exceto Borba). O rio Madeira, representado por Humaitá e Porto Velho apresentou-se diferenciado de 13 localidades dos demais rios amostrados, e de modo geral todas as localidades mostraram-se geneticamente diferenciadas de uma ou mais localidades dentro da drenagem brasileira, com exceção de Oriximiná que apenas mostrou-se diferenciada de Guaporé. Estes resultados podem estar associados com o fato de que alguns locos exibiram excesso de homozigotos e como o F_{ST} é calculado com base na frequência de alelos, então provavelmente estar se evidenciando o máximo da diferenciação genética, mas que, quando analisada todas as localidades conjuntamente (AMOVA), este sinal é minimizado, resultando em ausência de estrutura populacional. Para Guaporé estas evidências reforçam os achados inferidos pelos marcadores mitocondriais, apesar de que para as outras localidades a mesma evidência (de F_{ST} par a par) não foi observado com dados de DNAm, uma vez que os microssatélites, por serem mais polimórficos tendem a uma maior sensibilidade para detectar estrutura populacional. Quando os microssatélites apresentam-se com mais de 10 repetições, geralmente são muito polimórficos (Weber, 1990), que foi o caso de todos os locos amplificados com os *primers* desenvolvidos para tabaqui por Santos *et al.* (2009).

Como alternativa ou mesmo complemento para a AMOVA, também foi realizada uma análise de variância molecular espacial (SAMOVA), que formou grupos biológicos, *a posteriori*, suportado pelo índice de diferenciação (F_{CT}). Entre os vários números de grupo testados (K), o maior valor de F_{CT} , ou

seja, a maior variância genética pela diferença entre grupos ($F_{CT}= 0.02953$) deu-se quando $K=2$, com um suporte estatístico $P=0,0481$ (muito próximo de não ser significativo). Estes dois grupos foram: **1**- todas as localidades da bacia Amazônica e **2**- Guaporé, onde entre os dois grupos verificou-se cerca de 3% diferenciação genética. O gráfico delineado a partir dos resultados da SAMOVA mostrou um perfil de inclinação linear com tendência decrescente (Figura 16), semelhante ao perfil mostrado pelos dados de DNAmT, indicando que $K=2$ apresenta o máximo da diferença genética entre grupos testados. O valor de F_{CT} sugere uma baixa diferenciação genética com os dados de microssatélites, além disso, na SAMOVA nem todos os números para K são possíveis de serem testados.

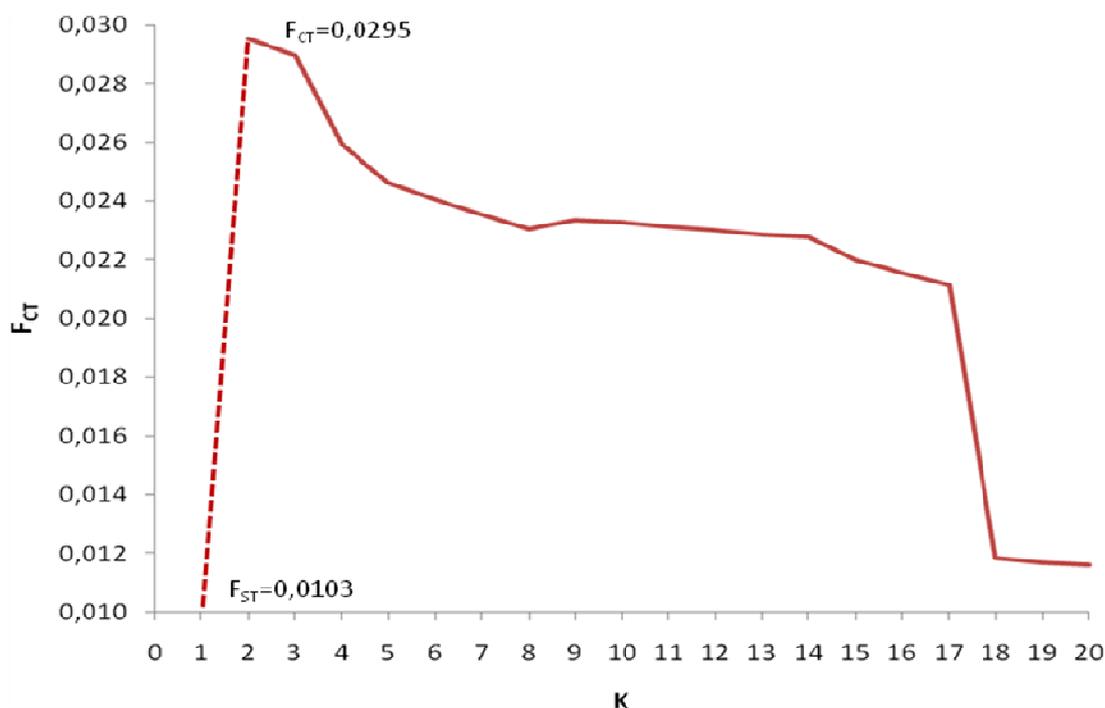


Figura 16. Resultado da SAMOVA para dados microssatélites, relacionando o número de grupos biológicos (K) e a variância genética pela diferença entre os grupos (F_{CT}).

Em complemento as análises tradicionais usadas para evidenciar estruturação genética, foi realizada uma análise Bayesiana no programa STRUCTURE 2.2 (Pritchard *et al.* 2000). Esta análise sem informação *a priori* infere o número de populações (K) mais provável e que agrupe um conjunto de indivíduos cujos genótipos devem estar em Equilíbrio de Hardy-Weinberg e de

ligação. A distribuição de estimativa de probabilidade $L(K)$ (-32087,2) resultou em $K=1$, como a maior probabilidade para explicar o banco de dados desse estudo, representando o mais elevado nível de agrupamento (Figura 17). Quanto maior a probabilidade para K , menor o número de parâmetros a ser estimados, configurando este número de K como o melhor. Logo não existe estrutura genética entre as localidades amostradas e sim a formação de uma única e grande população, uma panmixia para amostras populacionais de tabaqui.

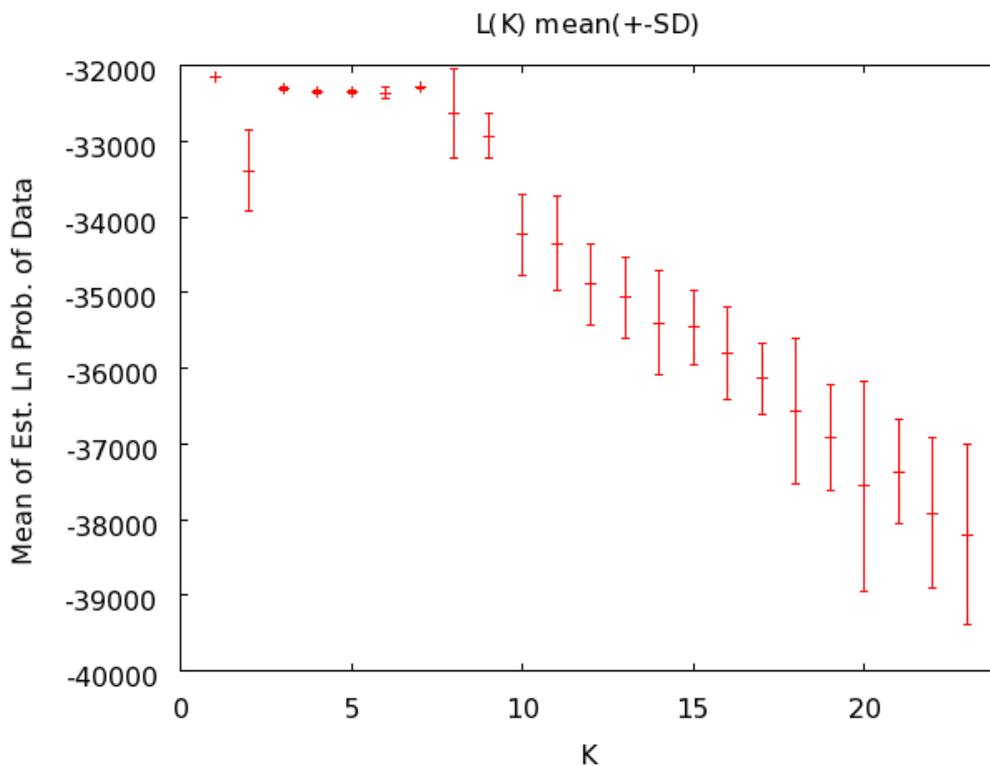


Figura 17. Resultado do STRUCTURE, mostrando uma única população ($K=1$), como a maior probabilidade para os dados do presente estudo. Na vertical: média da estimativa de distribuição de probabilidade dos dados. Na horizontal: K =número de *clusters* testados. (+-SD) desvio padrão da probabilidade média.

4.8 Demografia, Tamanho efetivo populacional e Fluxo gênico

A análise de coalescência implementada do programa IMA estimou os parâmetros genéticos (θ , m e t ; disponíveis na Tabela 22), que posteriormente foram convertidos em parâmetros demográficos. Para cada par de localidades combinada e para a sua população ancestral foram estimados o tamanho efetivo populacional (N_e) coalescente, a partir da diversidade do parâmetro teta (θ). Além desse parâmetro foram ainda estimados a taxa de migração (m) entre as localidades combinadas e o tempo atual em anos (T) estimado a partir do tempo (t) do mais recente ancestral das duas localidades aferidas. A taxa de migração entre as localidades combinadas foi bastante diferente, mostrando que na calha principal da bacia Amazônica, Mexiana (a extremo leste da amostragem) apresentou maior taxa de migração ($m=36,37$) em direção à Tabatinga (no extremo oeste) do que o inverso ($m=4,27$). Relacionando a calha com as localidades mais próximas às cabeceiras dos tributários amostrados, verificou-se que, com exceção de Jacareacanga, as demais localidades nos tributários apresentaram maiores taxas de migração para a calha, que o inverso (Tabela 23).

O tamanho efetivo populacional (N_e) foi semelhante para Mexiana e Tabatinga (Tabela 23) e pelo indicativo de tempo de separação entre as duas localidades mostrar $t=0,0005$, sugerindo ausência de separação, ou seja mesmo localizadas a cerca de 2.800Km de distância, ambas localidades constituem uma única amostra populacional ao longo do rio Amazonas. A calha compreendeu maior tamanho efetivo populacional com relação a Eirunepé e Guaporé, sendo que nesta última o N_e mostrou-se quatro vezes menor do que na calha. Isto pode estar refletindo a taxa de migração que é maior dessas localidades para a calha. Por outro lado, quando combinado a calha com Jacareacanga ou Boca do Acre, verificou-se que o maior N_e é encontrado nessas localidades em relação à calha (Tabela 23). A taxa de migração da calha para Jacareacanga foi maior, e por isso poder-se-ia esperar que o N_e dessa localidade também o fosse, levantando a possibilidade de que vários fatores possam estar contribuindo para este cenário como fatores ecológicos ou culturais.

Tabela 22. Parâmetros genéticos estimados pela análise de coalescência no programa IMA2 para dados microssatélites. Teta $\theta = 4N_e\mu$ (θ_1 - da localidade 1, θ_2 - da localidade 2, θ_A - do ancestral das duas localidades); Tempo por geração de separação entre as duas localidades $t=T/\mu$; Taxa de migração $m=m/\mu$. Taxa de mutação $\mu=10^{-4}$ /tempo de geração. Geração de três anos. Valores entre parênteses = limite de confiança mínimo e máximo.

Localidades	θ_1	θ_2	θ_A	t	$m1 \rightarrow 2$	$m2 \rightarrow 1$
1-Mexiana e 2- Tabatinga	0.375 (1.50 - 49.98)	5.215 (0.73 - 63.17)	5.845 (19.57 - 51.70)	0.0005 (0.0 - 0.39)	36.37 (0.52 - 56.73)	4.27 (0.0 - 49.98)
1-Jacareacanga e 2- Calha	7.805 (2.62 - 17.11)	3.955 (0.80 - 9.13)	25.52 (16.62 - 39.66)	0.1555 (0.01 - 0.81)	0.08 (0.0 - 5.87)	1.97 (0.0 - 15.97)
1-Guaporé e 2- Calha	1.365 (0.31 - 2.97)	6.055 (1.36 - 11.65)	28.59 (19.36 - 44.98)	0.0925 (0.005 - 0.62)	4.92 (0.12 - 21.07)	0.08 (0.0 - 4.67)
1- Boca do Acre e 2-Calha	14.380 (5.91 - 65.69)	4.095 (0.59 - 10.26)	29.86 (20.27 - 49.17)	0.0445 (0.002 - 0.86)	4.42 (0.0 - 15.82)	0.03 (0.0 - 22.77)
1-Eirunepé e 2-Calha	4.795 (1.85-10.19)	6.125 (2.55 - 11.45)	28.52 (18.66 - 48.76)	0.2235 (0.05 - 0.90)	0.93 (0.0 - 6.57)	0.07 (0.0 - 5.22)

Tabela 23. Parâmetros demográficos estimados a partir dos parâmetros genéticos utilizando o programa IMA2 para dados microssatélites. Tamanho efetivo populacional $N_e=4N_e\mu/4\mu \times 3$ (N_{e1} da localidade1, N_{e2} da localidade 2 e N_{eA} do ancestral das duas localidades); Tempo atual em anos $T=(t \times \mu) \times 3$. Número de migrantes por geração $Nm=M\theta/2$. Valores entre parênteses = limite de confiança mínimo e máximo.

Localidades	N_{e1}	N_{e2}	N_{eA}	T	$Nm1$	$Nm2$
1-Mexiana e 2- Tabatinga	2209 (637 - 26757)	2476 (311 - 21895)	15412 (8287 - 24029)	2,5 (0.0 - 2000)	0.87 (0.87 - 1001)	11.37 (4.37 - 1365)
1-Jacareacanga e 2- Calha	5068 (1705 - 11114)	2568 (523 - 5932)	16569 (10796 - 25751)	1212 (121 - 6316)	8.65 (1.06 - 18.71)	0.36 (0.36 - 24.48)
1-Guaporé e 2- Calha	892.4 (206 - 945)	3959 (892 - 7620)	18695 (12654 - 29405)	725,7 (43 - 4892)	0.23 (0.13 - 10.83)	4.87 (1.64 - 8.35)
1- Boca do Acre e 2-Calha	8630 (3548 - 39410)	2457 (357 - 6152)	17910 (12157 - 29500)	320,3 (18 - 6202)	6.33 (0.36 - 20.72)	27.11 (7.87 - 396.2)
1-Eirunepé e 2-Calha	3317 (1283 - 7045)	4237 (1767-7917)	19732 (12904 - 33725)	1855 (436 - 7541)	1.11 (0.26 - 13.12)	5.27 (0.47 - 14.56)

Maior taxa de migração foi observado também de Boca do Acre para a calha, e apresentou um tamanho efetivo populacional cerca de 3,5 vezes maior que o da calha, podendo ser o resultado de condições ambientais locais favoráveis, ou ainda uma possível “menor” intensidade de pesca principalmente por ser uma localidade muito distante dos grandes centros urbanos. O Ne_A ancestral de todas as localidades combinadas mostrou tamanhos muito superiores (cerca de 2 a 6,3 vezes) do que foi observado para cada localidade, indicando o quanto as amostras populacionais da espécie vêm sendo sobre explorada. O menor Nm (número de migrante por geração) foi encontrado para Guaporé, ou seja esta localidade recebe uma média de 0.23 indivíduos efetivos por geração da calha, que por sua vez, recebe 4.87 indivíduos de Guaporé. A calha principal do sistema hidrográfico amazônico apresentou o maior valor de $Nm=27.11$ indivíduos recebidos de Boca do Acre, onde entram 6.33 indivíduos oriundos da calha. Estes valores sugerem um intenso fluxo gênico entre as amostras populacionais do rio Amazonas e dos tributários de água branca para a calha. O tempo estimado de divergência das localidades dos tributários com a calha variou de 320 anos a 1,8 mil anos.

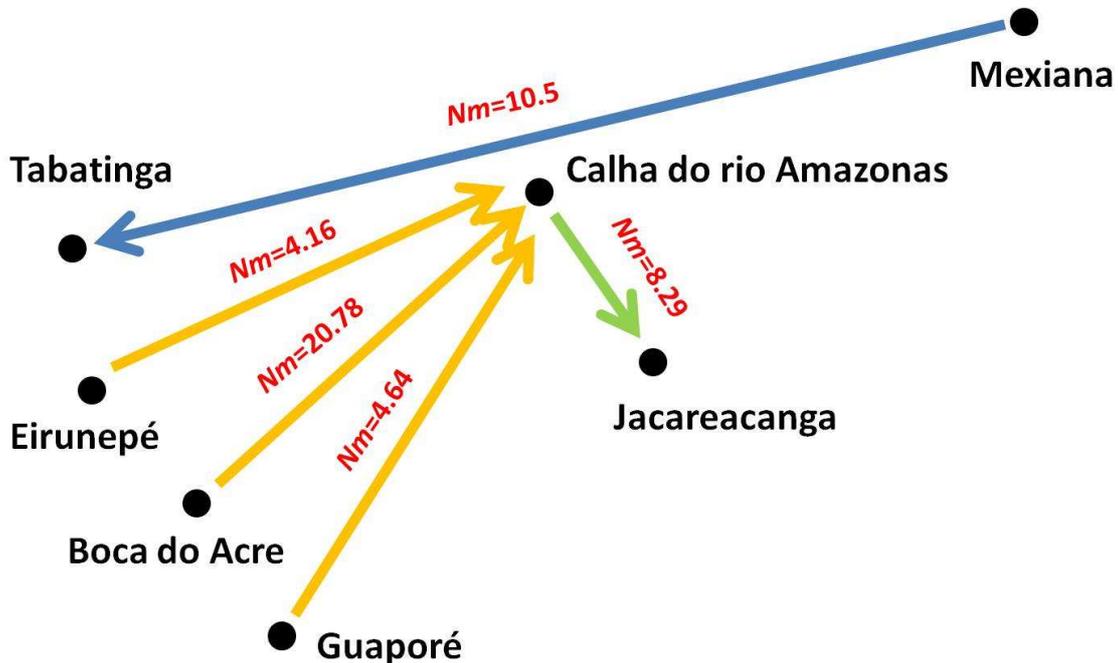


Figura 18. Esquema ilustrativo indicando o sentido da maior taxa de migração e diferença entre a média de número de indivíduos que saem e entram na população, isto é os valores de (Nm) número de migrantes por geração, com base na análise de coalescência do IMA2. A calha representa um conjunto de indivíduos tomados aleatoriamente das demais localidades dentro da calha. Os pontos foram plotados sob um mapa geográfico.

Uma possível redução populacional para tabaqui foi investigada utilizando-se o teste M do programa M Value (Garza e Williamson, 2001). Considerando os resultados encontrados pelas análises de estrutura populacional, o teste M foi aplicado para o conjunto de localidades na bacia Amazônica como uma única população e para Guaporé como outra população. Uma redução populacional significativa foi detectada apenas para Guaporé com base tanto no valor de teta atual ($\theta=1,91$ $P=0,0043$) como o valor de teta assumido para antes da redução populacional ($\theta=7,00$ $P=0,0292$). No entanto, se considerado uma população panmítica como sugere o SRTUCTURE, essa redução no tamanho efetivo populacional não é detectada, mostrando uma tendência de que a redução constatada para Guaporé tenha seu efeito “diluído” quando testado em conjunto com as localidades da bacia Amazônica brasileira. As causas para redução populacional são variadas e envolve desde fatores biológicos à ação antrópica.

5. DISCUSSÃO

5.1 A Variabilidade genética do tambaqui

Níveis de organização biológica como o genético, de espécies, de comunidades e de ecossistemas definem a biodiversidade da região Amazônica. A diversidade genética das populações naturais compreende a variedade de alelos e genótipos, e representa o material bruto sobre o qual a seleção natural atua para permitir a adaptação e evolução os indivíduos e a sua adequação às mudanças ambientais (Frankham *et al.* 2002). Logo, conhecer os níveis de variabilidade genética, principalmente de espécies acometidas pela sobre exploração, como o tambaqui, é imprescindível e necessário. Estas informações permitem inferir, parcialmente, sobre a intensidade do impacto antrópico e as chances que as populações apresentam de suportar este impacto. Para acessar tais informações foram usados marcadores genéticos mitocondriais e nucleares, além de uma ampla amostragem que fosse bem representativa da distribuição geográfica natural da espécie.

Os resultados dos dados de DNAm_t indicaram uma alta variabilidade genética para o tambaqui, que pode ser constatado pelo extraordinário número de haplótipos e por conseguinte elevada diversidade haplotípica total. Os altos níveis de variabilidade inferida pelo DNAm_t foram os maiores quando comparados com outros peixes amazônicos, algumas com comportamento migratório como piramutaba (*Brachyplatystoma vaillantii*), piraíba (*Brachyplatystoma filamentosum*), dourada (*Brachyplatystoma rousseauxii*), curimatã (*Prochilodus nigricans*) e jaraqui de escama grossa (*Semaprochilodus insignis*), e que também são comercializados (Tabela 24). A diversidade nucleotídica mostrou valores muito próximos das outras espécies, principalmente com os Characiformes curimatã e jaraqui de escama grossa, e relativamente alto com relação às demais espécies (exceto pescada e piramutaba). Embora o presente estudo tenha disponibilizado uma sequência nucleotídica maior, parte dela é referente a um gene, o da ATPase 6 e 8, que tende ser mais conservado, e ainda assim evidenciou tais níveis se comparado com os demais estudos que apenas utilizaram a região controle.

Tabela 24. Comparações de índices de variabilidade genética obtidos de DNAmT para tambaqui e outras espécies de peixes amazônicos. N= número de indivíduos; pb= tamanho da sequência em pares de bases; H= número de haplótipos; \hat{H} = Diversidade haplotípica; Π = Diversidade nucleotídica. (*) referente a 940 pb da região controle + 732 pb do gene da ATPase 6 e 8.

Espécies	N	pb	H	\hat{H}	Π	Referência bibliográfica
Pescada (<i>Plagioscion squamosissimus</i>)	81	727	54	0,978	0,0163	Galletti (2009)
Pescada amarela (<i>Cynoscion acoupa</i>)	297	381	83	0,892	0,0030	Rodrigues <i>et al.</i> (2008)
Piramutaba (<i>Brachyplatystoma vaillantii</i>)	149	942	141	0,997	0,0138	Rodrigues (2009)
Piraíba (<i>Brachyplatystoma filamentosum</i>)	225	914	130	0,987	0,0118	Huergo (2009)
Dourada (<i>Brachyplatystoma rousseauxii</i>)	652	911	301	0,979	0,0089	Batista (2009)
Curimatã (<i>Prochilodus nigricans</i>)	348	834	170	0,914	0,0162	Machado (2009)
Jaraqui escama grossa (<i>Semaprochilodus insignis</i>)	249	1148	121	0,961	0,0119	Batalha (2009)
Tambaqui (<i>Colossoma macropomum</i>)	537	1561*	444	0,998	0,0124	presente estudo

Tabela 25. Comparações de índices de variabilidade genética obtidos de marcadores microssatélites entre espécies de peixes. N= número de indivíduos; A_R = riqueza alélica (média do número de alelos por loco); H_O =heterozigosidade observada; H_E = heterozigosidade esperada.

Espécies	N	Nº de locos	A_R	H_O	H_E	Referências bibliográficas
Acará-disco (<i>Symphysodon spp</i>)	336	11	13	0-1,0	0,01-0,95	Amado (2008)
Pirarucu (<i>Arapaima gigas</i>)	436	11	12,4	0,50	0,65	Leão (2009)
Piramutaba (<i>Brachyplatystoma vaillantii</i>)	161	6	9,2	0,78	0,75	Rodrigues (2009)
Dourada (<i>Brachyplatystoma rousseauxii</i>)	483	8	11,3	0,59	0,61	Batista (2009)
Pacu (<i>Piaractus mesopotamicus</i>)	226	8	8,7	0,06-0,79	0,12-0,81	Suganuma (2008)
Tambaqui (<i>Colossoma macropomum</i>)	604	12	21,4	0,73	0,78	presente estudo

Os 12 locos de microssatélites utilizados para caracterizar a diversidade genética do tambaqui mostram-se altamente polimórficos com uma riqueza de alelos de 21,4 por loco e média de $H_E = 0,78$. A diversidade encontrada é entendida como a variedade de alelos e genótipos presente na espécie, e a heterozigosidade é a medida mais comumente utilizada para caracterizar a diversidade genética para um loco, cuja média sobre vários locos caracteriza geneticamente a espécie (Frankham *et al.* 2008). Esta medida clássica de diversidade genética é equivalente à diversidade haplotípica para dados de DNAm. Ela pode ser verificada pelos valores da heterozigosidade esperada de Hardy-Weinberg, uma vez que é menos sensível a amostragem do que a heterozigosidade observada (Frankham *et al.* 2002).

Deste modo, os resultados desse estudo mostraram valores de heterozigosidade esperada bastante homogênea dentro da bacia Amazônica, com um leve desvio para menos em Porto Velho. Estes valores comparados a outros peixes que assim como o tambaqui estão acometidos de sobre exploração, que apresentam comportamento semelhante ou que habitam o mesmo ambiente, mostraram-se mais elevados. Outra medida de diversidade, a alélica, mostrou-se ainda maior para tambaqui comparado às outras espécies (Tabela 25). Os índices de variabilidade encontrados para tambaqui foram muito superiores aos evidenciados para peixes de água doce (número médio de alelos por loco de 7,5 e média de $H_E = 0,46$), porém foram similares aos de peixes marinhos (número médio de alelos 20,6 por loco e média de $H_E = 0,79$) (De Woody e Avise, 2000). Santos *et al.* (2007) encontraram altos níveis de variabilidade genética em tambaquis da calha principal da bacia Amazônica usando a região controle do DNAm. O presente estudo corrobora estes achados e amplia a ocorrência destes níveis de variação também aos tributários do rio Solimões-Amazonas, com considerável robustez, uma vez que mais um gene do DNAm e marcadores molecular do DNA nuclear foram aqui utilizados.

Considerando os rios, verificou-se que no Tapajós as amostras populacionais apresentaram o menor nível de variabilidade genética, embora não seja algo discrepante dos valores dos demais tributários, tanto com dados DNAm como para microssatélite. Estes achados podem estar relacionados com fatores ecológicos e geológicos desse tributário. O rio Tapajós, de águas claras, nasce

nos escudos do Brasil Central e sua bacia de captação representa cerca de 7% da área total da bacia Amazônica (Goulding *et al.* 2003). Rios que são originados de formações geológicas antigas carregam uma quantidade mínima de sedimentos em comparação com rios drenando das formações andinas. Embora rios de águas claras apresentem baixos níveis de nutrientes comparados com os rios originários dos Andes, eles freqüentemente têm altos níveis de produção de fitoplâncton devido à boa transparência de suas águas (Barthem e Goulding, 2007). A distribuição do tambaqui estende-se por toda a bacia Amazônica, mas Araújo-Lima e Goulding (1998) destacam que esta espécie depende da água barrenta, ou de algum componente ecológico associado a ela para sua sobrevivência. Inclusive a área de distribuição inferida por estes autores para o tambaqui não abrange a região do médio e alto Tapajós, limitando-se ao curso inferior dessa drenagem próximo a Itaituba.

De modo geral, pode-se concluir uma relativa homogeneidade nos altos níveis de variabilidade, não podendo assim inferir que a calha ou tributários agreguem quantidade diferente contrastante de variação genética. Padrão discordante foi observado por Batista (2009) para dourada *Brachyplatystoma rousseauxii*, que mostrou uma maior diversidade na região do estuário do rio Amazonas, o que está intimamente relacionada com a biologia da espécie. Os rios amostrados para as populações naturais de tambaqui apresentam características peculiares concernente às suas composições químicas e físicas e suas formações geológicas. Mesmo habitando ambientes diferentes, o tambaqui parece estar bem adaptado às variantes existentes na bacia Amazônica como um todo. Almeida-Val e Farias (1996) sugeriram que a pressão ambiental imposta a esta espécie ao longo de sua história evolutiva confere a ela uma grande plasticidade genotípica e conseqüentemente fenotípica. Não por acaso, vários estudos atestam a impressionante capacidade desse peixe para tolerar ambientes hostis como as baixas concentrações de oxigênio (Silva *et al.* 1975; Saint-Paul, 1984; 1989, Val e Almeida-Val, 1995), exposição à baixa concentração solúvel de petróleo (Kochhann, 2010) e águas com altos níveis de acidez (Aride *et al.* 2007), ou elevado pH alcalino (Silva *et al.* 1975).

Quando a diversidade genética foi analisada por localidades verificou-se que em Guaporé (bacia Boliviana), embora os dados de DNAm_t indiquem quase 100% de diversidade haplotípica, apresentou o menor valor de

heterozigosidade média de toda a amostragem, podendo ser o reflexo de fatores genéticos ou ação humana, abordagem que será discutida mais adiante. Com relação às localidades da bacia Amazônica brasileira, também foi observada uma homogeneidade nos valores das medidas de variabilidade genética, obtidas pela congruência dos marcadores mitocondriais e nucleares. No entanto, foi observado um leve decréscimo para a localidade de Porto Velho. Esta localidade é considerada um dos grandes centros urbanos na bacia Amazônica, sendo o principal mercado de peixes explorando o médio e o alto rio Madeira.

Em 20 anos (de 1975 a 1995) a população humana de Manaus triplicou e isso refletiu uma expansão no esforço de pesca da frota local sobre esta espécie, principalmente no rio Madeira, onde Porto Velho, além de suprir uma demanda local, acabou contribuindo em grande parte com os tambaquis comercializados nos mercados de Manaus (Araújo-Lima e Goulding, 1998). Esta sobre exploração provavelmente foi danosa as populações naturais daquela localidade, pois um dos maiores picos anuais de desembarque em meados dos anos 80 ocorria no início das enchentes (Boischio, 1992), ou seja, durante o período da desova quando os adultos estão no canal do rio (Araújo-Lima e Goulding, 1998). Se para o tambaqui, as amostras de Porto Velho apresentaram a menor variação genética, um estudo com a piramutaba (*Brachyplatystoma vaillantii*) em quatro localidades (todas amostradas no presente trabalho), constatou os maiores níveis de variação genética para as populações de Porto Velho (Rodrigues, 2009). Isto permite deduzir que talvez naquela localidade a pesca seja mais intensa em cima de determinadas espécies, seja pelo valor comercial ou preferência alimentar.

É importante ressaltar que a condição de sobre exploração de tambaqui é atribuída à bacia Amazônica como um todo segundo as estatísticas de monitoramento de desembarque pesqueiro realizada pelo IBAMA (Ruffino *et al.* 2006). Mas de certo existem excessos de exploração pontual/local que geralmente ocorre em grandes centros urbanos, ou próximos a eles, uma vez que os valores para comercialização atingem as maiores cotações e onde a frota pesqueira é maior e bem equipada. Em nove de 21 localidades amostradas, apresentaram 100% de diversidade haplotípica, sendo que algumas estão situadas no baixo Amazonas e as demais em afluentes como o Purus e o Juruá, distantes de grandes centros, como Manaus e Porto Velho. Santarém, outro

grande mercado consumidor de peixes, apresentou também o máximo de diversidade haplotípica, mas nesse caso pode ser resultado da amostragem, pois os indivíduos coletados são oriundos da ilha de São Miguel, onde existe um manejo comunitário. Esse mercado pode estar sendo abastecido por Itaituba (no baixo Tapajós) situado a cerca de 271Km de Santarém, e onde foi observado uma diversidade haplotípica um pouco menor de 0,977.

A diversidade genética evidenciada no presente é resultado de milhares de anos de evolução, no entanto, perdas irreparáveis podem ocorrer de forma muito rápida (Kenchington, 2006), o que comprometeria a adaptação às mudanças ambientais, limitando o potencial evolutivo da espécie. A diversidade genética estimada para uma ampla amostragem populacional de tambaqui mostrou níveis elevados. A Variabilidade genética intra-populacional representa um equilíbrio entre a mutação, deriva genética e seleção natural (Frankham *et al.* 2002), mas que também pode ser influenciada por eventos históricos (Hanfling e Brandl, 1998). A deriva genética aumenta a variação genética inter populacional, enquanto que a ação do fluxo gênico atua numa forma inversa. Um intenso fluxo gênico foi constatado entre as amostras populacionais deste estudo, com base nos valores de Nm (dados de DNAm) principalmente dentro da bacia Amazônica brasileira, e desta com Guaporé um fluxo menor. Isto foi reforçado pela baixa frequência de alelos exclusivos e por eles não terem sido observados em todas as localidades. O número encontrado de alelos exclusivos mostra-se uma estimativa indireta de fluxo gênico, que quanto mais baixo (o fluxo), um maior número de alelos exclusivos surgem por mutação na população (Allendorf e Luikart, 2007).

A entrada e saída de genes numa população são proporcionadas pela migração, um evento que faz parte do ciclo de vida da maior parte da ictiofauna amazônica. Altos níveis de diversidade genética parecem ser comuns em peixes migradores com grandes populações panmíticas (Batista e Alves-Gomes, 2006; Batalha, 2009; Rodrigues, 2009; Batista, 2009), o que não foi diferente para o tambaqui. Populações grandes de espécies naturalmente exogâmicas geralmente têm alta diversidade genética (Frankham *et al.* 2002). Além do fluxo gênico, os altos níveis de variabilidade genética provavelmente devem-se ao grande tamanho efetivo populacional de tambaqui, e a combinação desses dois fatores atua para minimizar efeitos da deriva, além de proporcionar trocas gênicas entre

localidades com diferente intensidade de pesca, podendo restabelecer ou manter ao longo das gerações a variabilidade genética.

Incontestavelmente, o tambaqui é um recurso natural que vem experimentando uma exploração pesada, pelo menos nos últimos 30-40anos (Petrere, 1983; Merona e Bittencourt, 1988; Ruffino e Isaac, 1994; Batista, 2004). Atualmente, a maior parte dos estoques naturais está restrita às cabeceiras dos tributários. Apesar da drástica diminuição no tamanho de censo do tambaqui, os dados moleculares não detectam um sinal de uma redução significativa da população em função de sua variabilidade genética. O que pode ser mal interpretado e utilizado como justificativa para a continuação da pesca predatória, uma condição que seria desastrosa para a espécie.

A falta de “assinatura genética” pode ser devida: 1) uma forte expansão demográfica histórica que pode estar mascarando a redução populacional atual, 2) os últimos 30-40 anos de exploração ainda são demasiadamente curto em relação ao seu tempo de geração para ser detectada, ou 3) por causa de tamanhos do censo histórico extremamente grandes e sua longevidade, o tambaqui ainda tem tamanhos de censo relativamente grandes (Santos *et al.* 2007). Portanto, o atraso na resposta da diversidade genética pode estar refletindo o *status* histórico do tambaqui. A variação genética histórica associada aos eventos ecológicos atuais e à própria biologia da espécie (elevada fecundidade e comportamento migrador) certamente está suportando os altos níveis de variabilidade genética e, com isso, podemos aceitar a 1^o Hipótese nula levantada neste estudo.

É importante ressaltar que na contra mão da sobre exploração das amostras populacionais da natureza, conta a favor da espécie, além de suas características biológicas, o crescimento da piscicultura desse peixe na região Amazônica. Atualmente de cada cinco tambaquis consumido pela população de Manaus, quatro são oriundos desta atividade segundo a Secretaria de Produção Rural do Estado do Amazonas (SEPROR). Estes fatores associados a uma legislação e fiscalização efetiva, principalmente com respeito ao período de defeso do tambaqui, e ao tamanho necessário para garantir a 1^a reprodução, são muito bem vindos e necessários para conservação dos estoques naturais e manutenção de sua variabilidade genética.

5.2 Estrutura populacional – Distribuição da variabilidade genética

Subdivisão geográfica de uma população é chamada de população subestruturada. As consequências genéticas de populações subestruturadas resultam do fato de que a frequência dos alelos pode diferir de uma subpopulação a outra. Quando a frequência alélica difere, a média da heterozigosidade entre as subpopulações é menor que aquela esperada com encontros aleatórios na população total (Hartl e Clark, 1997). Diferenciação genética pode ser resultado de seleção natural que favorece genótipos diferentes em populações diferentes, mas isto pode também resultar de processos aleatórios na transmissão de alelos de uma geração para a próxima ou de diferentes chances de frequência de alelos entre os fundadores iniciais da população (Hartl e Clark, 1997). Por outro lado, forças como migração, seleção purificadora e seleção balanceadora, uniformes em cada área (Hartl e Clark, 2007), atuam como homogeneizantes desse processo.

O padrão de distribuição da variabilidade genética para o tabaqui foi acessado utilizando-se várias análises. A análise de variância molecular (AMOVA) mostrou que a maior parte da variabilidade genética encontra-se dentro das localidades do que entre elas. Para dados de DNAm a variação intra populacional chega a 94% e 98,6% com dados de microssatélites. Houve aumento na proporção desses valores quando Guaporé foi retirado das análises, passando para 97% e 99,3% de variação intrapopulacional com os referidos marcadores. Estes resultados confirmam a panmixia do tabaqui (Santos *et al.* 2007), que ultrapassa a calha do rio Amazonas, estendendo-se por tanto aos tributários da bacia Amazônica brasileira amostrados neste estudo. Estes achados também foram embasados pelos resultados do programa BAPS para DNAm e STRUCTURE para microssatélites e SAMOVA para os dois marcadores. No entanto, considerando toda a amostragem do estudo, incluindo Guaporé na bacia Boliviana, podemos sugerir pelos dados de AMOVA uma baixa diferenciação genética entre esta localidade com as demais na Amazônia brasileira, e que provavelmente está relacionada com um fluxo gênico em menor intensidade devido à presença das corredeiras e a um isolamento por distância. Isto foi suportado pelo resultado do teste de Mantel que somente foi significativo quando Guaporé fez parte das análises e apenas para dados microssatélites. Embora os

dois marcadores utilizados neste trabalho tenham inferidos resultados bastante congruentes, eles carregam “assinaturas genéticas” diferentes. O DNA mitocondrial tem uma taxa mutacional muito maior do que os locos nucleares, fazendo deste uma ferramenta valiosa no estudo de processos evolutivos mais recentes (Frankham *et al.* 2002).

A tendência de uma diferenciação genética para Guaporé fica mais evidente quando foram analisados os resultados de Φ_{ST} (DNAmt) e F_{ST} (microssatélites) par a par entre as localidades, onde verificou-se que Guaporé apresenta níveis significante de diferenciação genética com praticamente todas as outras localidades. Através de diferenciação genética existe uma tendência a aquisição de freqüências de alelos que diferem entre as populações (Hartl e Clark, 1997).

Acentuando esta condição, quando a diferenciação genética foi maximizada entre os dois grupos formados a *posteriori* pela SAMOVA (o mesmo número de K foi encontrado e suportado com DNAmt e microssatélites), verificou-se que justamente eram formados pelo conjunto de localidades da bacia Amazônica brasileira e o outro grupo por Guaporé. Embora, os valores que medem estas diferenças (F_{CT}) tenha sido significante apenas para dados de DNAmt e o fato de que na SAMOVA nem todos os números de k foram testados (por exemplo K=1, que poderia representar melhor o banco de dados), é razoável concluir que Guaporé apresenta níveis baixo de diferenciação genética com o restante da bacia, configurando assim um cenário genético sugerido de metapopulação para o tambaqui. Ao longo de um determinado sistema hidrográfico, peixes de água doce podem constituir uma grande e panmítica população ou podem formar populações genéticas diferenciadas, com o fluxo gênico entre elas o suficiente para manter a integridade de metapopulação (Piorski *et al.* 2008).

O fluxo gênico medido pelo número de migrantes por geração (Nm) para dados de DNAmt mostrou os menores valores comparando Guaporé com outras localidades do que qualquer uma das outras comparações par a par. Para dados microssatélites também foi estimado o Nm com base na coalescência (programa IMA2), que também evidenciou fluxo gênico restrito entre Guaporé e a calha principal da bacia hidrográfica brasileira. Populações que não estão completamente isoladas (metapopulação), mantém entre elas um fluxo gênico, e

neste caso forças que atuariam para levar a extinção pode ser evitada se imigrantes de outras áreas ou populações estão disponíveis (Hanfling e Brandl, 1998). A quantidade de indivíduos que estão migrando por geração foi representativo, o que mantém a troca de genes, minimizando efeitos da deriva e assim os alelos estariam sendo mantidos. A distribuição dos haplótipos, embora seja homogênea de modo geral, mostrou que os haplótipos de Guaporé se agrupam em três ramos na árvore de mínima evolução, ao contrário dos demais haplótipos que ficaram todos misturados na topologia. Além disso, o baixo fluxo gênico pode ser inferido quando se observa o compartilhamento dos haplótipos de Guaporé que foi realizado com apenas quatro localidades.

O rio Guaporé/Mamoré ao encontrar-se pela margem esquerda com o rio Beni (na Bolívia), e se juntar a ele, forma o rio Madeira, fazendo fronteira entre Brasil e Bolívia. O rio Madeira, maior afluente da margem sul da bacia do Solimões-Amazonas, recebe drenagem do oeste e parte do noroeste do escudo brasileiro, mas a maior parte de suas águas é oriunda dos Andes peruanos e bolivianos (Lundberg *et al.* 1998). Contribui com cerca de 15% de sua descarga anual de águas barrentas, e carrega aproximadamente a metade do sedimento que é despejado no Atlântico pelo canal principal do rio Amazonas (Goulding *et al.* 2003). Uma grande extensão de 360 Km de corredeiras compõem a drenagem deste rio entre os municípios de Porto Velho e Guajará Mirim já na divisa com a Bolívia, sendo que a maior dessas corredeiras, a de Teotônio, constitui a maior barreira a navegação nesse rio e muitas espécies de peixes não conseguem ultrapassá-las (Goulding *et al.* 2003). Estas corredeiras representam geograficamente para a amostragem do presente estudo um divisor que parece estar associado aos achados genéticos. Os efeitos das corredeiras do rio Madeira sobre a distribuição da diversidade genética do tambaqui entre as bacias do Amazonas e da Bolívia foram testados por Farias *et al.* (2010). Os resultados foram contundentes com a barreira natural restringindo, mas não impedindo, o fluxo gênico para o tambaqui entre as duas bacias.

Outros trabalhos também verificaram o efeito das corredeiras do rio Madeira como barreira ao fluxo gênico, encontrando populações estruturadas para tartaruga da Amazônia *Podocnemis expansa* (Pearse *et al.* 2006), em boto do gênero *Inia* (Banguera-Hinestroza *et al.* 2002), e no peixe curimatã *Prochilodus nigricans* (Machado, 2009).

O padrão de drenagem sul-americana atual foi moldado pelos escudos continentais guiano e brasileiro, pelo soerguimento dos Andes, pela formação da bacia sedimentar e vários arcos estruturais (Lundberg *et al.* 1998). A longa e complexa história do cenário e sistemas de rios da América do Sul, certamente não apenas contribuíram na diversidade de peixes neotropicais como também tiveram efeito sobre a distribuição de variação genética (Lundberg *et al.* 1998). Fatores históricos parece ser a melhor explicação para a distribuição observada dos haplótipos de peixes em espaços geográficos na América do Sul, no entanto, fatores ecológicos também devem ser considerados (Reeves e Bermingham, 2006). Em peixes migradores de longa distância, a estrutura filogeográfica inter-bacia raramente é encontrada, embora aspectos como a capacidade de migração, a biologia reprodutiva, barreiras físicas históricas e contemporâneas, e as características ecológicas e comportamentais podem desempenhar um papel fundamental na distribuição das linhagens (Piorski *et al.* 2008).

Assim, ao longo do sistema hidrográfico abordado neste estudo, o tambaqui constitui populações genéticas amazônicas e bolivianas diferenciadas, com o fluxo gênico entre elas o suficiente para manter a integridade de metapopulação. Embora seja inferido aqui que o isolamento por distância seja o principal fator para explicar padrão de baixa diferenciação genética observada, não se pode descartar a contribuição das cachoeiras do rio Madeira como uma barreira geomorfológica que pode está dificultando, mas não impedindo o fluxo gênico entre os tambaquis amazônicos e bolivianos. Nesse sentido, rejeitamos a 3^o Hipótese nula apresentada no presente estudo, e aceitamos a hipótese alternativa, além de corroborar com Farias *et al.* (2010), apoiado com um reforço robusto das inferências geradas por meio dos marcadores microssatélites.

5.3 Panmixia do tambaqui na bacia Amazônica brasileira

A ausência de diferenciação foi verificada para as amostras populacionais dentro da bacia Amazônica, com base em todas as análises de estrutura de população utilizadas neste estudo. A panmixia revelada para os tambaquis da natureza considera que o cruzamento entre os indivíduos está ocorrendo ao acaso e que por isso as frequências gênicas e genótípicas tendem a manter-se em proporções constantes ao longo das gerações, favorecendo a manutenção da variabilidade genética. Para esse padrão encontrado, alguns fatores estão contribuindo, como o estabelecimento do fluxo gênico em alta quantidade entre as localidades, que, por sua vez, é o resultado da dispersão e da biologia reprodutiva das espécies (Jorgensen *et al.* 2005), e também devido a fatores ecológicos e históricos em que a espécie está inserida.

A maioria dos peixes comerciais são espécies migratórias de longa distância, seguindo circuitos de migração extensa anualmente, relacionadas com alimentação e reprodução (Arnold, 1999). Ovos e as larvas são carregados passivamente pelas correntes para um “viveiro”, que são locais adequados para o desenvolvimento dos indivíduos jovens, oferecendo alimento e refúgio contra predadores (Lowe-McConnel, 1987; Arnold, 1999).

O tambaqui possui comportamento migratório, sendo considerado um peixe médio migrador movendo-se sazonalmente pelos rios amazônicos, principalmente de água branca (Araújo-Lima e Ruffino, 2004). O ciclo de vida da espécie depende diretamente do alagamento sazonal da bacia Amazônica. Durante a enchente/cheia move-se para a floresta inundada, normalmente de rios de águas pretas ou claras, para se alimentar dos frutos e sementes. Após a enchente, migra rio acima para o canal principal de rios de água branca, desovando nas margens desses rios. Quando começa a época das cheias novamente, os ovos e as larvas são transportados passivamente para áreas de várzea, em milhares de quantidade, pois a espécie é altamente fecunda (Araujo-Lima e Goulding, 1998). Deste modo, o fluxo gênico observado em tambaqui provavelmente resulta da sua adaptação a vida na planície de inundação (localmente conhecido como Várzea) (Santos *et al.* 2007).

A interligação de canais de rios, lagos e planícies alagada em decorrência de “pulso” de inundação é a principal força que desencadeia as

interações importantes entre a biota no sistema de várzea da Amazônia Central (Junk *et al.* 1989). Este ecossistema tem comportamento extremamente frágil diante de mudanças ambientais e em geral carrega informações históricas de eventos que ocorreram no passado geológico (Rossetti *et al.* 2004).

A elevação dos Andes forneceu novos habitats aquáticos de planalto, enquanto que a bacia sedimentar permitiu por vezes o desenvolvimento de extensos habitats lacustres (Lundberg *et al.* 1998). De acordo com Hoorn (1993), o paleodesenvolvimento do sistema Solimões/Pebas representou um cenário onde certamente poderia se esperar uma grande variação de situações aquáticas. A pesquisadora reportou diversas incursões marinhas na Amazônia no médio Mioceno (16 milhões de anos atrás), suportado pela presença de registros fósseis. Estas evidências sugerem um ambiente de planícies estuarianas e costeiras dominadas por lagoas, canais sinuosos e planícies de maré. O termo “Mar de Pebas” pode ser aplicado para as influências marinhas que assolaram o oeste amazônico, devido pequenas flutuações no nível de mar (10 m ou menos) que poderiam facilmente mudar planícies costeiras para lagoas. O “Sistema Pebas” foi interpretado por Hoorn *et al.* (1995) como flúvio-lacustre e que pode ser comparável com o moderno ambiente de várzea, e que provavelmente rios e lagos de várzeas ou savanas existiram nesta imensa região, em menor escala (Lundberg *et al.* 1998). Destacando a devida complexidade da natureza histórica de drenagem dos rios da região neotropical, certamente este cenário histórico criou oportunidade de dispersão para os peixes, podendo explicar muitos dos padrões observados atualmente (Lundberg *et al.* 1998).

O tambaqui é considerado um peixe neotropical moderno datado do Mioceno médio de cerca de 13,5 milhões de anos atrás (Lundberg, 1998), isto leva a crê que a história evolutiva deste peixe pode está associada aos eventos que ocorreram durante esse tempo geológico na Amazônia, e que provavelmente a espécie já habitava uma “paleovárzea”, mesmo antes da formação do rio Amazonas. Hoorn (1994) propôs um modelo evolutivo no qual o rio Amazonas não existiria antes de 16 milhões de anos, no Mioceno médio, mas que teria iniciado sua drenagem em direção ao Atlântico há 10 milhões de anos atrás. Um recente trabalho de Figueiredo *et al.* (2009), embasados por registros geológicos depositados no Delta do Amazonas, revelaram que o gigante rio Amazonas iniciou-se como um rio transcontinental entre 11,8 a 11,3 milhões de anos atrás e

que atingiu sua forma e tamanho atual durante o final do Plioceno (cerca de 3 milhões de anos atrás). Portanto, o tambaqui tem idade antiga e com base em seus fósseis de mandíbulas e dentes especializados, ser muito semelhante ao que é atualmente indica estar persistindo através do tempo e aparentemente não mudando seu comportamento, como sua dieta em frutos e sementes, levando Lundberg (1998) considerá-lo um peixe fora do comum.

A falta de estruturação populacional parece ser um padrão para muitas espécies de peixes da várzea Amazônica, principalmente no corredor principal do sistema da bacia Amazônica, o rio Amazonas, e provavelmente o sistema de "pulsar" da várzea contribui para o padrão genético observado para tambaqui e outras espécies. À medida que estudos vão sendo realizado com peixes amazônicos, este padrão vai se fortalecendo, como já pode ser observado para dourada *Brachyplatystoma rousseauxii* e para piramutaba *Brachyplatystoma vaillantii*, com a região controle do DNAm (Batista *et al.* 2005); piramutaba (Rodrigues, 2009) e dourada (Batista, 2009), com a região controle do DNAm e microssatélites; jaraqui de escama grossa *Semaprochilodus insignis*, com a região controle do DNAm (Batalha, 2009); pescada *Plagioscion squamosissimus*, com a região controle do DNAm (Galletti, 2009); pirarucu *Arapaima gigas*, com ND1 e 6 ATP e oito genes do DNAm (Hrbek *et al.* 2005).

Ecossistema que apresenta certa similaridade com a várzea Amazônica, como o pantanal Matogrossense, também parece influenciar para um padrão de populações geneticamente homogêneo. Outro serrasalmídeo como o tambaqui, o pacu do pantanal *Piaractus mesopotamicus*, apresentou-se como uma única população utilizando-se microssatélites (Suganuma, 2008; Calcagnotto e De Salle, 2009). A explicação para tal padrão também é com base na grande amplitude migratória da espécie e às características relacionadas à origem e historia geológica da região, bem como a manutenção desse padrão em decorrências das cheias anuais que acometem o Pantanal.

Populações de peixes migradores com cruzamentos ao acaso e dispersão larval passiva comumente terão falta de estruturação em sistemas sem barreiras físicas (Awise, 2004). Apesar de que a maioria dos rios amostrados no presente estudo, dentro da drenagem brasileira, não apresentam barreiras físicas, foi amostrado o rio Tapajós com dois pontos de coleta, um em Itaituba e outro em Jacareacanga. Entre essas localidades existem corredeiras, como a de São Luis

do Tapajós e do Bururé, localizadas próximo a Itaituba, cerca de 200 km de sua Foz e segundo Goulding *et al.* (2003) elas não são um obstáculo a migração de peixes nessa região. De fato, não foi verificada restrição ao fluxo gênico de Jacareacanga, a montante das corredeiras com Itaituba, à jusante, e nem com o restante da bacia. O compartilhamento de haplótipos de Jacareacanga se estabelece com localidades na calha e no baixo e alto rio Madeira. Na árvore de haplótipos de evolução mínima, gerada com haplótipos apenas das localidades situadas no extremo da amostragem, mostrou a homogeneidade na distribuição desses haplótipos, suportado por intenso fluxo gênico. No entanto, padrão semelhante não foi verificado para o migrador *Prochilodus nigricans*, a quem as corredeiras do rio Tapajós representam uma barreira ao fluxo gênico, e assim essas populações encontram-se geneticamente estruturadas ou que pode se tratar de outra espécie de curimatã naquela região (Machado, 2009). Considerando os resultados e a presença das corredeiras do rio Tapajós, a exemplo do rio Madeira, também rejeita-se a 3^o Hipótese nula do presente estudo, aceitando por tanto a hipótese alternativa.

Embora, a maioria dos estudos sobre peixes migradores identificou uma fraca diferenciação ou ausência dela entre as populações, principalmente de espécies de ampla distribuição em um sistema contínuo hidrográfico, uma série de estudos têm indicado que, mesmo nestas condições algumas espécies podem conter diferentes populações dentro de uma bacia hidrográfica. Entre essas espécies estão *Prochilodus lineatus*, na bacia do Paraná (Sivasundar *et al.* 2001), *Prochilodus argenteus*, no rio São Francisco (Hatanaka *et al.* 2006), *Brycon lundii* (Wasko e Galetti Jr. 2002) e *Brycon hilarii* (Sanchez e Galetti, 2007). Segundo os autores, isto pode decorrer de adaptações ecológicas locais ou um instinto natural para constituir diferentes populações co-existindo e co-migrando ao longo do canal principal do rio. Já na bacia Amazônica, o pirarucu *Arapaima gigas*, peixe de comportamento sedentário, embora não tenha apresentado estrutura populacional entre amostras dos tributários com a calha principal, apresentou estrutura populacional em forma de gradiente ao longo do sistema hidrográfico amazônico, partilhando a bacia em três macro regiões para a questão de manejo da espécie (Leão, 2009).

Portanto, a formação de uma única e grande população de tambaqui habitando a bacia Amazônica brasileira foi bastante suportado pelas ferramentas

genéticas utilizadas. Com estes achados, aceitamos a 2^o Hipótese nula apresentada por este trabalho. Provavelmente o padrão observado é em decorrência dos eventos em escala macrotemporal que acometeram a região, associado aos ciclos hidrológicos atuais e ainda aos movimentos de migração que a espécie realiza possam estar atuando como agentes mantenedores da homogeneidade intrapopuacional ao longo das gerações, o que tem implicações diretas para o manejo e conservação da espécie.

5.4 Demografia histórica do tabaqui

Estabilidade ou equilíbrio populacional foi sugerido pelos testes estatísticos D de Tajimas e F_S de Fu, mostrando que o polimorfismo genético, quando analisado o banco de dados como um todo, está de acordo com o modelo neutro de mutação. No entanto, quando considerado separadamente bacia Amazônica e Boliviana, o teste de F_S de Fu, mais sensível na detecção de crescimento populacional, foi significativo para a bacia Boliviana, indicando que as amostras populacionais dessa localidade, passaram ou estão passando por uma expansão demográfica. A distribuição das diferenças nucleotídicas par a par (*mismatch distribution*) considerando toda a amostragem de tabaqui apresentou uma tendência de distribuição unimodal, caracterizando uma expansão populacional. Mas, quando as duas bacias são analisadas separadamente, a bacia Amazônica mostrou uma tendência de expansão, ao contrário da bacia Boliviana que apresentou uma distribuição multimodal, indicando um equilíbrio populacional. Este padrão é suportado pelos índices de irregularidades de Harpending (Harpending, 1994) e pela soma dos desvios quadrados (SSD), que apesar de não apoiar esta condição, também não rejeita a hipótese de uma expansão da população na bacia Amazônica.

Aparentemente, o resultado do teste de neutralidade (F_S de Fu), com relação ao da distribuição *mismatch* mostrou padrão inverso para as duas bacias. Isto pode ser reflexo de que se está lidando com muitas localidades, não havendo um consenso no padrão observado para todas elas. Por exemplo, para o teste F_S de Fu, sete localidades dentro da bacia Amazônica indicam expansão

populacional, um sinal que acaba sendo “diluído” quando se analisa conjuntamente as localidades. Os altos valores de Nm entre a maioria das localidades dentro da bacia Amazônica e o grande número de haplótipos únicos encontrados, em uma proporção de 1:1,2 (haplótipo único : indivíduos), reforça a hipótese de uma expansão demográfica, pois um rápido crescimento aumenta o acúmulo de novas mutações (Rogers e Harpending, 1992). Para Guaporé, o teste F_S de Fu indicou expansão populacional, também reforçada pelo grande número de haplótipos únicos, mas apresentou o Nm reduzido para com as outras localidades e *mismatch* rejeitou expansão. A presença de alelos exclusivos (raros) distribuídos apenas entre as localidades dentro do sistema hidrográfico brasileiro (Guaporé não apresentou alelos exclusivos), também pode ser interpretado como registro de populações grandes, com expansão no passado e então estes alelos ainda “sobrevivem” nas populações remanescentes. Quando as amostras populacionais de tambaqui foram analisadas como um todo para investigar padrões de mudanças no tamanho efetivo populacional ao longo da história na coalescência desta espécie (BEAST) verificou-se acentuada expansão populacional. A ausência de um suporte estatístico para detectar o crescimento populacional para a bacia Boliviana pode estar relacionado mais provavelmente a um modesto tamanho efetivo populacional, 4,7 vezes menor quando comparado apenas com a calha principal como representante da bacia Amazônica brasileira.

Por isso, pode-se dizer que a tendência maior concernente a demografia histórica do tambaqui foi que para bacia Amazônica há evidências de expansão populacional e para a bacia Boliviana uma estabilidade das amostras populacionais. Este mesmo cenário foi sugerido por Farias *et al.* (2010) para tambaqui nas mesmas bacias hidrográficas. Os sinais de dinâmica populacional do tambaqui devem ser interpretados para o passado da espécie, uma vez que estão relacionados ao equilíbrio mutação-deriva na variabilidade genética de amostras populacionais coletadas de 2002 a 2009.

De acordo com Wegmann *et al.* (2006), quando detectado expansão populacional, geralmente é mais em função da heterogeneidade espacial do que pelas mudanças temporais no ambiente (ciclos hidrológicos). No que diz respeito à região Amazônica, a maioria dos estudos que estão sendo produzidos com peixes indicam expansão populacional recente, pelo menos em função do teste F_S de Fu nas espécies: curimatã *Prochilodus nigricans* (Machado, 2009), dourada

Brachyplatystoma rousseauxii (Batista, 2009), piramutaba *Brachyplatystoma vaillantii* (Rodrigues, 2009).

Considerando estes achados pode-se sugerir implicações diretas com os eventos históricos e geomorfológicos da região Amazônica e talvez em menor escala com as variações sazonais do nível dos rios. Farias *et al.* (2010) estimaram o tamanho populacional de tambaqui antes da expansão demográfica na bacia Amazônica, e que correspondeu amplamente à proporção relativa de habitat potencial da bacia Boliviana que abrange cerca de 20% da área total da bacia Amazônica, sugerindo que até meados do final do Pleistoceno, a bacia Boliviana tinha uma população de tambaqui aproximadamente 20% menor do que o resto da bacia Amazônia.

Os períodos glaciais e interglaciais do Pleistoceno causaram um forte impacto no clima que, por conseguinte, afetou não apenas a vegetação da América do Sul (Ledru *et al.* 1996), como também teve implicações nas transgressões marinhas que ocorreram nos últimos 800 mil anos (Hooghiemstra e Ran, 1994). As oscilações do nível do mar, ora elevada, ora menor que o nível atual (Siddall *et al.* 2003) provavelmente afetaram a demografia da fauna de peixes, uma vez que dependendo desses níveis de água do mar, seria o suficiente para inundar toda a Amazônia central, oriental e parte da ocidental (Nores, 1999).

Neste cenário, certamente muitos habitats de água doce seriam destruídos, mas após o recuo da água marinha, novos habitat para colonização seriam criados. Mas, como alternativa a esta condição, a subida do nível do mar poderia ter sido o suficiente apenas para originar extensos lagos de água doce transbordados do rio Amazonas na Amazônia central, formando novas áreas de várzea e lacustres, habitat atual do tambaqui (Farias *et al.* 2010). Dentre os tambaquis estudados, foi coletado indivíduos na ilha de Mexiana no extremo leste, no Estado do Pará, onde há influências das marés e a água apresenta-se salobra. Aliás, o baixo rio Amazonas é acometido diariamente por duas flutuações de marés que pode ser percebida até 1.000 km para dentro do rio a partir da Foz do Amazonas (Goulding *et al.* 2003). Deste modo, a segunda condição sugerida por Farias *et al.* (2010) para os efeitos das mudanças climáticas e as conseqüentes transgressões marinhas, seriam fisicamente possível de ter acontecido dado o padrão atual. No entanto, em se tratando de outros animais, os refúgios

Pleistocênicos têm sido a explicação utilizada para inferir sobre expansão populacional, muito mais para biota terrestre (Haffer, 1969; Aleixo, 2004; Peterson e Nyári, 2007) do que para a fauna aquática.

Assim, para o tambaqui, os eventos históricos e geomorfológicos podem explicar melhor o padrão demográfico evidenciado. Considerando separadamente as duas bacias amostradas, aceitamos a 4^o Hipótese nula levantada por este estudo para as amostras populacionais da bacia Boliviana, mas a rejeitamos para a bacia Amazônica brasileira, para a qual a hipótese alternativa foi mais pertinente. Esta também foi a hipótese aceita para a amostragem como um todo, pois ao longo da história de vida do tambaqui evidenciou-se um elevado crescimento populacional.

5.5 Migração

Os resultados evidenciados mostraram uma alta variabilidade genética e que a distribuição dessa variabilidade foi homogênea constituindo uma população panmítica dentro da bacia Amazônica. Certamente este padrão encontrado tem contribuição direta de evento como migração, que pode ter efeitos muito grandes sobre as frequências alélicas e é muito mais efetiva em restaurar a diversidade genética do que a mutação (Frankham *et al.* 2002), além de proporcionar o fluxo gênico como uma força minimizadora da diferenciação genética. Os dados do DNAm e microssatélites foram claramente consistente com alto fluxo gênico, sustentando um padrão de variação dentro e entre a bacia Amazônica e Boliviana. Os elevados níveis da diversidade genética parecem ser comumente observados em peixes migratórios com grandes populações panmítica (Piorski *et al.* 2008). Isso ocorre devido o grande tamanho da população e altas taxas de migração que minimizam o efeito da deriva genética como uma força que diminui a diversidade genética intrapopulacional.

Mas, para que este padrão tivesse se estabelecido e se mantido, provavelmente foi influenciado por eventos históricos de grande impacto na diversificação de peixes (Lundberg, 1998), eventos mais recentes associados à expansão populacional da ictiofauna (Hubert e Rennó, 2006) e as atuais

variações dos ciclos hidrológicos que resultam em transbordamento lateral da água do canal principal do rio em direção à planície resultando em interconexão de ambientes sendo considerada a principal força que atua na interação da biota aquática (Junk *et al.* 1989).

O ciclo de vida do tambaqui, como um típico peixe da várzea Amazônica está diretamente relacionado às variações hidrológicas, realizando migrações para se reproduzir ou se alimentar (Araújo-Lima e Goulding, 1998). O presente estudo mostrou que a migração ocorre de forma bidirecional entre as localidades, mas as taxas de migração foram diferentes. Por se tratar de uma única população dentro da bacia Amazônica, promovida por intenso fluxo gênico, as taxas de migração foram estimadas apenas para as localidades no extremo limite da amostragem para os tributários, e combinadas com um grupo representante da calha principal. No rio Solimões-Amazonas a maior taxa de migração se estabelece do baixo Amazonas (Mexiana) para o alto Solimões (Tabatinga), sendo que esta inferência genética foi compatível à biologia da espécie. Dada a uma maior quantidade de peixes jovens e a escassez de adultos, supõe-se que existe uma grande migração rio acima de subadultos e por tanto é pouco notada ou não deve ocorrer uma migração rio abaixo, uma vez que o tambaqui é raro na região oriental mais afastada (Araújo-Lima e Goulding, 1998).

Com relação aos tributários e a calha, verificou-se que as maiores taxas de migração ocorrem dos tributários de água barrenta (Madeira/Guaporé, Purus e Juruá) para a calha, com intenso fluxo de genes. Em contrapartida, o rio Tapajós, de águas claras, recebe mais migrantes da calha que o inverso.

A migração reprodutiva do tambaqui mostra que o rio Solimões-Amazonas não serve como único eixo para os tambaquis que vivem nos tributários. Os cardumes dos tributários de água barrenta como rio Madeira, Purus e Juruá não migram para o rio Solimões-Amazonas para desovar, pois os próprios tributários são os seus habitats de desova (Araújo-Lima e Goulding, 1998). Desde modo, as inferências genéticas podem ser resultados de uma adequação ao desenho amostral do estudo que consideraria o rio Solimões-Amazonas o corredor principal e os demais tributários, sem levar em conta as características físico-químicas de suas águas, e suas implicações no comportamento da espécie. Assim, corresponderia uma forma mais simplificada da migração, onde o

tambaqui migra de tributário e adentra o canal maior de rio para desovar, o que seria perfeitamente compatível aos resultados genéticos.

Como alternativa, pode-se sugerir que o padrão genético observado não representaria necessariamente a migração reprodutiva da espécie e sim uma dispersão em busca de novos ambientes ou mesmo como estratégia da espécie de suplementar as áreas onde a mesma é mais explorada. E nesse sentido, localidades como Guaporé, Boca do Acre e Eirunepé, mais próximos às cabeceiras de seus tributários, estariam funcionando como fonte de indivíduos para calha, o que aglutinaria nessa área uma maior diversidade genética, mas onde o esforço de pesca tende ser maior. A calha por sua vez estaria fornecendo indivíduos para o rio Tapajós (Jacareacanga), ultrapassando suas corredeiras e habitando pelo menos até o médio Tapajós. Nessa localidade, aparentemente o tambaqui não é tão intensamente explorado em função de preferência alimentar por outros peixes como aracus e bagres (com base em conversas com pescadores, índios e os comunitários de Jacareacanga, ou seja, sem suporte de monitoramento pesqueiro ou trabalho científico), ou pela dificuldade de acesso à localidade, inviabilizando comercializá-los em outras cidades. O fluxo gênico para Jacareacanga foi maior que o fluxo para a calha, e isto foi contrário de todas as outras localidades analisadas. Neste sentido, as amostras populacionais de Jacareacanga provavelmente não são auto-sustentáveis, ou seja, o sucesso reprodutivo pode ser menor e então poucos indivíduos estariam capacitados a retornar à calha principal, mesmo que o tamanho efetivo populacional estimado para esta localidade tenha sido bem maior que o da calha.

Considerando a combinação de Guaporé e calha como representantes da bacia Amazônica e Boliviana respectivamente, verificou-se que a maior taxa de migração ocorre do sentido boliviano para o amazônico, uma evidência inversa aos achados de Farias *et al* (2010) , ou seja, uma maior taxa de migração ocorrendo da bacia do Amazonas para a Boliviana (migrantes subindo as corredeiras do rio Madeira). Farias *et al*. (2010) utilizaram a região controle do DNAm_t e as análises foram realizadas com um banco de dados formado por um grupo boliviano e outro brasileiro (representado por várias localidades). O DNAm_t faz inferências às amostras populacionais de fêmeas de tambaqui, e com base nesta linhagem a taxa e sentido maior de migração foi estabelecido. No presente estudo, a mesma análise foi realizada utilizando-se microssatélites, onde foram

considerados um grupo boliviano e outro grupo formado por 35 indivíduos de localidades da calha, representando toda a bacia Amazônica brasileira. Usando-se microssatélites pode-se revelar as taxas e sentido da migração das fêmeas e machos de tambaqui. Então esta incongruência deve-se provavelmente ao sinal genético dos marcadores moleculares que estão relacionados ao modo de herança distinto e/ou ao número de indivíduos e localidades usadas na análise, que de fato possam ser representativo da bacia Amazônica brasileira. No entanto, o valor de Nm é maior para calha do que para Guaporé, e isto é suportado pelos dois marcadores: DNAm (Farias *et al.* 2010) e microssatélites (presente estudo).

A dispersão dos peixes depende de uma conexão direta entre os rios das bacias e a história de interligamento das bacias reflete a geologia subjacente (Lundberg, 1993). As corredeiras do rio Madeira podem até dificultar a migração subindo este rio, mas não representam uma barreira à troca genética significativa de tambaqui (Farias *et al.* 2010). Portanto, as diferentes taxas de migração, aqui verificadas resultam das diferenças no tamanho efetivo populacional entre as duas bacias, o que será comentado posteriormente neste trabalho.

Os achados do trabalho concernentes às taxas de migração mostraram um padrão equivalente às migrações reprodutivas ou uma rede de movimentos dinâmicos suplementando os estoques de determinadas áreas. É importante salientar que as inferências aqui descritas foram com bases genéticas e portanto qualquer conclusão mais apurada, principalmente, a respeito de migração mesmo que seja de um peixe bem estudado como o tambaqui, mas que habita um ecossistema complexo requer no mínimo uma interação com outras áreas do conhecimento.

5.6 Tamanho efetivo populacional e as estatísticas de desembarque pesqueiro

Os altos níveis de variabilidade genética observados nos peixes migradores decorrem de altas taxas de migração e de um grande tamanho efetivo da população (Piorski *et al.* 2008). A maioria das populações contém indivíduos juvenis, pós reprodutivo e entre os reprodutivos podem existir considerável variação nas suas contribuições para as gerações subseqüentes (Frankham *et al.* 2002), e então os que passam adiante seus genes correspondem ao tamanho efetivo populacional de uma dada população. A quantidade do tamanho efetivo populacional (N_e) é definida como o número de indivíduos em uma população idealizada que experimenta a mesma magnitude da deriva genética como a população observada com tamanho de censo (N) (Poulsen *et al.* 2006).

O tamanho efetivo populacional (N_e) estimado para tambaqui através do programa IMA mostrou que o maior número de indivíduos estão na calha que nas localidades dos tributários, exceto Boca do Acre e Jacareacanga. Mesmo a calha podendo ter uma maior exploração, uma vez que abriga os grandes centros urbanos e uma maior percentagem da população humana, ela ainda agrega um maior N_e . Esta condição parece ser em decorrência de taxas de migração muito maiores em direção à calha. Boca do Acre situada no alto rio Purus apresentou maior N_e quando combinada com a calha e isto pode está relacionado a uma menor intensidade de pesca do tambaqui nesta região. Sua localização muito distante das maiores cidades presente na calha faz com que a comercialização pesqueira se estabeleça, em maior parte, em Rio Branco, capital do Estado do Acre muito mais próximo, e que têm uma população humana cinco vezes menor, comparado a Manaus (IBGE/2009). Nos últimos cinco séculos, o fator determinante para as oscilações na intensidade de pesca na bacia Amazônica tem sido a densidade demográfica (Soares *et al.* 2008).

As maiores reduções nas taxas de N_e/N surge das flutuações no tamanho populacional ao longo das gerações, sendo que o tamanho das populações selvagens variam em número em conseqüência da variação da disponibilidade de alimento, condições climáticas, epidemias, sobre exploração entre outros (Frankham *et al.* 2002).

O tambaqui está entre as 10 espécies mais exploradas na Amazônia (Ruffino e Isaac, 1994) e altamente sobre explorada, quando se compara que nos anos 70, contribuía com 41,12% do pescado desembarcado em Manaus (Petrere Jr., 1983) e mais recente diminuiu para 1,96% (Ruffino *et al.* 2006). Na tentativa de verificar uma redução no tamanho efetivo populacional foi realizado o teste *M*, com base na redução do número de alelos, para a bacia Amazônica e Boliviana (Guaporé). Foi verificada uma redução no tamanho efetivo populacional apenas para Guaporé tanto para o valor de teta atual como para o teta estimado para antes da sobre exploração. No entanto, Reinert e Winter (2002) reportam que o tambaqui não é uma espécie sobre explorada na drenagem do rio Mamoré/Guaporé, e que por conta disso, sugerem que as populações de tambaqui boliviano funcionam como uma fonte para as amostras populacionais brasileiras que são fortemente sobre exploradas. Além disso, populações que experimentam redução populacional apresentam elevada endogamia e conseqüentemente baixos níveis de variabilidade genética, condições estas que não foram constatados para Guaporé ($F_{IS}= 0,05$, $\hat{H}=0,999$, $H_E=0,714$). A análise utilizada inferiu redução populacional com base no número de alelos. Como Guaporé apresenta uma média de 10,25 alelos por loco, o que equivale à metade da média do número constatado para a bacia Amazônica que foi de 21,41alelos, então a aparente “falta” é entendida como se os alelos já tenham sido perdidos. Por isso o sinal de redução detectado, neste caso, está refletindo uma colonização da drenagem boliviana por linhagens diferentes de tambaqui, onde nem todos os alelos que caracterizam geneticamente a espécie possam estar presentes. Cada população é ancestral de sua população descendente na geração seguinte, então uma linhagem é uma série “ancestral-descendente” de populações (Ridley, 2006).

A sobre-exploração de tambaqui nas drenagens brasileiras tem sido registrada a partir dos anos 70, onde somente em Manaus, foram desembarcados 22.000 a 30.000 toneladas dessa espécie (Petrere Jr. 1983). Continuando o monitoramento, Merona e Bittencourt (1988) estimaram que 12.000 toneladas desembarcaram em 1976, e que diminuiu para 5.000 toneladas em 1986. Batista (2004) relata que 2.236 toneladas desembarcaram em Manaus nos anos de 1994-1996. Desde 2001 a 2004, o IBAMA através do ProVárzea (Projeto Manejo dos Recursos Naturais da Várzea) realizou um levantamento de estatística pesqueira

em várias cidades dos Estados do Amazonas e Pará. Mas, para fins de acompanhar o histórico de desembarque pesqueiro de tambaqui acima descrito, foram considerados os dados referentes apenas de Manaus, o maior mercado de peixes de água doce da bacia Amazônica (Araújo-Lima e Goulding, 1998). Assim, foram contabilizados 440,23 toneladas de tambaqui em 2001, 146,47 toneladas em 2002, 279,15 toneladas em 2003 e 334,26 toneladas em 2004, com uma média anual de 300 toneladas desembarcadas durante estes quatro anos. Isaac e Ruffino (1996) relatam que a média do tamanho de captura do tambaqui é 40.89 cm, o que corresponde a uma massa média de 1,42 kg por peixe. Então transformando a quantidade de tambaqui desembarcado para número de indivíduos pode-se acompanhar um decréscimo assim descrito: uma média de 9,1 milhões de indivíduos (1976-1978), 8,4 milhões de indivíduo (1976), 3,5 milhões de indivíduos (1986), uma média anual de 1,5 milhão (1994-1996) e 210 mil indivíduos (2001-2004). As estatísticas pesqueiras para o tambaqui neste período, evidenciaram que o total de toneladas desembarcadas desse peixe diminuiu cerca de 97% em Manaus. Na contra mão desde cenário, a população humana de Manaus no mesmo período (1970-2004) praticamente quaduplicou (dados do IBGE) e um esforço de pesca também se elevou, principalmente se considerar que cerca de 14% da população humana de Manaus consome proteína animal (peixe) por dia (SEPROR- Secretaria de Produção Rural do Estado do Amazonas). Portanto quando se verifica que o tambaqui suportou enorme intensidade de pesca, mesmo insustentável há longo tempo, fica evidente que o tamanho histórico de censo da espécie deve ter sido gigantesco para a Amazônia (Santos *et al.* 2007).

O tamanho efetivo de uma população estima o número ideal de indivíduos que produziria os padrões observados de variação genética em uma dada amostragem e por isso não reflete, necessariamente, o número de censo atual. Na prática, o tamanho efetivo de uma população é geralmente significativamente menor do que o número de adultos ou do tamanho de censo (Frankham *et al.* 2002). Assumindo uma diferença entre o tamanho efetivo populacional e de censo, Santos *et al.* (2007) estimaram um tamanho efetivo populacional de fêmeas de 371.400 que corresponderia a 7 milhões de indivíduos, ou seja, um número insuficiente para suprir o que foi capturado anualmente nos anos 70 e 80. No presente estudo foi estimado o N_e para sete localidades na

bacia Amazônica brasileira de aproximadamente 26.000 indivíduos efetivos totais. Quando se analisa as combinações de localidades se observa que a calha do rio Amazonas, por exemplo, apresentou um tamanho efetivo populacional de apenas 20% do tamanho efetivo de sua população ancestral. Estes resultados associados à diminuição no tamanho de censo em torno de 97%, provavelmente está refletindo uma intensidade de captura insustentável das amostras populacionais de tambaqui.

Apesar da evidente redução no tamanho de censo, os dois marcadores moleculares aqui utilizados não detectaram uma redução significativa da população (as possíveis causas foram discutidas no primeiro tópico - variabilidade genética) e corrobora com Santos *et al.* (2007) que usaram somente a região controle do DNAm. O tamanho efetivo populacional apresentado no presente estudo foi estimado com base na coalescência e por isso representa o tamanho efetivo histórico da população ou o tamanho à longo prazo (Garrigan *et al.* 2002). Assim, o tamanho efetivo medido para o tambaqui representa seu *status* histórico em função do atraso na resposta da diversidade genética (que se mostrou alta), já que se trata de equilíbrio com o tamanho de censo atual da espécie. O tempo decorrente de sobre exploração (aproximadamente 40 anos), mesmo sendo intenso, é provável ser curto para causar um efeito no sinal genético populacional que sobreponha o sinal genético do passado.

À exemplo do tambaqui, o bacalhau do Atlântico *Gadus morhua* teve uma longa história de exploração comercial intensa, culminando com o colapso dos estoques pesqueiros no início dos anos 90. Ainda assim, o tamanho efetivo populacional inferido de dados de DNA permaneceu elevado e não mostraram nenhuma diminuição significativa ao longo do tempo (Poulsen *et al.* 2006). Este aparente conflito entre a genética e os dados de censo, para espécies de peixes sobre exploradas, é reconciliado, considerando que, antes do impacto humano, tais espécies existiram como uma grande população e geograficamente dispersas.

Portanto, o sinal genético ainda não detectado de redução populacional merece cautela, e não pode ser interpretado como sinônimo de falta de sobre exploração e que por isso os estoques suportariam a mesma intensidade de pesca que há anos lhe é destinada. O tambaqui é o peixe “símbolo” da Amazônia e que necessita de monitoramento sistemático, além do fortalecimento e auto-

suficiência da sua piscicultura, que representa um potencial econômico para a região e principalmente uma alternativa de consumo em prol dos indivíduos da natureza.

5.7 O cenário atual da piscicultura do tambaqui

Das espécies nativas da bacia Amazônica, o tambaqui tem despertado grande interesse dos aqüicultores e apresentado grande potencial para a piscicultura. As principais razões de interesse pela espécie são por ter carne saborosa, crescimento rápido, hábito alimentar onívoro, fácil manuseio e grande rusticidade (Woynarovich, 1985).

A criação artificial desta espécie se tornou mais forte desde que os estoques da natureza, com alto valor comercial, diminuíram devido à sobre pesca. Essa atividade tornou-se mais promissora à medida que relevantes trabalhos científicos estavam sendo produzidos e que foram fundamentais para solucionar os problemas até então mais comuns no cultivo. As características biológicas favoráveis dessa espécie associada às facilidades do ambiente (clima, relevo, disponibilidade de água, etc) tornam a Amazônia um ótimo palco para a piscicultura sustentável (Val e Almeida-Val, 1995). Essa idéia ganha mais força quando se verifica o crescimento exponencial da população humana na Amazônia, principalmente em Manaus, chamando a atenção para a necessidade de aumentar a produção de alimento, para suprir a necessidade de uma população que, por questões culturais, consome carne de peixe em quantidades consideráveis (o consumo *per capita* é de 25 Kg por pessoa ao ano contra uma média nacional de 5 kg por pessoa ao ano) (SEPROR- Secretaria de Produção Rural).

O tambaqui é o primeiro peixe nativo de maior produção na piscicultura e tem sido cultivado em várias regiões brasileiras (Val e Honczarik, 1995), sendo considerado o 3º peixe mais produzido (1º é a tilápia e 2º é a carpa) no Brasil.

A piscicultura do tambaqui no Estado do Amazonas iniciou-se há mais de 20 anos e atualmente corresponde com 70% da piscicultura regional, realizadas nos municípios de Manaus, Benjamim Constant, Itacoatiara, Parintins,

Manacapurú, Iranduba, Careiro Castanho, Silves, Itapiranga, Presidente Figueiredo que abrigam médios e grandes produtores. O maior produtor, entretanto, é o município de Rio Preto da Eva (70 Km de Manaus) que produz 40% do tambaqui cultivado, e aproximadamente 10.600 piscicultores estariam produzindo tambaqui no Estado do Amazonas (SEPROR- Secretaria Executiva de Pesca e Aqüicultura).

Atualmente, uma fazenda de criação de tambaqui produz em média 13 toneladas por ha/ano, o que equivale a aproximadamente 3.500 peixes/ha, abatidos em torno de 3 Kg com 10 a 12 meses de idade. A produção anual chega a 10.000 toneladas/ano no Estado do Amazonas. O tamanho para abate depende também da demanda, pois alguns piscicultores mantêm uma produção para famílias de baixa renda onde os peixes, chamados de ruelo são comercializados com uma média de 1,5 Kg por R\$10. O tambaqui curumim (média de 400 g) é produzido para atender as fábricas do Distrito Industrial de Manaus, enquanto que os indivíduos com uma média de 3 Kg são comercializados por R\$30 a R\$40. Os pontos de venda atual não são restritos às maiores redes de supermercados de Manaus, pois é comumente vendido tanto nos maiores mercados e feiras centrais como nesse tipo de estabelecimento situado em bairros da cidade.

Uma recente reportagem na mídia local (Jornal À Crítica-20/06/2010) mostrou que o cenário extremamente favorável à piscicultura do tambaqui, esconde um dos maiores problemas para o crescimento dessa atividade, a falta de planejamento e investimento. Como a demanda é maior em relação à oferta, os preços são irrealistas e por isso muitos produtores não vêm porque deveriam modernizar se já estão tendo um ótimo retorno (em média 50%, às vezes 60% , contra uma média nacional de 20%), embora alguns produtores contestem estes dados. Muitos inclusive reclamam da falta de financiamento, do acesso as técnicas atuais desenvolvidas pela Embrapa (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária) e o INPA (Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia) e às complicações extremas para obter licenciamento ambiental. Associado a este cenário fica claro a falta de colaboração entre os órgãos oficiais que dificulta estatísticas mais realistas da atividade pela falta de organização e informação.

Além dos problemas nas esferas administrativas, a piscicultura de modo geral, não sendo diferente para o tambaqui, também enfrenta problemas

biológicos, às vezes negligenciados por alguns produtores. Geralmente, na criação em cativeiro, muitos piscicultores não incluem um planejamento prévio com relação à “saúde genética” das populações, sendo que esta é necessária para o gerenciamento desses estoques, bem como para propiciar o melhoramento genético assistido. Nesse sentido, uma alta variabilidade genética é necessária para formação de uma população, assegurando assim a existência de variação genética suficiente para alcançar os resultados desejados do melhoramento genético para as gerações consecutivas (Val e Almeida-Val, 1995), e com isso aperfeiçoar a atividade de piscicultura, diminuindo custos e aumentando a produção. Além disso, diante de um ambiente ainda não totalmente controlado e adequado para as populações melhoradas, a variabilidade genética confere aos peixes características adaptativas frente às alterações ambientais de modo que possam responder com maior sucesso as pressões ecológicas.

A variabilidade genética nas populações cultivadas tende a uma diminuição em comparação com as da natureza e isto está diretamente relacionado ao tamanho do estoque reprodutor, a endogamia e o tempo de isolamento dessas populações. As relações de parentesco de indivíduos fundadores são importantes para o manejo de populações de cativeiro, de maneira que a perda da diversidade genética e o endocruzamento possam ser minimizados (Frankham *et al.* 2002). Assim, é recomendado que uma renovação de matrizes de tambaqui seja realizada sempre que necessário para recuperar a variabilidade genética. Para tanto, saber de qual lugar da natureza retirar estes reprodutores de forma que represente a maior variabilidade das amostras populacionais naturais da espécie, é fundamental. Pelos resultados deste estudo, verifica-se que qualquer uma das localidades amostradas poderia fornecer matrizes para iniciar ou mesmo substituir os casais de cultivos, quando houvesse a necessidade. Então um monitoramento genético nas populações cultivadas deveria eventualmente ser realizado para evitar a perda da diversidade associada a um número insuficiente de fundadores ou a indivíduos relacionados, e com isso manter um mínimo necessário de variação para que as populações possam se sustentar.

Segundo a Embrapa, há uma tendência que a área atual de cultivo de tambaqui aumente em 200% nos próximos dois anos. Isso significa um

crescimento de produção e o estabelecimento de uma cadeia produtiva de tambaqui com o beneficiamento da carne e também dos subprodutos do peixe como couro, que geralmente viram um passivo ambiental. Parecem ser promissoras as parcerias entre a iniciativa privada e Institutos de Pesquisas, como o INPA, para prospectar o desenvolvimento de produtos a partir da pele do peixe, sendo o tambaqui considerado um dos grandes potencial nesse seguimento. Essas iniciativas de agregar valor ao produto, além de requerer uma grande produção cultivada também criam a oportunidade de gerar emprego e renda, além de haver a possibilidade de minimizar o impacto nas populações naturais, proporcionando assim a utilização de um recurso natural com bases sustentáveis. Mesmo que o potencial da piscicultura ainda não tenha alcançado sua plenitude, as 10.000 toneladas de tambaqui produzidas significam que por ano aproximadamente 2,7 milhões de indivíduos não saíram dos rios amazônicos. Neste sentido o cultivo de tambaqui pode ser um aliado para proporcionar um banco genético preservado na natureza, que é a fonte para qualquer programa de conservação.

5.8 Contribuição para Conservação e Manejo do tambaqui

O sistema hidrográfico Amazônico e sua ictiofauna, ao longo dos anos, vêm sofrendo grande impacto das atividades humanas. Diante deste cenário, o conhecimento da estrutura genética das espécies e suas respostas às alterações ambientais são a base para manejo das populações de peixes selvagens e para o estabelecimento de Unidades Evolutivas Significantes capazes de conservar a integridade genética dessas populações. As respostas às alterações ambientais exibidas pelas populações de peixes estão diretamente relacionadas aos níveis de variabilidade genética que elas apresentam.

O principal uso da variação do DNAm na conservação está na resolução de incertezas taxonômicas, na definição de unidades de manejo, e no auxílio ao entendimento de aspectos importantes da biologia das espécies (Frankham *et al.* 2002) . O outro marcador utilizado neste estudo, os microssatélites proporcionam uma das maneiras mais práticas e poderosas atualmente disponíveis para acessar a diversidade genética em espécies ameaçadas ou sobre exploradas.

Os estoques naturais de peixes precisam de um gerenciamento eficaz, principalmente se levarmos em conta que a população humana na Amazônia cresce exponencialmente, e de certo as comunidades de peixes continuarão assumindo um papel de sustentar, como alimento, este crescimento. O tambaqui é um recurso natural extremamente apreciado na alimentação e para evitar este caminho, o seu uso sustentável se faz factível e necessário, dependendo para isso da conservação e manutenção da sua variação genética e do conhecimento da estrutura genética para proporcionar a maximização de uma captura sustentável.

Para implantação de políticas de cota de pesca, é fundamental a identificação de “estoques” e/ou populações de acordo com o conceito genético de estoque, ou seja, como uma unidade reprodutivamente isolada que é geneticamente diferente de outros estoques (Oveden, 1990). Programas de manejo e conservação em espécies sujeitas à fragmentação por impacto do homem só serão realmente eficazes considerando os fatores genéticos (Frankham *et al.* 2002). A estrutura genética de uma população é a informação mais importante para uma espécie que necessita de manejo (Hillis, 1996), pois

direciona em que escala o manejo deve ser conduzido, se local, por drenagem ou na bacia em geral. Então a partir da inferência genética engendrada neste estudo para uma espécie com ampla distribuição geográfica sugere-se um único estoque de tambaqui na bacia Amazônica brasileira e por tanto passível para o manejo unificado.

Mas o sucesso de programas de manejo também depende do conhecimento integrado de variáveis fisiológicas, comportamentais e ecológicas, que são importantes para o entendimento de como as populações sobrevivem e se reproduzem em diferentes ambientes (Danzmann *et al.* 1991). Estas informações deveriam está interagidas com a genética. Geralmente, a importância dos aspectos da genética no manejo de estoques capturados pela pesca comercial raramente faz parte das discussões para programas de manejo dos estoques pesqueiros. Os motivos podem ser os mais diversos, mas fica claro que a interação entre os pesquisadores e/ou profissionais de diferentes áreas do conhecimento ou mesmo entre as instituições de ensino e pesquisa (que geram as informações) e órgãos oficiais ainda é incipiente.

Com relação à amostragem total do trabalho, temos um cenário de metapopulação, e verificou-se a existência de taxas de migração entre as duas bacias de forma que a Boliviana parece ser fonte de indivíduos para a Amazônica brasileira. Considerando este aspecto e o fato da construção de duas hidrelétricas no rio Madeira, seria fundamental adoção de estratégias de manejo para minimizar os efeitos causados por esta barragem. As companhias hidrelétricas, que realizam estes empreendimentos em outras regiões do Brasil têm incorporado em seus projetos a construção de escadas e elevadores como um sistema de transposição de indivíduos a montante e a jusante das barragens ou ainda a adoção de programas de repovoamento. De qualquer forma, seja qual forem às medidas mitigadoras, elas podem não se adequar à esta espécie, dado à sua biologia, e assim um monitoramento genético após implantação dessa obra seria de grande importância.

Outra contribuição fornecida por este trabalho foi o acesso aos níveis de variabilidade genética. Com o declínio das amostras populacionais de tambaqui, pelo histórico de sobre exploração, é evidente que parte da variabilidade genética que existiu no passado da espécie foi perdida, mas o que ainda existe nas amostras populacionais remanescentes pode ser considerado

representativo dessa variabilidade histórica da espécie e por tanto deve ser conservada. É esta variação que proporciona ao tambaqui uma maior chance de sobreviver na natureza e de fornecer alelos de interesse para o seu melhoramento genético na piscicultura, que por sua vez oferecendo grande produção, pode ajudar a minimizar o impacto sob os tambaquis silvestres.

Medidas de conservação para obter bons resultados devem levar em consideração vários fatores. Tão importante como uma legislação eficaz que proteja os peixes para reproduzir, fiscalização efetiva para validar as leis e inibir ações fraudulentas, é trabalhar a questão da educação ambiental em todos os atores inseridos neste contexto. Esta medida talvez seja a mais difícil de alcançar, pois modificar hábitos e atitudes passadas ao longo de gerações não é tarefa fácil, mas se trabalhado esta questão, as chances de resultados aplicáveis e duradouros serão muito maiores. Atingir a consciência do pescador, que vive do peixe, para medidas de conservação, requer acordos de pesca que concilie interesses ambientais, sociais e econômicos. Mas isso implica uma série de medidas, que muitas vezes tomam dimensões inaceitáveis, e levam à regressão de todo um processo, quando, por exemplo, em recente noticiário local expõem as fraudes de desvio de seguro defeso (no Estado do Amazonas) há pelo menos quatro anos. Ações nesse segmento não somente agridem o cidadão contribuinte, mas também à própria ictiofauna, a quem deveria justamente proteger.

Um dos grandes desafios na região Amazônica é desenvolver estratégias visando assegurar a sustentabilidade dos recursos pesqueiros e das próprias pescarias, que envolve um grande número de pessoas, e que exibe uma enorme importância social e econômica (Freitas e Rivas, 2006). Uma estratégia de manejo que proibisse permanentemente a pesca comercial de determinada espécie, como o tambaqui, certamente permitiria a recomposição de estoques naturais, mas por outro lado causaria grande impacto social e econômico além de que, na possibilidade de um desequilíbrio entre a oferta e a procura, os altos valores de mercado poderiam incentivar a ilegalidade. Alternativamente outras estratégias de manejo, talvez menos extrema, tais como adoção do tamanho mínimo de captura, determinação dos períodos de defeso, proibição do uso de determinados apetrechos de pesca entre outros, medidas estas que já vigoram, poderiam ter resultados mais positivos, se realizadas efetivamente. Além disso, a estratégia de manejo da pesca das espécies migratórias deve compreender uma

complexa combinação de restrições que conciliem as explorações dos estoques com os movimentos migratórios (Barthem *et al.* 1997) e com isso reconhecendo a importância das migrações no ciclo de vida de espécies como o tambaqui.

O manejo dessa espécie se faz necessário tanto pela manutenção de uma atividade de destacada importância sócio-econômica para a população tradicional quanto pela conservação dos sistemas aquáticos amazônicos. Um plano de conservação também precisa prever ações voltadas à proteção do habitat, pois este é fortemente relacionado à história natural e ciclo de vida de uma espécie (Allendorf e Luikart, 2007). Isso significa uma relação direta com a conservação das áreas centrais de várzea, pois este é o ambiente que o tambaqui depende para sua sobrevivência e com qual mantém uma estreita relação ecológica. Como se alimenta de frutos e sementes acaba realizando a dispersão da “vida” para muitas espécies da flora amazônica, e por isso o tambaqui é considerado uma espécie-chave desse ecossistema.

Portanto, entendo que o tambaqui, como um recurso natural da Amazônia exemplifica bem, a situação semelhante que diversos outros recursos naturais dessa região se encontram. Compatibilizar interesses das mais diversas esferas resulta em muitos debates calorosos e polêmicos. Não se pode negligenciar o que está ocorrendo com a espécie, nem tampouco ignorar a presença humana nesta região. Qualquer que seja o programa de conservação implantado na Amazônia, dificilmente terá êxito, se não focar alternativas econômicas para quem (no caso) sobrevive e se sustenta da pesca. Além disso, as áreas de várzeas devem ser protegidas, pois são “berçários” para o tambaqui. Nesse sentido, o conhecimento científico produzido deveria ser muito mais compartilhado pelos gestores oficiais e utilizado para moldar as políticas públicas, conferindo uma divulgação e um serviço em prol à sociedade.

5.9 Propondo uma ampliação na distribuição geográfica do tambaqui

O tambaqui é encontrado em estado silvestre nas bacias do Solimões-Amazonas e Orinoco, embora registros fósseis ampliem a presença da espécie há milhões de anos atrás também no rio Magdalena na Colômbia (Lundberg *et al.*

1986). É na bacia Amazônica que a distribuição dessa espécie é ampla, existindo uma área central onde as densidades são relativamente altas e área periférica onde ocasionalmente são capturados (Araújo-Lima e Goulding, 1998). A espécie é mais encontrada nas drenagens ao sul da Amazônia Central, em todos os tipos de água, no entanto o rio Madeira, mais que qualquer outro tributário, constitui a drenagem onde a espécie é mais amplamente distribuída. Nas drenagens ao norte da Amazônia Central é mais restrito principalmente no rio Negro acima da boca do rio Branco (Araújo-Lima e Goulding, 1998). Assim, a água barrenta é o principal fator com qual a distribuição da espécie pode estar relacionada. Lima e Araujo-Lima (2004) constataram que adultos de tambaqui, também migram de rios pobres em nutrientes para desovar nos rios ricos em nutrientes.

No leste da bacia Amazônica, o tambaqui muito raramente é capturado na ilha de Marajó (lago do Ariri), no rio Tocantins e rio Xingu (só na área da boca) (Goulding e Carvalho, 1982). Em rios de água clara dos Escudos Brasileiro, como o rio Tapajós a espécie é encontrada nos cursos inferiores e explorações acima das cachoeiras de todos os tributários de água preta e clara não capturaram essa espécie (Ferreira *et al.* 1988, Ferreira, 1993). Para o presente trabalho foram realizadas duas excursões (em outubro e novembro de 2008-2009), para o município de Jacareacanga à margem esquerda no médio rio Tapajós. Foram coletados amostras de 30 indivíduos capturados nessa região, ou seja, acima das corredeiras do rio Tapajós, a cerca de 650 Km de sua Foz no rio Amazonas, e portanto sugerimos que a área de distribuição da espécie seja ampliada pelo menos até o referido município. Da mesma forma pesquisadores/colaboradores do nosso grupo de pesquisa no Estado do Pará capturaram e disponibilizaram amostras de tambaqui da ilha de Mexiana na Foz do rio Amazonas que também ficou fora da área de distribuição natural da espécie. Portanto, a partir da distribuição de tambaqui inferida por Araújo-Lima e Goulding, (1998) conforme o mapa da Figura 18, (modificado com os pontos de coleta desse estudo), propomos a adoção da distribuição geográfica atualizada de tambaqui silvestre de acordo com o mapa da Figura 19.

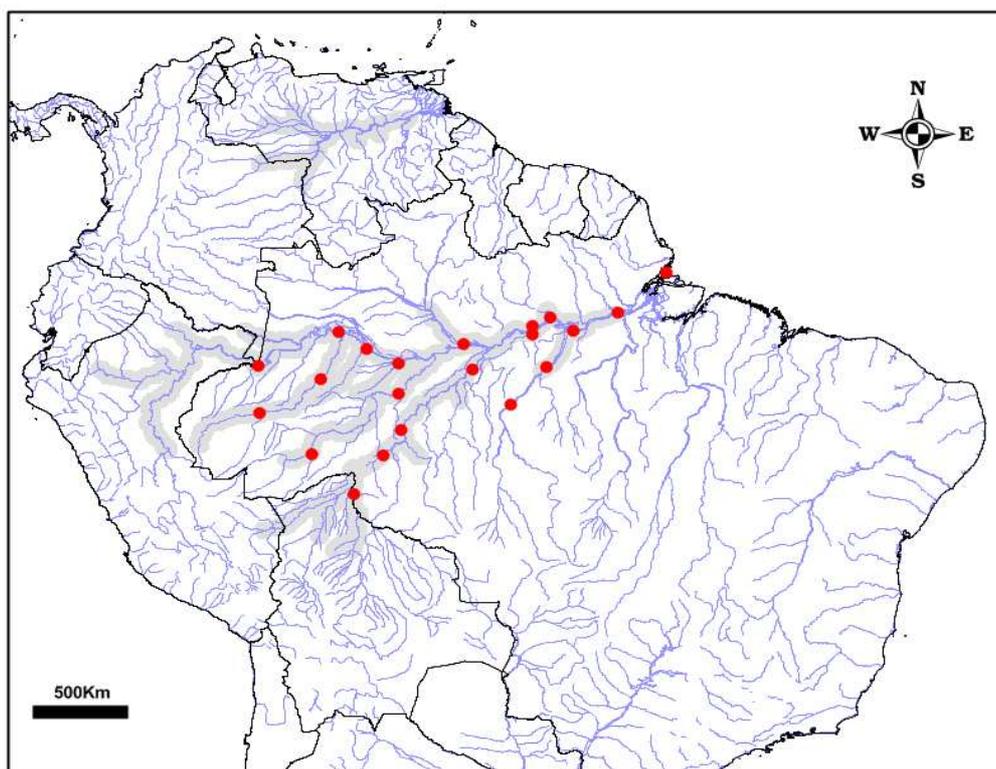


Figura 19. Distribuição geográfica de tambaqui (Araújo-Lima e Goulding, 1998)

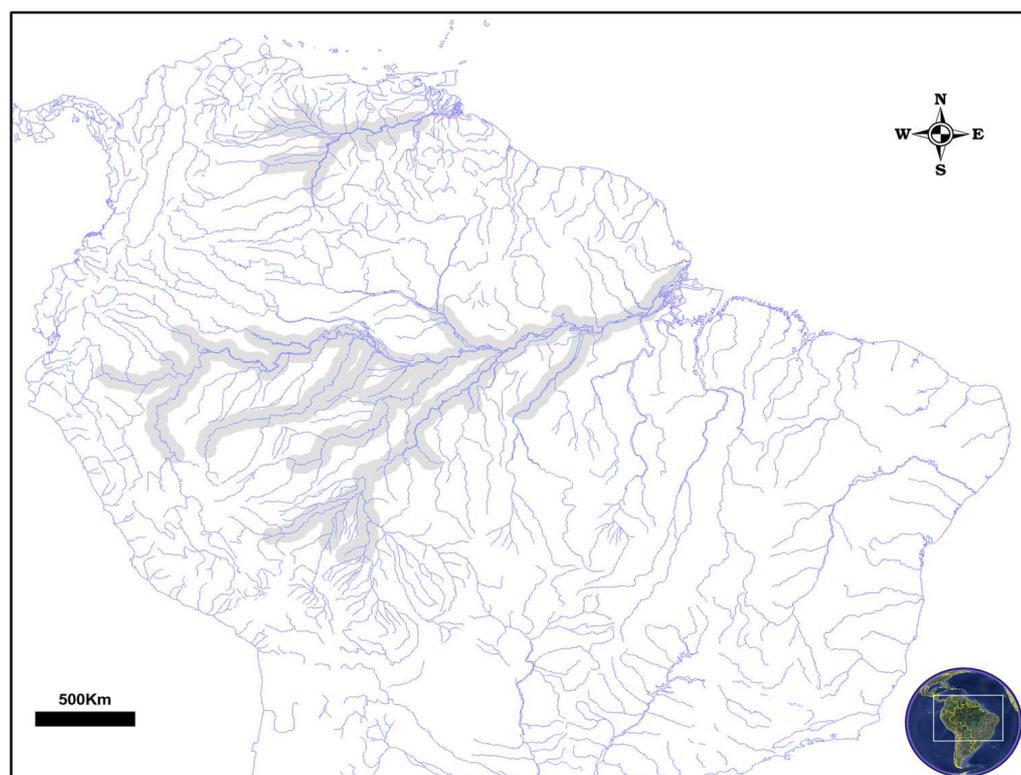


Figura 20. Distribuição geográfica proposta por este estudo para tambaqui (*Colossoma macropomum*).

6. CONCLUSÕES GERAIS

Como produto biotecnológico, este trabalho disponibilizou 14 *primers* de microssatélites, altamente polimórficos, para tambaqui.

Estes marcadores moleculares foram transferidos com sucesso para outras espécies de serrasalmídeos (pacu, piranha e pirapitinga) filogeneticamente relacionadas com tambaqui, onde se mostraram também polimórficos.

Dos 13 *primers* microssatélites utilizados, o Cm1E3 apresentou desvio do EHW para o loco amplificado, não sendo usado para as análises populacionais e portanto recomenda-se cautela na sua utilização em outras espécies.

Altos níveis de variabilidade genética foram encontrados para tambaqui em uma ampla área geográfica, envolvendo a calha principal e os tributários da bacia Amazônica.

De modo geral, a variação genética encontrada foi homogênea entre as localidades, exceto com um pequeno decréscimo para Porto Velho (dados de DNAm_t e microssatélites) e Guaporé (microssatélite). Entre rios, os níveis de variação genética também se mostraram similar, exceto para o rio Tapajós.

Guaporé apresentou fraca diferenciação genética com a bacia Amazônica brasileira, e neste caso, ignorando o limite geográfico entre o Brasil e a Bolívia, o tambaqui constitui uma metapopulação.

Fluxo gênico restrito entre a bacia Boliviana (Guaporé) e a Bacia Amazônica, ocasionado por um isolamento por distância (microssatélites).

Na bacia Amazônica brasileira, existe uma única e grande população de tambaqui, com alto fluxo gênico evidenciado por Nm (DNAm_t), elevadíssimo número de haplótipos, taxa de migração e baixa freqüência de alelos exclusivos.

As corredeiras do rio Tapajós não são uma barreira ao fluxo gênico entre Jacareaganga (médio Tapajós) e as demais localidades, e as corredeiras do rio Madeira, embora representem uma provável dificuldade para movimentação de tambaquis, não impedem o fluxo gênico entre as bacias boliviana e brasileira.

A taxa de migração foi assimétrica, sendo maior da bacia Boliviana para a bacia Amazônica, podendo a primeira ser “fonte” de tambaquis para a segunda.

Considerando os tributários, a taxa de migração foi maior dos rios Madeira/Guapoé, Purus e Juruá para a calha, e desta para o rio Tapajós, configurando uma dinâmica nos movimentos da espécie.

O tamanho efetivo populacional (N_e) foi maior na calha do rio Amazonas e nas localidades de Jacareacanga e Boca do Acre.

Expansão populacional foi detectada para a bacia Amazônica brasileira enquanto que para a bacia Boliviana houve a evidência de uma estabilidade das amostras populacionais.

Os dois marcadores mitocondriais e microssatélites não detectaram efeitos da sobre exploração que há cerca de 40 anos acomete à espécie, face à alta diversidade genética. É provável que o tempo de sobre exploração seja curto para ter ocorrido um registro genético ou que o tamanho efetivo populacional foi gigantesco no passado, podendo está mascarando um sinal genético mais recente.

O manejo da espécie pode ser unificado, considerando um único estoque no sistema hidrográfico brasileiro.

É imprescindível para sobrevivência da espécie manter os níveis de diversidade genética encontrados, proteger o ambiente de várzea, o período de defeso e o tamanho mínimo de captura devem ser efetivamente respeitado e a piscicultura deve ser uma das alternativas para prover alimento, minimizando o impacto nas amostras populacionais da natureza.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aleixo, A. 2004. Historical diversification of a Terra-firme forest bird superspecies: a phylogeographic perspective on the role of different hypotheses of Amazonian diversification. *Evolution*, 6: 1303–1317.
- Aliaga, C. 2004. Variabilidade Genética de *Colossoma macropomum* y *Piaractus brachypomus* em La región Del alto Madeira (Amazonía boliviana) para El análisis de polimorfismo de La longitud de secuencias (EPIC-PCR). Tesis de grado de Biólogo. Facultad de Ciencias Puras y Naturales. Universidad Mayor de San Andrés, La Paz, Bolívia, 85p.
- Allendorf, F. W.; Luikart, G. 2007. *Conservation and the Genetics of Populations*. Blackwell Publishing, New York, NY.
- Almeida-Val, V. M. F.; Val, A.L. 1993. Evolutionary trends of LDH isozymes in fishes. *Comp. Biochem. Physiol.* 105B(1): 21-28p.
- Almeida-Val, V.M.F.; Farias, I.P. 1996. Respiration in fish of the Amazon: metabolic adjustments to chronic hypoxia. In: Val, A. L.; Almeida-Val, V.M.F.; Randall, D.J. (eds). *Physiology and Biochemistry of the fishes of the Amazon*: 257-271pp.
- Almeida-Toledo, L.F.; Foresti, F.; Toledo-Filho, S. A.; Bernardino, G.; Ferrari, W.; Alcantara, R.C.G. 1987. Cytogenetic studies in *Colossoma macropomum*, *Colossoma mitrei* and their interespecific hybrids. *Selection, Hybridization, and genetic Engineering in Aquaculture*, v.1. Klaus Tiews (ed.). Berlin, 190-195p.
- Amado, M.V. 2008. Caracterização genética de populações do peixe ornamental acará-disco (*Symphysodon* spp., Cichlidae, Perciformes), utilizando marcadores microssatélites. Tese de Doutorado, UFAM, Manaus, 160p.
- Araújo-Lima, C.A.R.M. 1984. Distribuição espacial e temporal de larvas de Characiformes em um setor do rio Amazonas, próximo a Manaus. Dissertação de mestrado. INPA/FUA, 82p.
- Araújo-Lima, C.A.R.M.; Goulding, M. 1998. Os frutos do tambaqui. Ecologia, conservação e cultivo na Amazônia. Sociedade Civil Mamirauá – MCT – CNPq, 186p.
- Araújo-Lima, C.A.R.M. 2002. Piscicultura extensiva de tambaqui na floresta de várzea. In: *Livro de Resultados dos Projetos de Pesquisa Dirigida* (PPDS)-PPG7 ed. Brasília: MCT. 131-135p.
- Araújo-Lima, C.A.R.M.; Ruffino, M.L. 2004. Migratory fishes of the Brazilian Amazon. In: *Migratory Fishes of South America. Biology, Fisheries, and Conservation Status* (Carolsfield, J. Harvey, B. Ross, C. e Baer, A. (Eds.)). Victoria, BC: Co-published by World Fisheries Trust/World Bank/IDRC. 233-302pp.
- Aride, P.H.R.; Roubach, R.; Val, A.L. 2007. Tolerance response of tambaqui *Colossoma macropomum* (Cuvier) to water pH. *Aquaculture Research*, 38, 588-594.

- Arnold, G. 1999. Unravelling mechanisms of fish migration: a 30-year perspective. *In: Hancock, D.A., Smith, D.C. and Koehn, J.D. (Eds.) Fish Movement and Migration. Bendigo: Fisheries Research & Development Corporation, 7-21p.*
- Avise, J.C.; Neigel, J.E.; Arnold, J. 1984. Demographic influences on mitochondrial DNA lineage survivorship in animal populations. *J. Mol. Evol.*, (20) 99-105.
- Avise, J.C.; Helfman, G.S.; Saunders, N.C.; Stanton, L.H. 1986. Mitochondrial DNA differentiation in North Atlantic eels: Population Genetic consequence of an unusual History Pattern. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, (83):4350-4354.
- Avise, J. C. 1994. Molecular Markers. *Natural History, and Evolution*. Chapman and Hall, New York, NY.
- Avise, J.C. 2004. *Molecular Markers, Natural History and Evolution*, second edition Sinauer Associates, Sunderland, MA.
- Ballard, W. O.; Whitlock, M. C. 2004. The incomplete natural history of mitochondria. *Mol. Eco.*, 13: 729-744.
- Banguera-Hinestroza, E., Cardenas, H., Ruiz-Garcia, M.; Marmontel, M., Gaitan, E., Vazquez, R., Garcia-Vallejo, F. 2002. Molecular Identification of Evolutionarily Significant Units in the Amazon River Dolphin *Inia* sp. (Cetacea: Iniidae). *The American Genetic Association* 93:312-322.
- Barroso, R.M., Hilsdorf, A.W.S., Moreira, H.L.M., Cabello, P.H. and Traub-Cseko, Y.M. 2005. Genetic diversity of wild and cultured populations of *Brycon opalinus* (Cuvier, 1819) (Characiforme, Characidae, Bryconinae) using microsatellites. *Aquaculture*, vol. 247, no. 1-4, 51-65p.
- Barthem, R.B.; Petrere Jr. M.; Isaac, V.J.; Ribeiro, M.C.L.B.; McGrath, D.G.; Vieira, I.J.A.; Barco, M.V. 1997. A pesca na Amazônia: problemas e perspectivas para seu manejo. *In: Valladares-Padua, C.; Bodmer, R.E.; Cullen Jr., L. (org.) Manejo e Conservação de vida silvestre no Brasil*. Sociedade Civil Mamirauá. MCT-CNPq, 173-185p.
- Barthem, R.B.; Fabr e, N.N. 2004. Biologia e Diversidade dos Recursos Pesqueiros da Amazônia. *In: A Pesca e os Recursos Pesqueiros na Amazônia Brasileira*. ProVárzea-IBAMA.
- Barthem, R.B.; Goulding, M. 2007. *An unexpected ecosystem: The amazon as revealed by fisheries*, (ACA) Missouri Botanical Garden Press, 241p.
- Batalha, K. 2009. Genética populacional do jaraqui de escama grossa (*Semaprochilodus insignis* – Prochilontidae, Characiformes). Disserta o de Mestrado – UFAM, Manaus, 56p.
- Batista, V.S.; Silva, A.J.L.; Freitas, C.E.C.; Freire-Brasil, D. 1998. Characterization of the fishery in riverine communities in the Low – Solimões/High Amazonas region. *Fisheries Management and Ecology*, 5: 419-435.
- Batista, V. S. 2004. A pesca na Amazônia Central. *In: Ruffino, M.L. (Ed), A pesca e os Recursos Pesqueiros na Amazônia brasileira*. IBAMA/ProVárzea, Manaus, 213-244.

- Batista, J.S., Formiga-Aquino, K., Farias, I.P.; Alves-Gomes, J.A. 2005. Variabilidade genética da dourada e da piramutaba na bacia Amazônica. *In: O Manejo da Pesca dos Grandes Bagres Migradores: Piramutaba e Dourada no Eixo Solimões- Amazonas* (Fabr , N. N. & Barthem, R. B., eds), ProVárzea/Ibama, pp. 15–19.
- 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 (4): 723-740.
- Batista, J.S. 2009. Caracteriza o genética da dourada *Brachyplatystoma rousseauxii*, Castelnau, 1855 (Siluriforme:Pimelodidae) na Amazônia por meio de marcadores moleculares mitocondriais e microssatélites: subsídios para conserva o e manejo. Tese de Doutorado –INPA, Manaus, 148p.
- Beerli, P.; Felsenstein, J. 2001. Maximum likelihood estimation of a migration matrix and effective population sizes in subpopulations by using a coalescent approach. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98, 4563-4568.
- Bello, R.; González, L. de; Grave, Y.1989. Monografia sobre el cultivo de la cachama *Colossoma macropomum* en Venezuela. Hernández, R.A. (ed.), *Cultivo de Colossoma*. Ed. Guadalupe, Bogotá, 145-167p.
- Bezerra, R.S.; Vieira, V.L.A.; Carvalho Jr., L.B.C. 2001. Proteases no trato digestivo de peixe: Tripsina do tambaqui (*Colossoma macropomum*), modelo alternativo para o aproveitamento de sub-produtos na indústria pesqueira. *Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento*, N  22. 46-49p.
- Bohn, M., Utz, H. F., Melchinger, A. E. 1999. Genetic similarities among winter wheat cultivars determined on de basis of the RFLPs, AFLPs and SSRs and their use for predicting progeny variance. *Crop Sci.*, 39, 228-337.
- Boischio, A.M.P. 1992. Produ o pesqueira em Porto Velho, Rondônia (1984-89)- alguns aspectos ecológicos das espécies comercialmente relevantes. *Acta Amazonica*, v.22, 163-172p.
- Britski, H.A. 1977. Sobre o g nero *Colossoma* (Pisces, Characidae). *Ciência e Cultura*, v.29, 810p.
- Brown, W. M.; Prager, E. M.; Wang, A.; Wilson, A.C. 1982. Mitochondrial DNA sequences of primates: Tempo and mode of evolution. *J. Mol. Evol.*, (18) 225-239.
- Brown, W.M.; Gadaleta, G.; Pepe, G.; Saccone, C.; Sbiza, E. 1986. Structural conservation and variation in the D-Loop containing region of vertebrate mitochondrial DNA. *J. Mol. Biol.*, 192: 503-511p.
- Brown, S.M.; Hopkins, M.S.; Mitchell,S.E.; Senior, M.L.; Wang, T.Y.; Ducan, R.R.; Gonzalez-Candelas, F.; Kresovich, S. 1996. Multiple methods for the identification of polymorphic simple sequence repeats (SSRs) in sorghum (*Sorghum bicolor* (L) Moench). *Theoretical and Applied Genetics*, 39: 190-198p.

- Calcagnotto, D.; Toledo-Filho. 2000. Loss of genetic variability at the transferrin locus in five hatchery stocks of tambaqui (*Colossoma macropomum*). *Genetics and Molecular Biology*. (23) 127-130.
- Calcagnotto, D., Russello, M., and DeSalle, R. 2001. Isolation and characterization of microsatellite loci in *Piaractus mesopotamicus* and their applicability in other Serrasalminae fish, *Molecular Ecology*, 1, 245-247.
- Calcagnotto, D., Schaefer, S.A., De Salle, R. 2005. Relationships among Characiform fishes inferred from analysis of nuclear and mitochondrial gene sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 36: 135-153.
- Calcagnotto, D.; De Salle, R. 2009. Population genetic structuring in pacu (*Piaractus mesopotamicus*) across the Paraná-Paraguay basin: evidences from microsatellites. *Neotropical Ichthyology*, 7(4):607-616p.
- Carvalho, M. L 1981. Alimentação do tambaqui jovem (*Colossoma macropomum*, Cuvier,1818) e sua relação com a comunidade zooplanctônica do lago Grande-Manaquiri, Solimões-Am. Dissertação de mestrado, INPA/FUA, 90p.
- Castagnolli, N. 1992. *Criação de Peixe de água doce*. FUNEP: Jaboticabau-SP, 189p.
- Chen, I.S.;Hsu, C.H.; Hui, C.F.; Shao, K.T.; Miller, P.J.; Fang, L.S.1998. Sequence length and variation in the mitochondrial control region of two freshwater gobiid fishes belonging to *Rhinogobius* (Teleostei, Gobiidae). *Journal of Fish Biology*. 53: 179-191.
- Clayton, D.A. 1982. Replication of animal mitochondrial DNA. *Cell*, 28:693-705.
- Clement, M., Posada, D., Crandall, K.A. 2000. TCS: A computer program to estimate gene genealogies. *Molecular Ecology*, 9:1657-1659.
- Corander, J.; Waldmann, P.; Sillanpaa, M.J. 2003. Bayesian analysis of genetic differentiation between populations. *Genetics*, 163: 367-374.
- Corander, J.; Waldmann, P.; Marttinen, P.; Sillanpaa, M.J. 2007. BAPS 2: enhanced possibilities for the analysis of genetic population structure. *Bioinformatics* 20(15).
- D' Assunção, A.A.A.; Santos, M.C.F.; Farias, I.P.; Porto, J.I.R. 2003. Estimativa preliminar do tambaqui (*Colossoma macropomum*) pelo sequenciamento do hormônio de crescimento (GH). *In: A Amazônia na era Genômica e Pós-Genômica. 4º Encontro de Genética do Amazonas – Livro de Resumos*. p 108.
- Danzmann, R.G., Ihssen, P.E., Herbert, P.D.N. 1991. Genetic discrimination of wild and hatchery populations of brook char, *Salvelinus fontinalis* (Mitchill), in Ontario using mitochondrial DNA analysis. *Journal of Fish Biology*, v. 39 (A), p. 69-77.
- De Woody, 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.

- De Woody, J.A., Schupp, J., Kenefic, L., Busch, J., Murfitt, L.; Keim, P. 2004. Universal method for producing ROX-labeled size Standards suitable for automated genotyping. *Biotechniques* 37, 348-352.
- Di Rienzo, A. Peterson, A.C., Garza, J.C., *et al.* 1994. Mutational processes of simple sequence repeat loci human populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91: 3166-3170.
- Drummond, A.J.; Rambaut, A. 2007. BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC Evol. Biol.* 7, 214.
- Dupanloup, I.; Schneide, S.R.; Excoffier, L. 2002. A simulated annealing approach to define the genetic structure of populations. *Molecular Ecology*, 11: 2571-2581.
- Eisen, J.A. 1999. Mechanistic basis for microsatellite instability. *In*: Goldstein, D.B.; Schlotterer, C. (eds.), *Microsatellites: Evolution and Applications*. Oxford University Press. New York. 34-48p.
- Excoffier, L.; Smouse, P. E.; Quattro, J. M. 1992. Analyses of Molecular Variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics*, 131:479-491.
- Excoffier, L.; Laval, G., Schneider, S. 2005. Arlequin ver. 3.11: an integrated software package for population genetics data analysis. *Evol. Bioinform. Online*, 1:47-50.
- Farias, I. P.; Hrbek, T.; Brinkmann, H.; Sampaio, I.; Meyer, A. 2003. Characterization and isolation of DNA microsatellite primers for *Arapaima gigas*, an economically important but severely over-exploited fishes species of the Amazon basin. *Molecular Ecology Notes* 3: 128-130.
- Farias, I. P.; Vasconcelos, W. R.; Nunes, M. S.; Mota, E.; Hrbek, T. 2005. Padrões Genético – Populacionais de peixes da Várzea. *In*: *Biología de las poblaciones de peces de la Amazonía y Piscicultura*. 91 – 95 p.
- Farias, I. P., Torrico, P. J., Garcia-Davila, C., Santos, M. C. F., Hrbek, T., Renno, J. F. 2010. Are rapids a barrier for floodplain fishes of the Amazon basin? A demographic study of the keystone floodplain species *Colossoma macropomum* (Teleostei: Characiformes). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 56:1129-1135.
- Felsenstein, J. 1992. Estimating effective population size from samples of sequences: inefficiency of pairwise and segregating sites as compared to phylogenetic estimators. *Genet. Res., Camb.* 59: 139-147.
- Ferguson, A.; Taggart, J.B.; Prodhol, A. 1995. The application of molecular markers to the study and conservation of fish population with special reference to *Salmo*. *Journal of Fish Biology*, v.47. p. 103-126.
- Ferreira, E.J.G.; Santos, G.; Jegu, M. 1988. Aspectos ecológicos da ictiofauna do rio Mucajaí na area da ilha de Paredão, Roraima, Brasil. *Amazoniana*, 10: 339-352.

- Ferreira, E.J.G. 1993. Composição, distribuição e aspectos ecológicos da ictiofauna de um trecho do rio Trombetas, na área de influência da future UHE Cachoeira Porteira, Estado do Pará, Brasil. *Acta Amazônica*, 23, 1-89p.
- Figueiredo, J.; Hoorn, C.; Van Der Ven, P.; Soares, E. 2009. Late Miocene onset of the Amazon River and the Amazon deep-sea fan: Evidence from the Foz do Amazonas Basin. *Geology*, 37(7) 619-622p.
- Fitzsimmons, N.N.; Moritz, C.; Moore, S.S. 1995. Conservation and dynamics of microsatellite loci over 300 million years of marine turtle evolution. *Molecular Biology and Evolution*, v.12, p. 432-440.
- Frankham, R.; Ballou, J.R.; Briscoe, D.A. 2002. *Introduction to Conservation Genetics*. Cambridge University Press. Cambridge, England. 617p.
- Frankham, R. 2003. *Genetics and Conservation Biology*. Comptes Rendes Biologies, 326:S23-S29.
- Frankham, R.; Ballou, J.R.; Briscoe, D.A. 2008. *Fundamentos de Genética da Conservação*. SBG-Sociedade Brasileira de Genética, 280p.
- Freitas, J.W.F. e Gurgel, J.J.S.1985. Estudo de alguns parâmetros biométricos e da composição química do tambaqui (*Colossoma macropomum*, Cuvier, 1818) e da pirapitinga (*Colossoma brachypomum* Cuvier, 1818) criados em cativeiro. *Boletim Técnico do DNOCS*, v.43, p. 47-66
- Freitas, C. E. C.; Rivas, A. A. F. 2006. A pesca e os recursos pesqueiros na Amazônia ocidental. *Ciên. Cult.*, São Paulo, v.58, n.3.
- Fu, Y-X. 1997. Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics* 1447:915 925.
- Gaggiotti, O.E.; Lange, O.; Rassmann, K.; Gliddon, C. 1999. A comparison of two indirect methods for estimating average levels of gene flow using microsatellite data. *Molecular Ecology*, v.8, 1513-1520.
- Galletti, E.S. 2009. Distribuição da variabilidade genética da pescada *Plagioscion squamosissimus* (HEKEL, 1840) na calha do rio Amazonas. Dissertação de Mestrado-INPA, Manaus, 67p.
- García-Parra, W.J. 2000. Citogenética comparativa de peixes da subfamília Myleinae (Serrasalminidae, Characiformes) da Amazônia Central. Tese de Doutorado, INPA.156
- Garrigan, D., Marsh, P. C.; Dowling, T. E. 2002. Long-term effective population size of three endangered Colorado River fishes. *Animal Conservation* 5, 95–102.
- Garza, J.C.; Williamson, E.G. 2001. Detection of reduction in population size using data from microsatellite loci. *Molecular Ecology*, 10: 305-318.

- Gauldie, R.W. 1991. Taking stock of genetic concepts in fisheries management. *Can J Fish Aquat Sci.* 48:722-731.
- Gery, J. 1972. Poissons characoides dês Guyanes. I. Généralités. II. Famille des Serrasalmidæ. *Zool. Verhandl.* 122: 1-266.
- Gery, J. 1977. *Characoids of the world*. THF Publications, Neptune City, 672p.
- Gery, J.1984. The fishes of Amazonia. In: Sioli, H. (ed.). *The Amazon: Limnology and Lanscape ecology of a mighty tropical river and its basin*. Dr. W. Junk Publishers. 333- 370p.
- Goldstein, D.B.; Schlotterer, C. 1999. *Microsatellites: evolution and applications*, Oxford University Press, New York, NY. 352p.
- Goulding, M.1979. *Ecologia de pesca do rio Madeira*. CNPq/INPA, Manaus, 172p.
- Goulding, M. 1980. *The Fishes and the Forest: Explorations in Amazon Natural History*. University of California Press, Berkeley. 280p.
- Goulding, M.; Carvalho, M.L.1982. Life history and management of the tambaqui (*Colossoma macropomum*, Characidae): na important amazonian food fish. *Revista Brasileira de Zoologia.* 1(2): 107-133.
- Goulding, M., Barthem, R., Ferreira, E. 2003. *The Smithsonian Atlas of the Amazon*. *Smithsonian Books*. Washington and London. 253p.
- Greenwood, P.H.; Rosen, D.E.; Wetzman, S.H.; Myers, G.S. 1966. Phyletic studies of teleostean fishes, with a provisional classification of living forms. *Bull. Am. Mus. Nat. Hist.*, 131: 33-455p.
- Griffiths, A.J.F.; Gelbart, W.M.; Miller, J.H.; Lewontin, R.C. 2001. *Genética Moderna*. Editora Guanabara Koogan S.A. 515p.
- Gunther, N.J.; Boza, A.J. 1993. Growth performace of *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818) juveniles at different feed rations. *Aquaculture and Fisheries Management*, v. 23, p. 81-93.
- Haavie, J.; Saetre, G.P.; Moum, T. 2000. Discrepancies in population differentiation at microsatellites, mitochondrial DNA and plumage colour in the pied flycatcher – inferring evolutionary processes. *Molecular Ecology.* 9:1137-1148.
- Haffer, J. 1969. Speciation in Amazonian forest birds. *Science*, 165: 131-166.
- Hall, T.A. 1999 .BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.* 41:95-98.
- Hanfling, B.; Brandl, R. 1998. Genetic variability population size and isolation of distinct populations in the freshwater fish *Cottus gobio* L. *Mol. Ecol.* 7 (12) 1625-1632p.

- Harpending, H.C. 1994. Signature of ancient population growth in a low-resolution mitochondrial DNA mismatch distribution. *Hum. Biol.* 66: 591-600.
- Hartl, D.L.; Clarck, A.G. 1997. *Principles of population genetics*. 3^o Ed. Sinauer Associates, Inc. Publishers Sunderland, Massachusetts, 542p.
- Hartl, D. L., Clark, A. G. 2007. *Principles of Population Genetics*. 4^o Ed. Sinauer Associates, Inc. Publisher. Suderland, Massachusetts. 652p.
- Hasegawa, M. Kishino, H., Yano, T. 1985. Dating of the human-ape splitting by a molecular clock of mitochondrial DNA. *Journal of Molecular Evolution*, 22:160-174.
- Hatanaka, T., Henrique-Silva, F.; Galetti Jr., P.M. 2006. Population structuring in a migratory freshwater fish *Prochilodus argenteus* (Characiformes, Prochilodontidae) from São Francisco River. *Genetica*, vol. 126, no. 1-2, p. 153-159.
- Hayashi, J.L.; Tagashira, Y.; Yoshida, M.C. 1985. Absence of extensive recombination between inter and intraespecies mitochondrial DNA in mammalian cells. *Exp. Cell. Res.* 160:387-395.
- Hedrick, P.W.; Brussard, P.F.; Allendorf, F.W.; Beardmore, J.A.; Orzacks, S. 1986. Protein variation, fitness and captive propagation. *Zoo Biology*, v.5, 91-99p.
- Hedrick, P. W. 2004. Recent Developments in Conservation Genetics. *Forest Ecology and Management*. 197: 3–19.
- Heredia, B.; González, J. 1990. Ganancia compensatória en *Colossoma macropomum*, (Cuvier, 1818). *Red. Acuic. Biol.*, v.4,n.3, 5-7p.
- Hey, J.; Nielsen, R. 2007. Integration with the Felsenstein equation for improved Markov chain Monte Carlo methods in population genetics. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104, 2785-2790.
- Hillis, D.M.; Mortiz, C.; Mable, B.K. 1996. *Molecular Systematics*. Sinauer Associates, Inc. E.U.A.
- Hooghiemstra, H.; Ran, E.T.H.; 1994. Late Pliocene-Pleistocene high resolution pollen sequence of Colombia: an overview of climate change. *Quatern. Int.* 21, 63-80.
- Hoorn, C. 1993. Marine incursions and the influence of tectonics on the Miocene depositional history of North Amazônia: results of a palynostratigraphic study. *Palaeoclim. Palaeoecol.*, 105: 267-309.
- Hoorn, C. 1994. An environmental reconstruction of the palaeo-Amazon River system (middle to the Miocene, NW Amazonia): *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*, v. 112, p. 187-238.
- Hoorn, C.; Guerrero, J.; Sarmiento, G.A.; Lorenti, M.A. 1995. Andean tectonics as a cause for changing drainage patterns in Miocene northern South America. *Geology*, 23:237-240.

- Hrbek, T., Farias, I. P., Crossa, M. Sampaio, I.; Porto, J. I. R.; Meyer, A. 2005. Population Genetic Analysis of *Arapaima gigas*, on of the Largest Freshwater Fishes of the Amazon Basin: Implication for its Conservation. *Animal Conservation* 8, 297-308.
- Hrbek, T., Crossa, M., Farias, I. P. 2007. Conservation Strategies for *Arapaima gigas* (Schinz, 1822) and the Amazonian várzea ecosystem. *Braz. J. Biol.*, 67(4, Suppl.): 909-917.
- Hrbek, T.; Farias, I. P. 2008. The complete mitochondrial genome of the pirarucu (*Arapaima gigas*, Arapaimidae, Osteoglossiformes). *Genetics and Molecular Biology*, 31, 1(suppl), 293-320.
- Hubert, N.; Renno, J.F. 2006. Historical biogeography of South American freshwater fishes. *J. Biogeogr.* 33, 1414-1436.
- Huergo, G.M. 2009. Estimativa da diversidade genética da piraíba (*Brachyplatystoma filamentosum* Lichtenstein, 1919) e da piraíba negra (*B. capapretum* Lundberg e Akama, 2005) na Amazônia brasileira, inferidas através de DNA mitocondrial: subsídios para manejo e conservação. Tese de Doutorado, INPA, Manaus, 114p.
- IBAMA, 2004. *Estatística da Pesca 2003 – Brasil- Grandes Regiões e Unidades de Federação*. Brasília, 98p.
- Irion, G.; Junk, W.J. de Mello, J.A.S.N. 1997. The large central Amazonian river floodplains near Manaus geological, climatological, hydrological and geomorphological aspects. In: Junk, W.J. (Ed.). *The Central-Amazonian Floodplain: Ecology of a Pulsing System*. Ecological Studies vol.126, Springer Verlag, Berlin Heidelberg New York, p. 23-46.
- Isaac, V.J.; Ruffino, M.L.1996. Population dynamics of tambaqui *Colossoma macropomum* Cuvier, 1818, in the Lower Amazon, Brazil. *Fisheries Management and Ecology*, v.3, 315-333.
- Isaac, V.J.; Ruffino, M.L. 2000. Biologia pesqueira do tambaqui, *Colossoma macropomum*, no Baixo Amazonas. In: *Recursos Pesqueiros do médio Amazonas: biologia e estatística pesqueira*. Brasília: Edições IBAMA, Coleção meio ambiente, Série Estudos Pesca, 22p, 65-88.
- Jégu, M.; Santos, G.M. 1987. Sur la présence de *Serrasalmus altuvei* Ramírez, 1965 (Pisces, Serrasalmidae) dans le bas Rio Negro, Amazonas, Brésil. *Cybium*,11: 47-54.
- Jégu, M.; Santos, G. M. 1988. Une nouvelle espèce du genre *Mylesinus* (Pises, Serrasalmidae), *M. Paucisquamatus*, décrite du bassin du rio Tocantins (Amazonie, Brésil). *Cybium*, 12(4): 331-341.
- Jégu, M.; Leão, E.L.M.; Santos, G.M.1991. *Serrasalmus compresus*, une espèce nouvelle du rio Madeira, Amazonie (Pisces: Serrasalmidae). *Ichthyol. Explor. Fresh Waters*, 2(2): 97-108.

- Johnson, J.B. 2001. Hierarchical organization of genetic variation in the Costa Rican livebearing fish *Brachyrhaphis rhabdophora* (Poeciliidae). *Biological Journal of the Linnean Society*. 72(4): 519-527.
- Jorgensen, H.B.H., Hansen, M.M., Bekkevold, D., Ruzzante, D.E.; Loeschcke, V., 2005. Marine landscape and population genetic structure of herring (*Clupea harengus* L.) in the Baltic Sea. *Mol. Ecol.*, vol. 14, no. 10, p. 3219-3234.
- Junk, W.J. 1985. The Amazon floodplain – a sink or source for organic carbon. *Mitt. Geol. Palaont. Inst. Univ. Hamburg, SCOPE/UNEP Sonderb*, v.58, p.267-283.
- Junk, W.J., 1989. Flood tolerance and tree distribution in central Amazonian floodplains. *In: Holm-Nielsen, L.B.;Nielsen, I.C.; Balslev, H. (Ed.). Ecosystems of the world: mires, swamp, bog, fen and moor. 3 regional studies*, Elsevier Amsterdam, 269-294.
- Junk, W.J., 1997. General aspects of floodplain ecology with special reference to Amazonian floodplain. *In: Junk, W.J. (Ed.). The Central-Amazonian Floodplain: Ecology of a Pulsing System*. Ecological Studies vol.126, Springer Verlag, Berlin Heidelberg New York, p. 3-22.
- Kenchington, E. 2006. The effects of fishing on species and genetic diversity *In: Sinclair, M. & Valdimarson, G. (Ed). Responsible fisheries in the marine ecosystem*. CAB International. Cap. 14.
- Kimura, M.; Crow, J.F. 1964. The number of alleles that can be maintained in a finite population. *Genetics*, v.49, 725-738p.
- Kochhann, D. 2010. Exposição do tambaqui ao petróleo: marcadores fisiológicos, bioquímicos e comportamentais. Dissertação (mestrado)- INPA, Manaus. 64 p.
- Kossowski, C.; Brancamonte, N.O.; Velasco, J.Q. 1983. Cariotipo del híbrido de *Colossoma macropomum* (Hembra)(Cuvier) 1818 X *Mylossoma duriventris* (Macho)(Cuvier) 1818 y sus progenitors (Pisces, Cypriniformes, Characidae). *Acta Cient. Venez.*, 34:173-175.
- Kubitzki, K.; Ziburski, A. 1994. Seed dispersal in floodplain forest of Amazonia. *Biotropica*, v.26, p30-43.
- Kumar, S.; Tamura, K.; Nei, M. 2004. MEGA 3: integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. *Briefings in Bioinformatics*, 5, 150-163.
- Lanoue, J.; Choubert, G. 1993. Digestibility in rainbow trout: comparison of the direct and indirect methods of measurement. *Progressive Fish Culturist*, v.48:190-195.
- Lasman, R.A.; Shade, R.O.; Shapira, J.F.; Avise, J.C. 1981. The use of restriction endonucleases to measure mitochondrial DNA sequence relatedness in natural populations. *J. Mol. Evol.*, 17:214-226.

- Leão, A.S.A. 2009. Análise da variabilidade genética das populações de pirarucu (*Arapaima gigas*, SCHINZ 1822) dos principais tributários do rio Amazonas através do uso de marcadores microssatélites. Dissertação Mestrado-INPA, Manaus, 71p.
- Lee, W.J.; Conroy, J.; Howell, W.H.; Kocher, T.D. 1995. Structure and evolution of Teleost mitochondrial control regions. *J. Mol. Evol.* 41:54-66.
- Lee, W.J.; Koecher, T.D. 1996. Microsatellite DNA markers for genetic mapping in the tilapia, *Oreochromis niloticus*, *J. Fish Biology* 49: 169-171.
- Ledru, M.P.; Braga, P.I.S.; Soubies, F.; Fournier, M.; Martin, L.; Suguio, K.; Turcq, B. 1996. The last 50000 years in the Neotropics (Southern Brazil): evolution of vegetation and climate. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*, 123: 239–257.
- Leitão, M.A.B. 1998. Estudo comparativo da estrutura genética de populações naturais e artificiais de tambaqui *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818): Sistemas isozímicos. Dissertação de mestrado, INPA-FUA, Manaus.
- Li, W.H. 1997. *Molecular Evolution*. Sinauer Associates, Sunderland Massachusetts, 487p.
- Librado, P.; Rozas, J. 2009. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25: 1451-1452.
- Lima, A. C.; Araújo-Lima, C. 2004. The distributions of larval and juvenile fishes in Amazonian rivers of different nutrient status. *Freshwater Biology* 49, 787–800.
- Loubens, G.; Panfili, J. 1997. Biologie de *Colossoma macropomum* (Teleostei: Serrasalminidae) dans le bassin du Mamore (Amazonie bolivienne). *Ichthyological Explorations of Freshwaters* 8, 1–22.
- Lowe-McConnell, R.H., 1987. *Ecological studies in tropical fish communities*. New York, USA: Cambridge University Press.
- Lucena, C.A.S. 1993. Estudo filogenético da família Characidae com uma discussão dos grupos naturais propostos (Teleostei, Ostariophysi, Characiformes). Tese de Doutorado. Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, 158pp.
- Lundberg, J. G. ; Machado-Alisson, A.; Kay, R.F. 1986. Miocene characid fishes from Colombia: Evolutionary stasis and extirpation. *Science*, 234: 208-209.
- Lundberg, J.G. 1993. African-South American freshwater fish clades and continental drift: problems with a paradigm. In: *Biological Relationships between Africa and South America* (Ed. Golblatt P), Yale University Press, New Haven, 156-199.
- Lundberg, J.G. 1998. The temporal context for the diversification of Neotropical fishes. In: Malabarba LR, Reis RE, Vari RP, Lucena ZMS, Lucena CAS. *Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes*. Porto Alegre: EDIPUCRS, p49-68.

- Lundberg, J.G.; Marshall, L.G.; Guerrero, J.; Horton, B.; Malabarba, M.C.S.L.; Wesselingh, F.P. 1998. The Stage for Neotropical Fish Diversification: A History of Tropical South American Rivers. *In: Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes*. (eds. Malabarba, R. L., Reis, R. E., Vari, R. P., Lucena, Z. M. S., Lucena, C. A. S.). Edipurcs, Porto Alegre. 13-68p.
- Machado-Allison, A. 1982. Estudios sobre la subfamilia Serrasalminae (Teleostei, Characidae). Parte I. Estudio comparado de los juveniles de las cachamas de Venezuela. *Acta Biologica Venezuelica*, v.11, 1-101p.
- Machado, V.N. 2009. Análise da variabilidade genética da curimatã *Prochilodus nigricans* (Agassiz, 1829) na calha do rio Amazonas e seus principais tributários. Dissertação de Mestrado UFAM, Manaus, 72p.
- Mantel, N. 1967. The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Res.* 27: 209-220.
- Merona, B.; Bittencourt, M. M. 1988. A pesca na Amazônia através dos desembarques no mercado de Manaus: Resultados preliminares. *Soc. Cienc. Nat. La Salle*, n.48, p433-453.
- Meyer, A.; Kocher, T.D.; Basasibwaki, P.; Wilson, A.C.1990. Monophylrtic origin of lake Victoria cichlid fishes suggested by mitochondrial DNA sequences. *Nature.* 347: 550-553.
- Meyer, A. 1993. Evolution of mitochondrial DNA in fishes. *Biochemistry and molecular biology of fishes.* (2): 1-38.
- Michalakis, Y.; Excoffier, L. 1996. A generic estimation of population subdivisión using distances between alleles with special reference for microsatellite loci. *Genetics*, v. 142, 1061-1064p.
- Miyata, T.; Yasunaga, T. 1978. Evolution of overlapping genes. *Nature* 272: 532-535.
- Moore, S.S.; Sargeant, L.L.; King, T.J.; Mattick, J.S.; Georges, M.; Hetzel, G.J. 1991. The conservation of dinucleotide microsatellites among mammalian genomes allows the use of heterologous PCR primer pairs in closely related species. *Genomics*, 10: 654-660.
- Moreira, J.A.S. 1997. Nutrientes, energia e digestibilidade aparente de frutos e sementes consumidos pelo tambaqui (*Colossoma macropomum* Cuvier, 1818) nas florestas inundáveis da Amazônia Central. Tese de Doutorado, INPA/FUA. 148p. Manaus-Am.
- Muir, J.F.; Roberts, R.J. 1993. *Recent advances in aquaculture IV*. Blackwell Scientific Publications. London, 340p.
- Nei, M. 1987. *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia University Press, New York, NY, USA. 512p.
- Nei, M.; Li, W.H. 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 76: 5269 5273.

- Nores, M. 1999. An alternative hypothesis for the origin of Amazonian bird diversity. *J. Biogeogr.* 26, 475-485.
- Norris, A.T., Bradley, D.G., Cunningham, E.P. 2000. Parentage and relatedness determination in farmed Atlantic salmon (*Salmo salar*) using microsatellite markers. *Aquaculture*, 182:72-83.
- Novoa, D.R.; Ramos, F.; Cartaya, E. 1984. Las pesquerías artesanales del río Orinoco sector Caicara-Cabruta. Parte I. *Memoria de Ciencias Naturales La Salle XLIV* : 163-215.
- Novoa, D.R. 1990. El río Orinoco y sus pesquerías: Estado actual, perspectivas y las investigaciones necesarias. In: Wiibezahn, F.; Alvarez, H.; Lewis Jr. (Eds.) *El Río Orinoco como Ecosistema*. Universidad Simón Bolívar, Fondo Editorial Acta Científica Venezolana, EDELCA, CAVN, 430p.
- Ortí, G., Sivasundar, A., Dietz, K.; Jégu, M. 2008. Phylogeny of the Serrasalminae (Characiformes) based on mitochondrial DNA sequences. *Genetics and Molecular Biology*, 31, 343-351.
- Ovenden, J.R. 1990. Mitochondrial DNA and marine stock assessment: a review. *Australian Journal of Marine and Freshwater Research*, v. 41, p. 835-853.
- Peakall, R.; Smouse P.E. 2006. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes*, 6: 288-295.
- Pearse, D.E., Arndt, A.D., Valenzuela, N., Miller, B.A., Cantarelli, V.; Sites, J. W. 2006. Estimating population structure under nonequilibrium conditions in a conservation context: continent-wide population genetics of the giant Amazon river turtle, *Podocnemis expansa* (Chelonia; Podocnemididae). *Molecular Ecology* 15, 985-1006.
- Perler, F.; Efstratiadis, A.; Lomedico, P.; Gilbert, W.; Kolodner, R.; Dodgson, J. 1980. The evolution of gene: the chicken preproinsulin gene. *Cell*. 20: 555-556.
- Peterson, A.T.; Nyári, A. 2007. Ecological niche conservatism and Pleistocene refugia in the thrush-like mourner, *Schiffornis* sp., in the Neotropics. *Evolution*, 62: 173-183.
- Petrere Jr., M. 1983. Yield per recruit of the tambaqui, *Colossoma macropomum*, Cuvier 1818, in the Amazonas State, Brazil. *Journal of Fish Biology*. 22: 133-144.
- Piorski, N.M.; Sanches, A.; Carvalho-Costa, L.F.; Hatanaka, T.; Carrillo-Avila, M.; Freitas, P.D.; Galetti Jr., P.M. 2008. Contribution of conservation genetics in assessing neotropical freshwater fish biodiversity. *Braz. J. Biol.*, 68 (4, Suppl.):1039-1050.
- Posada, D. Crandall, K.A., 1998. MODELTEST: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics* 14, 817-818.

- Posada, D. 2004. Collapse ver. 1.2. A tool for collapsing sequences to haplotypes. (<http://darwin.uvigo.es>). Acesso 20/04/2010.
- Poulsen, N.A.; Nielsen, E.E.; Schierup, M.H.; Loeschcke, V. E.; Gronkjaer, P. 2006. Long-term stability and effective population size in North sea and Baltic Sea cod (*Gadus morhua*). *Molecular Ecology* 15, 321-331.
- Povh, J.; Pereira, R.; Nadez, R.; Jr Streit, D.; Marques, H., Siewerdt, F., Lopera-Barrero, N.; Mangolin, C.; Vargas, L. 2010. Microsatellite Analysis of the Parental Contribution of *Piaractus mesopotamicus* to the Production of Offspring in the Semi-natural System of Reproduction. Brazilian archives of biology and technology, an international journal. March-April, 53, 389-396.
- Pritchard, J. K.; Stephens, M.; Donnelly, P. 2000. Inference of Population Structure Using Multilocus Genotype Data. *Genetics*, 155: 945–959.
- Ray, D.A.; Densmore, D.L. 2003. Repetitive Sequences in the Crocodylian Mitochondrial control region : Poly-A sequences and heteroplasmic tandem repeats. *Mol. Bio. Evol.* 20 (6) 1006-1013.
- Reeves, R.G.; Bermingham, E. 2006. Colonization, population expansion, and lineage turnover: phylogeography of Mesoamerican Characiform fish. *Boil. J. Linn. Soc.*, v. 88, 2: 235-255p.
- Reis, R. E., Kullander, S. O.; Ferraris, Jr. 2003. *Check list of the freshwater of the south and central américa*. Porto Alegre, EDIPUCRS. 729 pp.
- Reinert. T.R.; Winter, K.A. 2002. Sustainability of Harvested Pacú (*Colossoma macropomum*) populations in the Northeastern Bolivian Amazon. *Conservation Biology*, v. 16, N° 5, 1344-1351p.
- Rice, W. R. (1989). Analyzing tables of statistical tests. *Evolution* 43, 223–225.
- Richter, C.; Park, J.W.; Ames, N.B. 1988. Normal oxidative damage to mitochondrial and nuclear DNA is extensive. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 6465-6467.
- Ridley, M. 2006. *Evolução*. 3º Ed. Artmed- Porto Alegre, 752p.
- Rodrigues, R.; Schneider, H.; Santos, S.; Vallinoto, M.; Saint-Paul, V.; Sampaio, I. 2008. Low levels of genetic diversity depicted from mitochondrial DNA sequences in a heavily exploited marine fish (*Cynoscion acoupa*, Sciaenidae) from the Northern coast of Brazil. *Genetics and Molecular Biology*. 31(2) 487-492.
- Rodrigues, F.C. 2009. Estimativa da variabilidade genética da piramutaba (*Brachyplatystoma vaillantii*) por meio de marcadores moleculares microssatélites e *D-loop* de quatro localidades da Amazônia: diferenças entre calha e tributários. Dissertação de Mestrado, INPA, Manaus, 96p.
- Roger, A.R.; Harpending, H. 1992. Population Growth Makes Waves in the Distribution of Pairwise genetic differences. *Mol. Biol. Evol.* 9:552-569.

- Rossetti, D.F.; Toledo, M.P.; Moraes, H.M.; Santos, A.E.A. 2004. Reconstructing habitats in Central Amazonia using megafauna, sedimentology, radiocarbon and isotope analysis. *Quaternary Research*, vol. 61, 289-300p.
- Ruffino, M.L.; Isaac, V.J. 1994. The fisheries of the Lower Amazon: Questions of management and development. *Acta Biologica Venezuelana*, 15:37-46.
- Ruffino, M.L.; Silva, E.C.S., da Silva, C.O., Barthem, R.B., da Silva, V.B., Estupinan, G., Pinto, W. 2006. Estatística Pesqueira do Amazonas e Pará – 2003. Manaus-IBAMA/Provárzea, 76p.
- Saint-Paul, U. 1983. Investigation on the respiration of the neotropical fish, *Colossoma macropomum* (Serrasalminidae). The influence of weight and temperature on the routine oxygen consumption. *Amazoniana* VII(4): 433-443p.
- Saint-Paul U. 1984. Physiological adaptation to hypoxia of a neotropical characoid fish *Colossoma macropomum*, Serrasalminidae. *Environ. Biol. Fishes* 11:53–62.
- Saint-Paul, U. 1989. Hypoxia tolerance of neotropical fish culture candidates. In: De Pauw, N. *et al.* (Eds). *Aquaculture: a biotechnology in progress*. Bredene: European Aquaculture Society, p.907-912.
- Saint-Paul, V. 1990. Aquaculture in Latin America-Bibliography. *European Aquaculture Society*, Special Publication. 13: 434p.
- Sambrook, J.; Fritsch, E. F.; Maniatis, T. 1989. Molecular Cloning. *A Laboratory Manual*. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, NY.
- Sanches, A.; Galetti Jr., P.M., 2007. Genetic evidence of population structuring in the neotropical freshwater fish *Brycon hilarii* (Valenciennes, 1850). *Braz. J. Biol.*, vol. 67, no. 4, 889-895p.
- Santos, G.M.; Ferreira, E.J.G.; Zuanon, J.A.S. 2006. *Peixes comerciais de Manaus*. IBAMA, Manaus. 144p.
- Santos, M.C.F.; Ruffino, M.L.; Farias, I.P. 2007. High levels of genetic variability and panmixia of the tambaqui *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1816) in the main channel of the Amazon River. *Journal of Fish Biology* 71 (Supplement A), 33–44.
- Santos, M.C.F.; Hrbek, T.; Farias, I.P. 2009. Microsatellite markers for the tambaqui (*Colossoma macropomum*, Serrasalminidae, Characiformes), an economically important keystone species of the Amazon River floodplain. *Molecular Ecology Resources*, 9: 874-876.
- Schlotterer, C. 2000. Evolutionary dynamics of microsatellite DNA. *Chromosoma*, 109: 365-371.
- Schneider, S.; Excoffier, L. 1999. Estimation of Past Demographic Parameters from the Distribution of Pairwise Differences When the Mutation Rates Vary Among Sites: Application to Human Mitochondrial DNA. *Genetics*, 152: 1079-1089.

- Schuelke, M. 2000. An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. *Nature Biotech.*, 18: 233-234.
- Slatkin, M; Hudson, R.R. 1991. Pairwise Comparisons of Mitochondrial DNA sequences in Stable and Exponentially Growing Populations. *Genetics*, 129: 555-562.
- Slatkin, M. 1995. A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies. *Genetics*, v.139, 457-462p.
- Siddall, M.; Rohling, E.J.; Almogi-Labin, A.; Hemleben, C.; Meischner, D.; Schmelzer, I.; Smeed, D.A. 2003. Sea-level fluctuations during the last glacial cycle. *Nature*, 423, 853-858.
- Silva, A.B.; Fernandes, J.A.; Carneiro Sobrinho, A. 1975. Testes preliminares em viveiros com tambaqui, *Colossoma bidens*. Ser. Est. Pesca SUDENE, n.3, pt. I.
- Silva, T.J. 2009. Marcadores moleculares para análise da variabilidade genética de populações do aruanã (*Osteoglossum bicirrhosum*). Tese de Doutorado – UFAM, Manaus, 91p.
- Sioli, H. 1975. *Limnology and landscape evolution of a mighty tropical river and its basin*. Dr. W, Junk Publ., Dordrecht.
- Sivasundar, A.; Bermingham, E.; Ortí, G. 2001. Population Structure and Biogeography of Migratory Freshwater Fishes (*Prochilodus*: Characiformes) in Major South American Rives. *Molecular Ecology*. 10, 407-417.
- Skaala, O.; Hoyheim, B.; Glover K.; Dahle, G. 2004. Microsatellite Analysis in Domesticated and Wild Atlantic Salmon (*Salmo salar* L.): Allelic Diversity and Identification of Individuals. *Aquaculture*. 240 131-143.
- Soares, M.G.M.; Costa, E.L.; Siqueira-Souza, F.K.; Anjos, H.D.B.; Yamamoto, K.C.; Freitas, C.E.C. 2008. *Peixes de lagos do Médio rio Solimões*. 2^o ed. Manaus: Instituto I-PIATAM, 176p.
- Sousa, A.R.B. 2009. Análise transcriptômica de etiquetas de sequências expressas da hipófise e parte do cérebro do tambaqui (*Colossoma macropomum*) e expressão do hormônio de crescimento em *Pichia pastoris*. Tese de Doutorado. INPA/UFAM, 77p.
- Suganuma, C.H. 2008. Avaliação da diversidade genética do pacu (*Piaractus mesopotamicus* HOLMBERG, 1887) do Pantanal Matogrossense com o uso dos marcadores moleculares do tipo Microsatélite. Tese de Doutorado-UNESP, Jaboticabal, 105p.
- Tajima, F. 1989. Statistical methods for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics*, 123:585-595.

- Tautz, D.; Schlotterer, C. 1994. Simple sequences. *Current Opinion in Genetics & Development*, 4:832-837.
- Teixeira, A.S.; Jamieson, A. 1985. Genetic variation in plasma transferrinas of tambaqui, *Colossoma macropomum* (Cuvier 1818). *Amazoniana*. V. IX(2) 159-168.
- Thomé-Souza, M.J.F.; Raseira, M.B. Ruffino, M.L. da Silva, C.O.; Batista, V.S.; Barthem, R.B.; Amaral, E.S.R. 2007. Estatística Pesqueira do Amazonas e Pará – 2004. IBAMA/Provárzea, Manaus, 73p.
- Thompson, J.D.; Higgins, D.G.; Gibson, T.J. 1994. CLUSTALW: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position – specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids. Res.* 22:4673-680.
- Toffoli, D. 2007. História evolutiva de espécies do gênero *Potamotrygon* Garman, 1877 (Potamotrygonidae) na Bacia Amazônica. Dissertação de Mestrado. INPA, 114 p.
- Val, A.L.; Almeida-Val, V.M.F. 1995. Fishes of the Amazon and their environment: physiological and biochemical features. Springer-Verlag, Berlin, p. 224.
- Val, A.L.; Honczaryk, A. 1995. *Criando peixes na Amazônia*. Manaus: Editora do INPA. 160p.
- 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*, v. (4) 535-538p.
- Vieira, E.F., Isaac, V.J., Fabr e, N.N. 1999. Biologia Reprodutiva do tambaqui, *Colossoma macropomum*. Cuvier, 1818 (Teleostei, Serrasalmidae): no Baixo Amazonas, Brasil. *Acta Amazônica* 29 (4): 625-638.
- Wasko, AP.; Galetti Jr., P.M. 2002. RAPD analysis in the Neotropical fish *Brycon lundii*: genetic diversity and its implications for the conservation of the species. *Hydrobiologia*, vol. 474, no. 1-2, 131-137p.
- Weber, J.L. 1990. Informativeness of human (dC-dA)_n.(dG-dT)_n polymorphisms. *Genomics*, v.7, 524-530.
- Wegmann, D.; Currat, M.; Excoffier, L. 2006. Molecular Diversity After a Range Expansion in Heterogeneous Environments. *Genetics*, 174: 11.
- Weir, B.S.; Cockerham, C.C. 1984. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution*, 38:1358-1370.
- Wooton, R.J.1992. Constraints in the evolution of life histories. *Netherlands Journal of Zoology*, 42: 291-303.
- Woynarovich, E. 1985. *Manual de Piscicultura*. Brasilia: CODEVASF, 71p.
- Wright, S. 1951. The genetical structure of populations. *Annals of Eugenics*, 15: 323-354.

- Wright, S. 1978. *Evolution and the Genetics of Populations*. University of Chicago Press. Chicago.
- Yu, Y.; Nie, L.; He, Z.Q.; Wen, J. K.; Jian, C.S.; Zhang, Y.P. 1999. Mitochondrial DNA variation in cattle of South China: Origin and introgression. *Animal Genetics*, 30: 245-250.
- Yue, G., Li, Y., Chen, F., Cho, S., Lim, L.C.; Orban, L. 2002. Comparison of three DNA marker systems for assessing genetic diversity in Asian arowana (*Scleropages formosus*). *Electrophoresis*, 23, 1025-1032.
- Xia, X. 1996. Maximizing transcription efficiency causes codon usage bias. *Genetics* 144: 1309-1320.

ANEXO

Microsatellite markers for the tambaqui (*Colossoma macropomum*, Serrasalminae, Characiformes), an economically important keystone species of the Amazon River floodplain

MARIA DA CONCEIÇÃO F. SANTOS,* TOMAS HRBEK*† and IZENI P. FARIAS*

*Laboratório de Evolução e Genética Animal, Departamento de Biologia, Universidade Federal do Amazonas, Av. Rodrigo Octávio Jordão Ramos, 3000, 69077-000, Manaus, AM, Brazil, †Biology Department, University of Puerto Rico – Rio Piedras, San Juan, PR 00931, Puerto Rico

Abstract

Colossoma macropomum is a keystone species of the Amazon floodplain, and is an important but severely overexploited commercial species. To provide tools for addressing ecological and conservation questions, we developed 14 highly polymorphic microsatellite markers that had between four and 21 alleles per locus in the 25 tested individuals. With the exception of comparisons involving the locus Cm1F5 that also showed heterozygosity deficiency, no pairs of loci were at linkage disequilibrium. Many of the microsatellite loci were also variable in three other serrasalminid species which span the phylogenetic depth of the Serrasalminidae.

Keywords: *Colossoma macropomum*, microsatellites, piranha, serrasalminids, tambaqui

Received 3 May 2008; revision accepted 24 June 2008

Introduction

The frugivorous *Colossoma macropomum* (tambaqui) is a keystone species of the Amazonian floodplain in its role as a major disperser of seeds of floodplain trees and shrubs (Goulding 1980). Ecological data indicate it to be a semi-migratory fish (Araújo-Lima & Ruffino 2004), and molecular data suggest it forms a panmictic population in the main channel of the Amazon Basin (Santos *et al.* 2007). *C. macropomum* has also traditionally been a cornerstone of artisanal and commercial fishery of the Amazonian floodplain. However, in the last 30 years, fisheries stocks have declined by over 90% and landed fish have become significantly smaller (IBAMA 2005). Its precipitous decline, its commercial importance and its adaptability to captivity have spurred aquaculture efforts.

The importance of *C. macropomum* to the Amazonian ecosystem and to mankind brings to the forefront the necessity of development of efficient molecular markers that can be used to generate data that will answer basic ecological questions and aid in the sustainable management and long-term conservation of this species. Furthermore, suitable molecular markers may be used in marker-

assisted selection studies in the process of domestication and establishment of favourable aquaculture traits. With these goals in mind, we developed a panel of 14 highly polymorphic microsatellite loci.

The total genomic DNA was extracted from white muscular tissue according to Sambrook *et al.* (1989). To enrich for microsatellite repeats in the genomic DNA, we followed the protocol of Tenzer *et al.* (1999) as modified by Farias *et al.* (2003). We digested whole genomic DNA with the restriction enzyme *Mbo*I (Fermentas). Restricted DNA was sized using agarose gel electrophoresis, and fragments between 300 bp and 1000 bp were selected, purified, linked to oligonucleotide adapters, and subsequently hybridized with a CT₁₀ probe linked to a DynaBead (Invitrogen) via a biotin–streptavidin bond. The hybridized products containing fragments potentially rich in microsatellites were ligated into a pJET plasmid (Fermentas) and transformed into chemically competent *Escherichia coli* cells (Promega). The transformed cells were grown overnight on a 1×LB/Amp (Sambrook *et al.* 1989) agar plate. Individual colonies were picked, and regrown for 16 h in 96-well culture plates containing 150 µL of liquid 1×LB/Amp (100 µg/mL) solution. Polymerase chain reaction (PCR) amplification using pJET amplification primers was performed directly on the bacterial cultures following the manufacturer's protocol. PCR products were purified with ExoSap (Invitrogen),

Table 1 Characterization of 14 microsatellite loci in 25 individuals of *Colossoma macropomum* from the São Miguel Island region of the municipality of Santarém, Pará, Brazil. Allele size range in base pairs (bp), number of alleles (N_A), observed heterozygosity (H_O), expected heterozygosity (H_E) and the probability of Hardy–Weinberg equilibrium (P value) are listed for each locus. * significant P value after Bonferroni correction for multiple comparisons

Locus	GenBank Accession no.	Primer sequence (5'–3')	Repeat motif	Size range (bp)	T_a (°C)	N_A	H_O	H_E
Cm1A8	EU685306	F-TGCTCTCCTGCAGTCTCTCA R-TCATGGTTGCCACTCATCTC	(CT) ₁₈ (CA) ₁₂	161–191	65	7	0.32000	0.54531
Cm1A11	EU685307	F-CCAGCGGGTTAAAGCCTAC R-GCAGCCTCACTGATACGTTG	(CT) ₂₁	230–276	65	16	0.80000	0.91102
Cm1C8	EU685308	F-AGCATGTGTGGAACGTAGGG R-CTGCCGATCACAGCACTAGA	(CT) ₂₂	239–273	65	14	0.76000	0.91755
Cm1D1	EU685309	F-GCAAATGTGCACACCAATAG R-GCAGAAGGTGAAGAGTCTTTGTG	(GA) ₁₇	179–209	65	15	0.84000	0.91265
Cm1E3	EU685310	F-CTGACCAGTCAACTCTCC R-CCTGAACCAGGCTCCAGAT	(CT) ₁₄	313–335	65	9	0.32000	0.55592
Cm1F4	EU685311	F-GGGGTGAGTCATTGAGGAGA R-CCGATCATGAAGGCAGTCTC	(CT) ₁₇	211–245	60	13	0.96000	0.91184
Cm1F5	EU685312	F-TTTCGGGAGCAGGACAAG R-CAGTTAAGGGACCCAGTGGGA	(GA) ₂₄	268–296	60	13	0.56000	0.86694*
Cm1F7	EU685313	F-CCTATTGTGATGGCAGAGAGAG R-CACAGACGTGTACAGCTGGTT	(GA) ₉ (CT) ₅	205–219	65	5	0.52000	0.49143
Cm1G7	EU685314	F-CCCAGCCTACTACAGGGTCA R-CACACATCGCTCTTCTCTCC	(CT) ₁₈	202–238	65	12	0.88000	0.83918
Cm1H8	EU685315	F-GGTCAAAACACACGCCACTA R-CAGCAGACAGTAGGCAGAGAG	(CT) ₁₉	275–331	65	21	0.92000	0.95102
Cm1B8	EU685316	F-CACAACCCACCTGTTTGATT R-CTAATAACAACCTACTTCCACTTCTC	(CT) ₂₀	141–169	65	13	0.84000	0.89878
Cm1C6	EU685317	F-TAAAGCCAAGCCAGGTCTGT R-CGAAACATCAGGCACGAATA	(GA) ₈ gt(GA) ₇	264–290	65	13	0.88000	0.90939
Cm2B1	EU685304	F-CAGGCAGTTAGAACGAGTTTAC R-GCCTCCACACTGACACTTCA	(GT) ₁₁	142–158	65	7	0.80000	0.77224
Cm2G5	EU685305	F-GTAGCCGTCCCGTCCCTA R-GCTCTCACAATATCTCTCACTGTC	(GA) ₉ aa(GA) ₅	138–144	65	4	0.44000	0.45061

and sequenced with pJET sequencing primers following standard BigDye version 3.1 (Amersham) sequencing protocol. Products were resolved on an ABI 3130xl genetic analysis system (Amersham).

We sequenced 192 *C. macropomum* clones, 57 of which contained microsatellite repeat regions. We designed 27 primer pairs using the program Primer3 (http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi). Each forward primer had an M13 sequence tail added to its 5' end to allow for dynamic fluorescent labelling with a 6-FAM-labelled M13 primer (Integrated DNA Technologies) following the protocol of Schuelke (2000). A total of 25 individuals used for characterization of the designed microsatellites were collected in the São Miguel Island region of the municipality of Santarém, Pará, Brazil. PCR was performed in 10 µL reaction volume. The PCR mixture was composed of 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl, 1.75 mM MgCl₂, 0.2 mM each dNTP, 0.2 µM reverse primer, 0.1 µM forward primer, 0.1 µM 6-FAM-labelled M13 label primer, and con-

tained 0.5 U of *Taq* DNA Polymerase (Biotools), and approximately 10 ng of genomic DNA. PCRs were run on a Thermo Hybaid PCR thermocycler. An initial denaturation step (94 °C, 1 min) was followed by 30 cycles of 30 s at 94 °C, 30 s at the locus-specific annealing temperature (Table 1), 30 s at 72 °C, and a final extension step for 30 min at 72 °C. PCR products generated with labelled primer were visualized on a MegaBACE 1000 (GE Healthcare) and analysed in the software Fragment Profiler version 1.2 (GE Healthcare). Allele sizes were scored against the size standard ET-400 ROX (GE Healthcare). After optimization, 14 polymorphic microsatellite loci were selected, with the number of alleles per locus varying from four to 21 (Table 1). Using the program Arlequin 3.1 (Excoffier *et al.* 2005), we verified that no the pair of loci were in linkage disequilibrium, with the exception of the Cm1F5–Cm1A8 locus pair ($P < 0.016$). Analyses in the program MicroChecker 2.3 (Van Oosterhout *et al.* 2004) indicated that Cm1F5 also presented an excess of homozygotes and that

Locus	<i>P. nattereri</i>		<i>M. aureum</i>		<i>P. brachypomus</i>	
	Size range (bp)	A	Size range (bp)	A	Size range (bp)	A
Cm1A8	182–196	5	184–192	3	172–206	4
Cm1A11	238–250	4	244–250	3	244–252	4
Cm1D1	–		188–192	3	–	
Cm1F4	–		208–210	2	192–196	3
Cm1F5	270–274	2	120–126	2	116	1
Cm1F7	248–254	3	204–208	2	232–242	5
Cm1G7	202–214	2	196–218	4	160–188	4
Cm1B8	146–154	4	208–214	4	128–148	4
Cm1C6	132–136	3	132–146	3	116–142	3
Cm2B1	142–156	3	150–154	3	148–152	3

Table 2 Transferability of microsatellite loci developed for *Colossoma macropomum* to other serrasalmid species: *Pygocentrus nattereri* (piranha), *Mylossoma aureum* (pacu) and *Piaractus brachypomus* (pirapitinga). Microsatellite loci Cm1C8, Cm1E3, Cm1H8 and Cm2G5 did not amplify in any of these three serrasalmid species. N, number of individuals tested; A, number of alleles; –, no amplification of product

null alleles were possibly present. A test of transferability was conducted in three other species of Serrasalminae: *Pygocentrus nattereri* (piranha), *Mylossoma aureum* (pacu) and *Piaractus brachypomus* (pirapitinga). These species span the phylogenetic depth and diversity of the Serrasalminae (Calcagnotto *et al.* 2005; Ortí *et al.* 2008). Four individuals of each species were analysed for each locus, and majority of the loci amplified and were polymorphic (Table 2). These new loci together with a set developed by Calcagnotto *et al.* (2001) for *Piaractus mesopotamicus* provide a powerful molecular toolbox for genetic studies of *Colossoma macropomum* and other serrasalmid species due to their phylogenetic conservatism across the serrasalmid clade.

Acknowledgements

This research was supported by grants to I.P.F. from CNPq/CT-Amazônia 554057/2006-9, CNPq/CT-Amazônia 553036/2005-0 and CNPq/PPG7557090/2005-9, and by the University of Puerto Rico Sequencing and Genotyping facility supported by NIH and NSF grants. Permission to collect tissue samples was granted by IBAMA no. 086/2006-DIFAP. This work forms a portion of M.C.F.S.'s PhD at the biotechnology programme of Universidade Federal do Amazonas; M.C.F.S. is supported by a PhD fellowship from FAPEAM.

References

Araújo-Lima C, Ruffino ML (2004) Migratory fishes of the Brazilian Amazon. In: *Migratory Fishes of South America: Biology, Fisheries, and Conservation Status* (eds Carolsfield J, Harvey B, Ross C, Baer A), pp. 233–302. World Fisheries Trust/World Bank/International Development Research Centre, Ottawa, Canada.

Calcagnotto D, Russello M, DeSalle R (2001) Isolation and characterization of microsatellite loci in *Piaractus mesopotamicus* and their applicability in other Serrasalminae fish. *Molecular Ecology*, **1**, 245–247.

Calcagnotto D, Schaefer SA, DeSalle R (2005) Relationships among characiform fishes inferred from analysis of nuclear and mitochondrial gene sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **36**, 135–153.

Excoffier L, Laval G, Schneider S (2005) Arlequin version 3.1: an integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online*, **1**, 47–50.

Farias IP, Hrbek T, Brinkmann H, Sampaio I, Meyer A (2003) Characterization and isolation of DNA microsatellite primers for *Arapaima gigas*, an economically important but severely over-exploited fish species of the Amazon basin. *Molecular Ecology Notes*, **3**, 128–130.

Goulding M (1980) *Fishes and the Forest*. University of California Press, Los Angeles, California.

IBAMA (2005) *Estatística Pesqueira do Amazonas e Pará 2002*. Manaus: ProVarzea, Manaus, Brazil.

Ortí G, Sivasundar A, Dietz K, Jégu M (2008) Phylogeny of the Serrasalminae (Characiformes) based on mitochondrial DNA sequences. *Genetics and Molecular Biology*, **31**, 343–351.

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Vol. 1. 2nd edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.

Santos MdCF, Ruffino ML, Farias IP (2007) High levels of genetic variability and panmixia of the tambaqui *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818) in the main channel of the Amazon River. *Journal of Fish Biology*, **71**, 33–44.

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

Tenzen I, degli Ivanisovich S, Morgante M, Gessler C (1999) Identification of microsatellite markers and their application to population genetics of *Venturia inaequalis*. *Phytopathology*, **89**, 748–753.

Van Oosterhout C, Hutchinson WF, Wills DPM, Shipley P (2004) Micro-Checker: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes*, **4**, 535–538.

doi: 10.1111/j.1755-0998.2008.02331.x

© 2009 The Authors

Journal compilation © 2009 Blackwell Publishing Ltd