

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

**Análise de Parentesco em filhotes de pirarucu (*Arapaima gigas*
Cuvier, 1817), utilizando marcadores microssatélites**

YANE SANTOS ALMEIDA

MANAUS -AM

2006

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

YANE SANTOS ALMEIDA

**Análise de Parentesco em filhotes de pirarucu (*Arapaima gigas*
Cuvier, 1817), utilizando marcadores microssatélites**

Dissertação apresentada ao Programa Multi-Institucional de Pós-graduação em Biotecnologia, da Universidade Federal do Amazonas, como requisito parcial da obtenção do título de Mestre em Biotecnologia, área de concentração de Genética da Conservação.

Orientadora: Prof^a Dr.^a Izeni Pires Farias

Co-orientador: Dr.^o Tomas Hrbek

MANAUS - AM

2006

RESUMO

Arapaima gigas, conhecido no Brasil como pirarucu, é uma das espécies economicamente mais importantes da bacia Amazônica. No entanto, o conhecimento sobre alguns aspectos da biologia, comportamento e crescimento, em qualquer modalidade de criação intensiva, ainda é escasso. O pirarucu apresenta um comportamento reprodutivo complexo e durante esse período, observações de criadores e de outros autores afirmam que: ocorre a formação de casais, construção de ninhos e o cuidado parental da prole que é realizado pelo macho. O presente trabalho teve o intuito de fornecer informações sobre o parentesco genético, entre filhotes de pirarucu, provenientes de áreas de cativeiro e de área semi-aberta (Santarém), utilizando marcadores microssatélites. A técnica mencionada tem sido a ferramenta molecular mais utilizada pelos pesquisadores para revelar níveis de relacionamento genético dentro e entre grupos de irmãos e parentes mais próximos. As análises de parentesco foram feitas utilizando-se nove (os mais polimórficos) microssatélites desenvolvidos para *A. gigas*. As genotipagens foram realizadas no seqüenciador automático de DNA MegaBace 1000 utilizando-se o programa Genetic Profiler v1.2. As frequências alélicas e os valores de heterozigosidade esperadas e observadas foram obtidos através do programa ARLEQUIN e GENETIX v. 4. Genótipos para todos os filhotes das duas ninhadas, foram usados para calcular os coeficientes de relacionamento dos pares e a relação de parentesco, usando o programa de computador KITNSHIP v1.2, baseado em todos os locos. As categorias de relacionamento foram estimadas usando o programa ML-RELATE. Nossos resultados indicaram que as ninhadas, das áreas de cativeiro apresentaram, em média, estimativas altas de relacionamento, variando de 0,48 em Itacoatiara 2 e Rio Preto da Eva a 0,51 em Itacoatiara 1. Nas amostras de Santarém, os valores médios encontrados variaram de 0,46 a 0,80 em STM G2 e STM G3, respectivamente. As matrizes das categorias de relacionamento, mostram que tanto nos grupos de cativeiro, como nos grupos de área semi-aberta, a maior frequência observada nos filhotes é da categoria não-relacionados (U). Quando analisamos separadamente cada amostragem, percebemos outros níveis de relações de parentesco ou categorias de relacionamento nos filhotes. Esses resultados indicam que, apesar dos filhotes estarem altamente relacionados, a hipótese de uma “maternidade ou paternidade extra” aos pares do acasalamento, não pode ser ignorada. Tais resultados demonstram uma estratégia reprodutiva natural e efetiva, para a manutenção da variabilidade genética na prole de *Arapaima gigas*.

Palavras-chave: *Arapaima gigas*, microssatélites, sistema reprodutivo, estimativas de relacionamento.

ABSTRACTS

Arapaima gigas, known in Brazil as pirarucu, is one of the most economically important species in the Amazon watershed. However there is scarce knowledge of some aspects of its biology, behavior and growing rates in any modality of intensive farming. Pirarucu presents a complex reproductive behavior, including formation of couples; nest building; and parental care by male, as observed by farmers and other authors. The present work aims to generate information about genetic kinship between nestlings of pirarucu from captivity and semi-open areas (Santarém), by means of microsatellite markers. This technique is the most used molecular marker to reveal levels of genetic relationships within and between groups of brothers and close relatives. Kinship analyses were carried out with nine (the most polymorphic) microsatellites developed for *A. gigas*. The genotypes were done in the automatic DNA sequencer MegaBace 1000 using the software Genetic Profiler v1.2. Allelic frequencies and expected and observed heterozygosity values were obtained in the software ARLEQUIN and GENETIX v. 4. Genotypes of all the nestlings of two offspring were used to calculate the pairwise kinship relationships and kinship relationships using the software KINSHIP v1. 2, based on all loci. The relationship categories were estimated in the software *ML-RELATE*. Our results indicated that, on average, the captivity offspring presented a high estimate of relationship, varying from 0.48 in Itacoatiara 2 e Rio Preto da Eva, to 0.51 in Itacoatiara 1. In Santarém samples, the average values varied from 0,46 to 0,80 in STM G2 e STM G3, respectively. The relationship categories matrices show that the higher frequency observed in nestlings is the category of non-related (U), both in captivity groups as semi-open areas groups. When we analyzed separately each sample, we find other level of kinship relationships or kinship categories in the nestlings. These results indicate that, despite the nestlings are highly related, the hypotheses of an "extra maternity or paternity" of the pair of relationship can not be ignored. These results demonstrate a reproductive strategy natural and effective to keep the genetic variability in the nestlings of *Arapaima gigas*.

Key-words: *Arapaima gigas*, microsatellite, reproductive system, relationship.

Aos meus pais, que me deram a vida, e a oportunidade de realizar muitos dos meus sonhos, inclusive este. Aos meus orientadores por todo incentivo, confiança e incansáveis orientações. A toda comunidade científica que se utilize deste trabalho em prol da ciência.

AGRADECIMENTOS

Não poderia deixar de agradecer e de reconhecer que foram muitas as pessoas que compartilharam comigo seus conhecimentos, e me auxiliaram na busca plena de meus ideais profissionais e humanos.

- Agradeço primeiramente a Deus, por sempre estar comigo e me dar forças para continuar, e nunca desistir. Por ele ser o Deus a quem eu sirvo e acredito e que nunca me desampara e nem me desamparou nas horas mais difíceis de minha vida.

- Aos meus pais: Raimundo Ademir Souza Almeida e Vera Lúcia Santos Almeida, por incentivar e patrocinar grande parte dos meus estudos, e por me ensinarem a viver com dignidade, e por me deixarem de herança o que podemos ter de mais precioso, e que nunca nos poderá ser tirado: A Educação;

- Aos meus irmãos Weida Santos Almeida e Wilson Santos Almeida, por me ajudarem sempre que precisei, sem deixar de me incentivar a não desistir dos meus sonhos;

- A Universidade Federal do Amazonas, pela oportunidade de realizar o Mestrado Multi-Institucional e Multidisciplinar em Biotecnologia;

- Aos Doutores e professores Izeni Pires Fraias e Tomas Hrbek por toda orientação e ensinamento na realização deste trabalho. Por sempre me incentivarem a fazê-lo, mostrando-me sua importância para a ciência;

- Aos Doutores Bruno Cavero (UFAM), Alexandre Honczaryk (JNPA) e Marcelo Crossa por proporcionarem a obtenção das amostras, utilizadas neste trabalho;

- À toda equipe do LEGAL (Laboratório de Evolução e Genética Animal), pelo apoio e ajuda durante a execução deste trabalho.

- Às minhas primas Aldaci Souza Almeida, Aline Mara Souza Almeida e minha tia Alda Souza Almeida pelo apoio, carinho e paciência;

- Às minhas amigas Marinez Nogueira, Janayna Roriz Hipólito, pela amizade e companheirismo partilhados principalmente nos momentos de angústias.

- Ao meu amigo Cleiton Fantin, pelo companheirismo e apoio em todas as situações mais difíceis enfrentadas no dia-a-dia de laboratório.

- A Prof.^a Dr.^a Maria das Neves Viana, por me ensinar os primeiros passos dentro de do laboratório LEGAL, além de sua amizade e apoio durante todo esse mestrado.

A todos os meus professores pela minha formação profissional.

“O temor do Senhor é o princípio da sabedoria,
e a ciência dos justos é a prudência”
Provérbios 10:19

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Filhotes de pirarucu (<i>Arapaima gigas</i>)	13
Figura 2	Mapa mostrando aproximadamente a distribuição natural de <i>Arapaima gigas</i> , na Bacia do Rio Amazonas	16
Figura 3	Pirarucu reprodutor com 8 anos de idade	17
Figura 4	Comportamento reprodutivo do pirarucu: A- Macho construindo o ninho para a desova da fêmea; B- Ninho ou panela construída no fundo do lago e C- Cuidado parental com os filhotes, feito pelo macho	19
Figura 5	Variabilidade alélica do loco CAm13, visualizada no programa Fragment Profiler (versão 1.2)	31
Figura 6	Número de alelos por locus das quatro amostragens de filhotes de pirarucu	36
Figura 7	Alelos encontrados nos filhotes de Rio Preto da Eva, onde A (loco CAm2) e B (loco CTm3)	43
Figura 8	Coeficiente de Relacionamento nos filhotes de cativoiro	46
Figura 9	Coeficiente de Relacionamento nos filhotes de Santarém	48
Figura 10	Categorias de relacionamento irmãos-verdadeiros (FS), meio-irmãos (HS) e não-relacionados (U), dos filhotes das áreas de cativoiro	51
Figura 11	Categorias de relacionamento irmãos-verdadeiros (FS), meio-irmãos (HS) e não-relacionados (U), dos filhotes da área semi-aberta (Santarém)	52

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Quantidade de filhotes de pirarucu provenientes de São Miguel (Santarém-PA)	27
Tabela 2	Quantidade de filhotes de pirarucu provenientes de Itacoatiara .	28
Tabela 3	Quantidade de filhotes de pirarucu provenientes das áreas de cativeiro: Itacoatiara e Rio Preto da Eva	28
Tabela 4	Características dos Microsatélites utilizados na genotipagem de <i>A. gigas</i> . Sendo: T_a = temperatura de andamento do <i>primer</i> , H_o = Heterozigosidade observada e H_e = Heterozigosidade esperada	30
Tabela 5	Alelos encontrados nas genotipagens, dos nove loci de microsatélites, para os ninhos estudados das quatro localidades amostradas	37
Tabela 6	Médias da diversidade genética e equilíbrio de Hardy-Weinberg em amostras de filhotes de pirarucu das quatro localidades estudadas	38
Tabela 7	Tabela 7. Heterozigosidade Observada e Esperada por <i>locus</i> por população. N: Número de alelos; H_o : Heterozigosidade Observada; H_e : Heterozigosidade Esperada	39
Tabela 8	Características dos locos microsatélites analisados em <i>A. gigas</i> . Sendo: A = número de alelos, H_o =Heterozigosidade observada, I = probabilidade de identidade genética, Q =probabilidade de exclusão de paternidade, 1C =probabilidade combinada de identidade genética, QC =probabilidade de exclusão conjunta para os cinco locos.	40
Tabela 9	Quantidade de Homozigotos (H_m) e Heterozigotos (H_t) presentes no conjunto alélico, dos filhotes de pirarucu, de cada localidade estudada	44
Tabela 10	Valores de relacionamento (mínimo, médio e máximo) observados nas matrizes entre cada par de filhotes, de cada grupo estudado nas áreas de cativeiro	45
Tabela 11	Valores de relacionamento (mínimo, médio e máximo) observados	

	nas matrizes entre cada par de filhotes, de cada grupo estudado nos filhotes de Santarém	47
Tabela 12	Freqüências das categorias de relacionamento dos filhotes de pirarucu das áreas de cativo e de Santarém	50
Tabela 13	Matriz das categorias de relacionamento do grupo de filhotes de pirarucu, provenientes de Itacoatiara 1. Sendo: FS= irmãos verdadeiros, HS= meio-irmãos e U não relacionados. Dados com nível de significância 0,05	53
Tabela 14	Matriz das categorias de relacionamento do grupo de filhotes de pirarucu, provenientes de Itacoatiara 2. Sendo: FS irmãos verdadeiros, HS= meio-irmãos e U não relacionados. Dados com nível de significância 0,05	54
Tabela 15	Matriz das categorias de relacionamento do grupo de filhotes de pirarucu, provenientes de Rio Preto da Eva. Sendo: FS= irmãos verdadeiros, HS meio-irmãos e U não relacionados. Dados com nível de significância = 0,05	55
Tabela 16	Algumas Táticas Reprodutivas Alternativas (ARTs) utilizadas por peixes.....	59

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	
1.1 Considerações Gerais	12
1.2 O Pirarucu (<i>Arapaima gigas</i>)	13
1.3 Biologia do pirarucu (<i>Arapaima gigas</i>)	15
1.4 Comportamento Reprodutivo do pirarucu (<i>Arapaima gigas</i>)	18
1.5 Os Microssatélites e o estudo do comportamento reprodutivo em peixes	21
1.6 Justificativa	24
1.7 Objetivos	25
1.7.1 Geral	25
1.7.2 Específicos	25
2. MATERIAL E MÉTODOS	
2.1 Locais de coleta e amostragem	26
2.1.1 Características da área semi-aberta (lagos)	26
2.1.2 Características das áreas de viveiro (viveiros de barragem)	27
2.2 Extração do DNA e Amplificação dos locos microssatélites	29
2.3 Análises Genotípicas	31
2.4 Análises Estatísticas	32
2.5 Análises de Parentesco.....	35
3. RESULTADOS	
3.1 Variabilidade Genética	36
3.2 Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) e Índices de diversidade genética	38
3.3 Potencial dos microssatélites para as análises de parentesco	40
3.4 Análise de Parentesco	41
3.5 Coeficiente de relacionamento (r)	45
3.6 Categorias de relacionamento	49
4. DISCUSSÃO	
4.1 Variabilidade genética das amostras estudadas	57
4.2 Análise de Parentesco	58
4.3 Implicações para a conservação	62
5. REFERÊNCIAS	64

1 – Introdução

1.1 – Considerações Gerais

Na região amazônica, a pesca se destaca em relação às demais regiões brasileiras, pela riqueza de espécies exploradas, pela quantidade de pescado capturado e pela dependência da população tradicional desta atividade. A riqueza da ictiofauna da bacia Amazônica ainda é pouco conhecida, sendo esta responsável pelo grande número de espécies da região neotropical, que pode alcançar 8.000 espécies (Vari, & Malabarba, 1998).

De acordo com Ostrensky *et al.*, (2000), na área da piscicultura, a região norte do Brasil, por uma série de fatores conjunturais, tende a permanecer muito abaixo da produção alcançada nas demais regiões do país. Talvez a popularização dos cultivos de tambaqui (*Colossoma macropomum*) ou domínio completo das técnicas de produção de pirarucu (*Arapaima gigas*) venha descortinar novos horizontes para a piscicultura regional.

Petrene (1998), relata que a maior demanda de alimentos na cidade de Manaus, inclusive de peixe, resultou na sobrepesca das duas espécies com maior aceitação pelos consumidores, o tambaqui (*C. macropomum*) e o pirarucu (*A. gigas*). Crossa (1997) afirma que os estoques de pirarucu na Bacia Amazônica encontram-se aparentemente num estado de sobrepesca por crescimento.

1.2- O Pirarucu (*Arapaima gigas*)

Segundo Fontenele (1948) e Imbiriba *et al.*, (1996), a palavra pirarucu é de origem indígena, constituída pela união de “pira” = peixe e “urucu” = vermelho, devido à intensa coloração de sua orla posterior. Chamado de “paiche” na Amazônia peruana, “arapaima” na Guiana e “pirarucu” no Brasil, o pirarucu (Figura 1) é um verdadeiro documento na evolução da vida, sendo o único representante vivo da remota família Arapaimidae, da ordem Osteoglossiformes (Nelson, 1994; Li & Wilson, 1996).

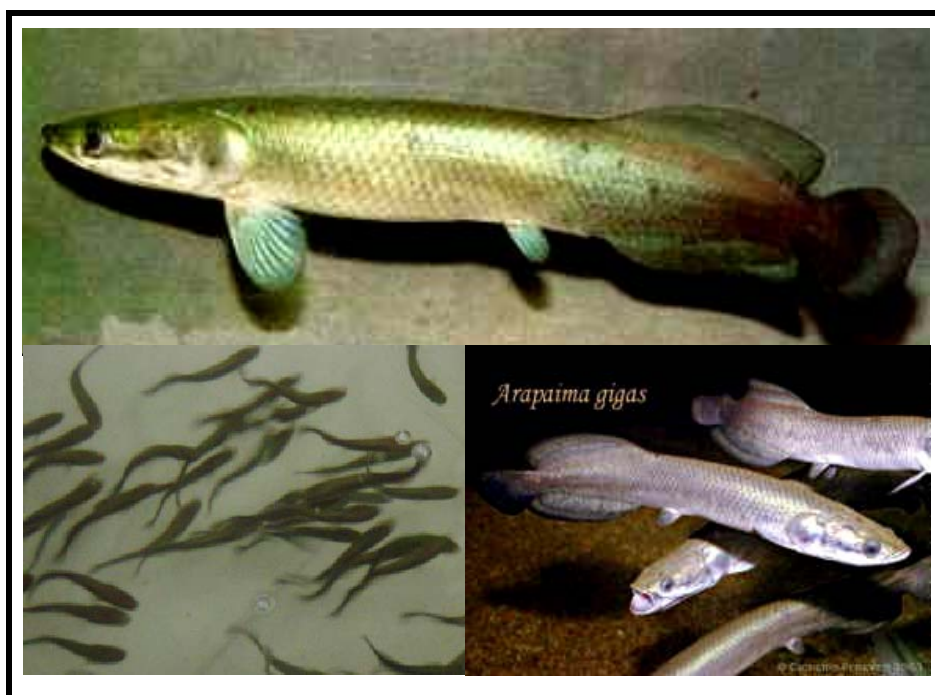


Figura1: Filhotes de pirarucu (*Arapaima gigas*).
Fonte: <http://www.arowana.net/www/arapaima.htm>

Taxonomicamente o pirarucu é classificado como *Arapaima gigas* (Cuvier, 1817), pertencente à família *Osteoglossidae* (Nelson, 1994; Li & Wilson, 1996), onde ocorrem dois gêneros: *Osteoglossum* (com duas espécies, *O. bicirrhosum* e *O. ferreirai*) e *Arapaima* (com uma única espécie, *A. gigas*). Ambos os gêneros só

ocorrem na Amazônia e estão relacionados aos gêneros *Scleropages*, da Austrália e *Heterotis*, que ocorre na África (Venturieri & Bernardino, 2002). Os *Osteoglossomorpha* são um dos grupos mais antigos de teleósteos vivos, que surgiram durante o período Jurássico, possivelmente no supercontinente Pangea. São considerados um dos elos entre os peixes do mundo primitivo e da idade moderna (Souza & Val 1991; Gerri 1995).

O pirarucu é uma das espécies economicamente mais importantes da bacia Amazônica. Tradicionalmente, o pirarucu faz parte da culinária do povo amazônica, sendo uma importante fonte de alimento, este peixe tem sido bastante explorado. Devido a esta extensiva exploração comercial, esta espécie tornou-se escassa entre os anos 70-80 e tornou-se comercialmente extinta próximo às grandes cidades amazônicas (Goulding, 1980). Em 1975, o pirarucu (*Arapaima gigas*) foi listado no apêndice II da CITES (Convenção sobre o Comércio Internacional de Espécies da Flora e Fauna Selvagens em Perigo de Extinção), o qual define uma espécie que não está necessariamente ameaçada de perigo de extinção, mas em uma situação na qual o seu uso comercial deve ser controlado para evitar uma utilização incompatível com a sobrevivência da espécie. No começo de 2001, o governo brasileiro proibiu a pesca total do pirarucu, exceto na Reserva de Desenvolvimento Sustentável de Mamirauá. Esta reserva está localizada na junção dos rios Solimões e Juruá e tem obtido sucesso no manejo participativo dos recursos naturais, coordenado pelas comunidades locais e científicas. Os lagos são monitorados e a pesca está organizada com base rotacional, evitando assim, a superexploração local do pirarucu (Queiroz & Cramptonn 1999; Castelo 2004; *apud*: Farias *et al.*, 2006)

Apesar de há muitos anos, ser explorado comercialmente, ainda existe uma grande falta de conhecimento sobre esta espécie. Na atual lista vermelha da IUCN (União Internacional para a Conservação da Natureza) *Arapaima* é listada como “*Data Deficient*”, na qual caracteriza uma espécie que não se tem conhecimento suficiente para enquadrá-la em uma das categorias.

Segundo Cavero *et al.* (2003), o pirarucu é provavelmente a espécie mais promissora para o desenvolvimento da criação de peixes em regime intensivo na região Amazônica. Isto se deve a fatores tais como: alta velocidade de crescimento, podendo alcançar até 10 kg no primeiro ano de criação (Carvalho & Nascimento, 1992; Imbiriba, 2001), grande facilidade de manuseio e respiração aérea (Fontenele, 1953,1955), condição que pode facilitar sua criação em tanques-rede de pequeno volume, além de não manifestar canibalismo quando confinado em altas densidades (Cavero, 2002). Além disso, o pirarucu, pode ser facilmente treinado a aceitar alimentação com ração extrusada (Crescêncio, 2001). No entanto, o conhecimento sobre alguns aspectos da biologia, comportamento e crescimento do pirarucu, em qualquer modalidade de criação intensiva, ainda é escasso.

1.3- Biologia do pirarucu (*Arapaima gigas*)

O pirarucu é um dos maiores peixes de água doce chegando a alcançar até no máximo 3m de comprimento e a pesar até 200 Kg (Fontenele 1953, 1955; Imbiriba *et al.*, 1996; Baca 2001). De acordo com Hrbek *et al.*,(2005), sua distribuição se dá predominantemente na Bacia Amazônica, mas se tem registro de sua ocorrência desde a parte mais alta da bacia de Essequibo até as Guianas

(Lüling, 1964). Evidências fósseis indicam seu surgimento no Rio Colômbia, na Bacia de Magdalena (Lundberg & Chernoff, 1992).

No Brasil, além de habitar preferencialmente as regiões de lagos das Bacias Amazônica, o pirarucu, pode ser racionalmente criado nas regiões Nordeste, Centro-Oeste, e, determinados locais da região Sudeste, onde não ocorrem grandes variações de temperatura (Imbiriba 2001).

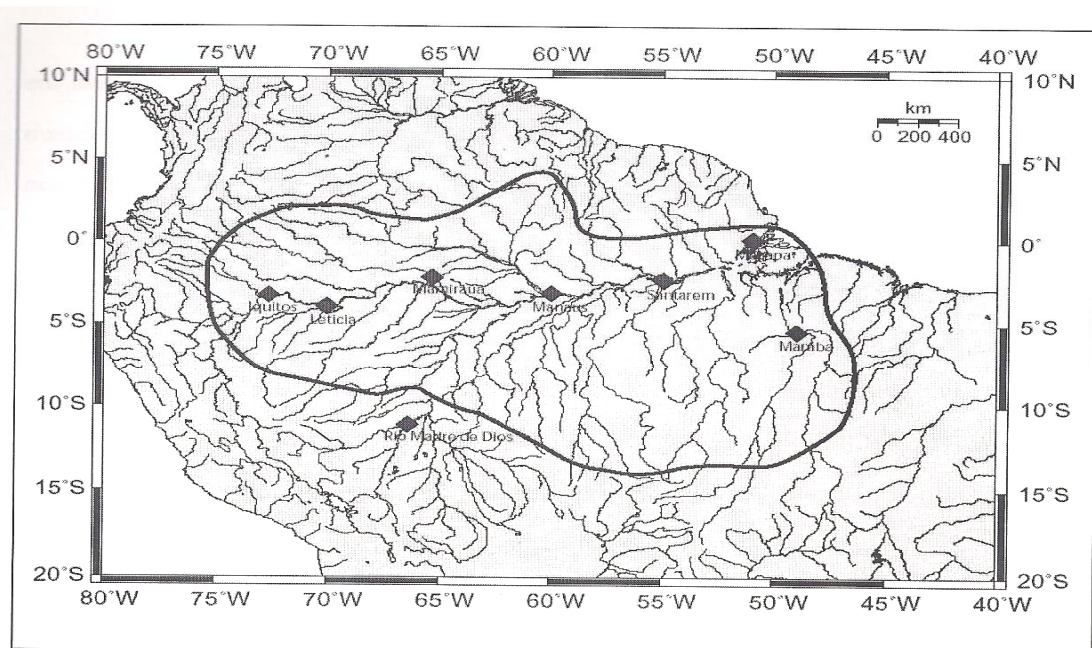


Figura 2: Mapa mostrando aproximadamente a distribuição natural de *Arapaima gigas*, na Bacia do Rio Amazonas.
Fonte: Hrbek *et al.*, 2005

Esta espécie tem respiração aérea obrigatória, indo regularmente à superfície para renovar o ar de sua bexiga natatória bastante vascularizada, onde se dá a troca gasosa (Almeida & Val, 1990; Brauner & Val, 1996). Ironicamente, esta adaptação que lhe dá vantagens para viver em ambientes pobre em oxigênio o torna vulnerável aos pescadores, que o esperam vir à superfície para arpoá-lo (Veríssimo, 1975).

Seu hábito alimentar é do tipo ictiófago, ou seja, se alimenta de outros peixes. Não existem características externas para diferenciar o macho da fêmea. Somente durante o período de reprodução o dimorfismo sexual pode ser mais evidente.

A maturação sexual ocorre do terceiro ao quinto ano de vida, quando atinge em média 1,6 m de comprimento e 40 a 50 Kg de peso. Fontenele (1953), sugere que durante a época da desova nota-se características sexuais secundárias extragenitais nos reprodutores, o macho passa a apresentar uma coloração escura na parte superior da cabeça e dos flancos, o ventre e a parte caudal apresentam uma coloração avermelhada (Fig.2). Entretanto, como observado por Baca (2001), essas não podem ser sempre observadas em todos os espécimes. Internamente os machos apresentam um testículo funcional à esquerda e as fêmeas um ovário funcional à esquerda também. O testículo e o ovário à direita são atrofiados (Imbiriba *et al.*, 1996; Baca, 2001). Os ovos são depositados em ninhos, e os machos são os responsáveis pela proteção dos filhotes.



Figura 2: Pirarucu reprodutor com 8 anos de idade
Fonte: Workshop Pirarucu – Iquitos 2003

1.4- Comportamento Reprodutivo do pirarucu (*Arapaima gigas*)

Os primeiros estudos feitos sobre a reprodução em cativeiro de *Arapaima gigas* (pirarucu), foram iniciados por Oliveira (1944) e Fontenele (1948), os quais conseguiram importantes dados sobre a anatomia e hábitos de procriação do pirarucu, como por exemplo: é uma espécie que desova em água parada e pertence ao grupo das espécies de maturação sexual parcial, dando origem a desovas parceladas. Esses dados são confirmados por Imbiriba (1994); Imbiriba (2001) e Baca (2001). Esses autores afirmam ainda que a desova coincide com período chuvoso que, na Amazônia, se estende de dezembro à junho. Imbiriba (2001), relata que a reprodução do pirarucu está intimamente relacionada com a intensa dinâmica do nível das águas dos rios da Amazônia.

De acordo com Imbiriba (2001), a reprodução do pirarucu ocorre de maneira semelhante tanto na natureza quanto no cativeiro, com a corte, construção do ninho, acasalamento e guarda da prole. Em cativeiro a seqüência inicia-se com a falta de interesse pelo alimento por parte dos reprodutores. As fases do acasalamento, onde algumas vezes podem se observar verdadeiras “lutas” entre os mesmos, não se sabendo ainda se são por exclusividade do domínio do local escolhido para a desova ou pela disputa pelas fêmeas, são seguidas por um período de tranqüilidade, perturbado apenas, a longos intervalos, pela subida lenta de um reprodutor do casal, de cada vez, para respirar. Esse período de tranqüilidade dura de quatro a cinco dias; depois, os reprodutores podem ser vistos um de cada de cada vez, em posição vertical, de cabeça para baixo; quando a profundidade onde está o ninho é rasa, os peixes mostram a nadadeira caudal parcialmente fora da água.

A água, nesse período, fica turva devido à escavação do ninho, que é circular e popularmente chamado de “panela” (Figura 3.). O local de preferência para o preparo do ninho é no fundo dos lagos, em locais de terra argilosa, sem vegetação, nos lugares mais rasos e em águas tranquilas (Sawaya 1946, Fontenele 1952; Bard & Imbiriba 1986; Imbiriba *et al.*, 1996). Depois de o ninho estar preparado, a Fêmea, coloca os óvulos no ninho e o macho os fertiliza com o líquido seminal. Após a eclosão dos ovos, as larvas permanecem no ninho, durante cinco dias, guardados próximo do macho, até a absorção da vesícula vitelina. As larvas são pretas e nadam sobre a cabeça e região dorsal do pai, que as protegem, e somente são visíveis após atingirem uma semana de vida. Nesse período já vêm à superfície da água, no exercício da respiração aérea (Imbiriba *et al.*, 1996).



Figura 3: Comportamento reprodutivo do pirarucu: **A-** Macho construindo o ninho para a desova da fêmea; **B-** Ninho ou panela construída no fundo do lago e **C-** Cuidado parental com os filhotes, feito pelo macho

Notavelmente os peixes possuem uma diversidade extraordinária em seu comportamento reprodutivo (Breder, 1936; Cross e Sargent, 1985; Taborsky, 1994; Taborsk, 1998). Muitos estudos genéticos, sobre o comportamento reprodutivo de peixes, têm sido feitos em espécies que apresentam um cuidado parental com os filhotes. Nos peixes ósseos (Osteichthyes- onde o pirarucu está incluído), aproximadamente 89 das 422 famílias taxonômicas (21%) contêm algumas espécies em que os filhotes possuem cuidado parental em aproximadamente 70% das famílias, esse cuidado é realizado pelo macho (Awise *et al.*,2002).

O estudo do comportamento reprodutivo em peixes com a manifestação de poliandria (uma fêmea copulando com vários machos), poligamia (um macho copulando com várias fêmeas) ou a constatação de um sistema reprodutivo monogâmico, pode ser eficientemente avaliado e suportado por métodos moleculares como a técnica de DNA microssatélites. Essa técnica tem sido a ferramenta na qual os pesquisadores têm solucionado questões difíceis de serem respondidas apenas por observações de campo, devido a grande dificuldade na visualização de todos os estágios que compreendem o sistema reprodutivo de vários peixes. De acordo com Awise *et al.*, (2002), os marcadores moleculares podem quantificar a incidência de um comportamento reprodutivo “escondido” de um organismo, ou seja, diferente do observado pó pesquisadores de campo.

1.5– Os Microssatélites e o estudo do comportamento reprodutivo de peixes

O padrão reprodutivo e o sucesso reprodutivo de machos são pouco conhecidos na maioria das espécies de peixes. O habitat desses peixes normalmente dificulta as observações do seu comportamento reprodutivo e de seus padrões de parentesco. Além disso, a maioria dos peixes possui fecundação externa aumentando a possibilidade de ocorrer uma competição de esperma (Stockley *et al.*, 1997).

Recentemente, inferir parentesco baseado em técnicas moleculares tem sido a ferramenta sucessivamente utilizada para investigar o sistema reprodutivo em um grande número de taxa e espécies. Em peixes, a ferramenta molecular, geralmente tem sido usada para estimar a contribuição relativa da paternidade como uma estratégia reprodutiva dos machos envolvidos no acasalamento (Birkhead & Moller, 1998).

Colbourne *et al.* (1995), afirma que os marcadores moleculares, baseados em DNA microssatélite, são uma ferramenta poderosa para os estudos de parentesco e o fluxo gênico em populações de peixes. Em seus estudos, os autores, isolaram e caracterizaram 60 seqüências repetidas de microssatélites a partir do genoma do peixe-sol de guelra azul “*Bluegill sunfish*” (*Lepomis macrochirus*), para avaliar o sucesso reprodutivo nessa espécie. Os resultados deste estudo, indicaram que sete *loci* de microssatélites são potencialmente informativos para estudos de parentesco. Os peixes-sol de guelra azul habitam lagos de água-doce na parte mais central e oriental da América do Norte (Lee *et al.*, 1980). Eles desovam em colônias com muitos ninhos. Os machos possuem um polimorfismo discreto que é caracterizado por dois termos: os “pais

verdadeiros” (*paternal*) e os “ pais aproveitadores” (*cuckolder*). Os pais verdadeiros atingem a maturidade sexual aos sete anos de idade e ficam aptos para construir seu ninho na colônia, os pais aproveitadores atingem a maturidade sexual precocemente e se aproveitam de um momento de distração da fêmea para fertilizar seus ovos em ninhos que foram feitos para serem fertilizados pelos pais verdadeiros.

Da mesma forma Jones *et al.* (1998), utilizou marcadores de DNA microssatélites (quatro loci polimorficos) para avaliar o sistema reprodutivo e o parentesco biológico de uma espécie de cavalo-marinho (*Hippocampus angustus*) da Austrália Ocidental. Esse peixe é da família *Syngnathidae*, onde o macho, assim como o pirarucu, apresenta cuidado parental com os filhotes. A fêmea transfere os ovos para o saco ventral do macho, que os fertiliza e os protege até o nascimento. Diferentemente dos outros peixes dessa família os cavalos-marinhos são socialmente monogâmicos, exibindo uma formação de pares por um logo prazo. Essa interação entre eles se manifesta através de um ritual diário de acasalamento que pode ser observado entre os mesmos pares na época da reprodução. Os resultados das análises genéticas, obtidas nesse estudo, são consistentes com o padrão reprodutivo monogâmico em *H. angustus*, onde ambos (macho e fêmea) foram fieis aos seus pares durante o período reprodutivo. Esse padrão de sistema reprodutivo também foi observado em outras espécies de cavalos-marinhos como: *H. fuscus*, *H. zosterae* e *H.vohitei*.

Bekkevold *et al.* (2002), desenvolveu um estudo com *Gadus morhua* (Bacalhau), um peixe importante economicamente e superexplorado, que forma uma grande população no Atlântico Norte, e é considerado o mais nobre bacalhau.

O objetivo desse estudo foi estimar a competição reprodutiva em machos de *G. morhua*, através da análise de parentesco baseada em DNA microssatélites, sustentando a hipótese de que o domínio de território determina o sucesso reprodutivo dessa espécie; e que essa dominância está relacionada ao tamanho do corpo, com o propósito de fornecer informações que possam auxiliar no manejo e monitoramento dos estoques pesqueiros dessa espécie. Esses peixes possuem um comportamento reprodutivo que se caracteriza basicamente pela formação de pares. Os machos e as fêmeas se agregam, e elas desovam repetidamente por um a dois meses, produzindo um grande número de ovos. A quantidade de ovos, produzidos pela fêmea, e a quantidade de esperma, produzido pelos machos, está positivamente relacionado com o tamanho do corpo. Os machos cortejam as fêmeas através da conquista de território, travando verdadeiras lutas, seguida de uma visita, feita pela fêmea, ao macho vencedor. O macho mais atrativo e dominante tem mais chances para o acasalamento e para o sucesso reprodutivo. Os seus resultados desse estudo indicaram que um grande número de ovos foi fertilizado por vários machos e que a diferença de tamanho macho-fêmea teve um efeito no sucesso reprodutivo do macho; mostrando ainda como o Sistema Reprodutivo do Bacalhau pode afetar geneticamente o tamanho efetivo da população/ índice do tamanho populacional e contribuir no conhecimento da estrutura genética da população dessa espécie.

Em 2004, Chapman *et al.*, realizou um estudo com uma espécie de tubarão: o tubarão-martelo (*Sphyrna tiburo*), com o objetivo de responder algumas questões relacionadas ao padrão do comportamento reprodutivo dessa espécie, dificilmente observado na natureza, a fim de contribuir com estratégias de manejo

e conservação desses elasmobrânquios; que é uma espécie que sofre reduções populacionais em 89% desde 1986, devido à captura não dirigida e ao preço exorbitante de mercado de suas barbatanas. Esses peixes possuem fertilização interna, onde as crias desenvolvem-se no interior do útero materno até ao momento do nascimento. As fêmeas de *S. Tiburo* são altamente sociais e podem estocar esperma por até cinco meses. Essas espécies ocorrem frequentemente nas mesmas áreas dos tubarões-limão (*Negaprion brevirostris*) e os tubarões-protetores (*Ginglymostoma cirratum*), que apresentam a paternidade múltipla como uma estratégia de vida. Embora as observações de campo sugiram que os tubarões-martelo possam ter um sistema múltiplo de acasalamento, nossos resultados demonstraram que a maioria das fêmeas amostradas foi geneticamente monogâmica, dentro do ciclo reprodutivo observado, dando a primeira evidência de um sistema reprodutivo com a predominância de Paternidade simples nesses elasmobrânquios. Mostrando ainda que, esse sistema, pode ser complexo e altamente variável entre as espécies de tubarões.

1.6- Justificativa

Apesar das várias informações, que se tem hoje, sobre o comportamento reprodutivo do pirarucu, os conhecimentos sobre a sua fisiologia reprodutiva ainda são muito escassos. Seu comportamento reprodutivo é bastante complexo, e envolve a formação de casais, construção de ninhos e cuidado parental com o ninho e a prole (Imbiriba, 2001), mas ainda não se sabe como realmente o sistema reprodutivo acontece, por exemplo: se a fêmea é poliândrica ou se o macho é

poligâmico, ou até mesmo confirmar o que as observações de campo sugerem: um padrão reprodutivo monogâmico.

Com o intuito de contribuir com o conhecimento sobre o Padrão do Sistema Reprodutivo de *Arapaima gigas*, achamos válido utilizar a técnica de DNA microssatélite para testar a paternidade nessa espécie. Farias *et al.*, (2003), realizaram um trabalho de isolamento e caracterização, que resultou no desenvolvimento de 14 marcadores moleculares de microssatélites, altamente variáveis para *Arapaima gigas*. Por serem altamente polimórficos e principalmente co-dominantes, tais marcadores, tornaram-se especiais para estudos em nível populacional, individual, bem como para análise de parentesco em pirarucu (Farias, 2003). Considerando a importância econômica desta espécie e o escasso número de informações sobre seus padrões de reprodução natural, formulamos a seguinte hipótese de trabalho:

H₀: A reprodução de *Arapaima gigas* (pirarucu), realiza-se na proporção de um macho para cada fêmea, apresentando um padrão reprodutivo monogâmico.

H₁: A reprodução de *Arapaima gigas* (pirarucu), realiza-se na proporção de mais de um macho para cada fêmea, ou vice versa, apresentando um padrão reprodutivo não monogâmico (poligâmico ou poliândrico).

1.7 – Objetivos

1.7.1 - Objetivo Geral

- Utilizar marcadores moleculares de microssatélites, para testar a paternidade em pirarucu (*Arapaima gigas*), com o intuito de fornecer

informações sobre o perfil genético da prole e o padrão do sistema reprodutivo de espécie.

1.7.2 - Objetivos Específicos

- Estimar os níveis de variabilidade genética nos ninhos estudados de uma população local de *Arapaima gigas*, através de marcadores moleculares repetitivos - microssatélites.
- Avaliar a variabilidade genética e relacioná-la com a paternidade dos filhotes estudados.
- Comparar os mecanismos de paternidade entre os ninhos estudados.

2. – Material e Métodos

2.1 – Locais de coleta e amostragem

As amostras utilizadas para esse estudo são provenientes de áreas, semi-abertas (lagos) e de cativeiro. As de ambientes semi-abertos são provenientes da Ilha de São Miguel (Santarém, PA), as de cativeiro são provenientes do município de Itacoatiara (Manaus, AM) e do município de Rio Preto da Eva (Manaus, AM).

2.1.1.- Características da área semi-aberta (lagos)

As amostras de ambiente semi-aberto (lagos) são provenientes da Ilha de São Miguel em Santarém-PA; onde vem sendo desenvolvido um projeto de estratégia de manejo do pirarucu em colaboração com o pesquisador do IPAM

(Instituto de Pesquisa Ambiental da Amazônia) Marcelo Crossa. Nessa região os lagos são monitorados e a coleta dos filhotes foi feita com u7m puçá, quando se observou um macho com uma “nuvem preta” de filhotes sobre sua cabeça. Para esse estudo, foram utilizados um total de 11 filhotes, oriundos de três ninhadas diferentes como mostra a tabela abaixo:

Tabela 1: Quantidade de filhotes de pirarucu provenientes de São Miguel (Santarém-PA).

São Miguel (Santarém- PA)	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Total
Filhotes	3	5	3	11 filhotes

2.1.2- Características das áreas de cativeiro (viveiros de barragem)

As amostras da área de cativeiro foram obtidas a partir de dois locais: Itacoatiara e Rio Preto da Eva, municípios que estão próximos de Manaus-AM.

Em Itacoatiara, as matrizes de pirarucu, são provenientes do aningais (vegetação típica dos lagos do local) localizados nas proximidades da cidade. São mantidas em viveiros de barragem a mais de sete anos. Foram obtidas duas amostragens provenientes de Itacoatiara, realizadas no período de 16 de março de 2005 e 14 de maio de 2005 respectivamente, cada uma corresponde a uma ninhada de casais de reprodutores diferentes, coletados nas mesmas condições das amostras de São Miguel.

Quando os filhotes foram coletados havia 68 pirarucus adultos no viveiro de barragem e não se tem conhecimento de quantos machos e fêmeas existiam

no local e, no período da coleta, apenas uma ninhada foi observada no viveiro (Bruno Cavero, professor da UFAM- comunicação pessoal).

Tabela 2: Quantidade de filhotes de pirarucu provenientes de Itacoatiara (Manaus-AM).

	Itacoatiara 1 (1 ninhada)	Itacoatiara 2 (1 ninhada)	Total
Filhotes	20	24	44 filhotes

Em Rio Preto da Eva, os 20 indivíduos adultos de pirarucu são mantidos, também em viveiros de barragem, a aproximadamente cinco anos; a procedência dessas matrizes não é conhecida ao certo, sabe-se apenas que existe um peixe proveniente da Bolívia e outro de Manacapuru (interior de Manaus), os demais são oriundos de trocas com piscicultores da região. No período desta coleta, apenas uma ninhada foi observada no viveiro (Alexandre Honczaryk, pesquisador do IMPA – Comunicação Pessoal). O número amostral de cada coleta (filhotes) das áreas de cativeiro pode ser visto na tabela abaixo:

Tabela 3: Quantidade de filhotes de pirarucu provenientes das áreas de cativeiro: Itacoatiara e Rio Preto da Eva - AM

Local de Coleta	Itacoatiara 1 (1 ninhada)	Itacoatiara 2 (1 ninhada)	Rio Preto da Eva	TOTAL
Filhotes	20	24	25	69 filhotes

2.2 - Extração do DNA e Amplificação dos locos microssatélites

Para a extração de DNA, foram utilizadas amostras de escamas e tecido da nadadeira caudal dos filhotes de pirarucu. Essas amostras foram mantidas em álcool e congeladas até a extração do DNA. O procedimento utilizado para a extração do DNA das escamas e do tecido dos filhotes, foi através do Kit de extração de DNA QIAGEN de acordo com o protocolo do fabricante.

Os *primers* dos *loci* de microssatélites utilizados foram desenvolvidos por Farias *et al.*, (2003), cujas características estão na tabela 04. Dos quatorze *loci* de microssatélites caracterizados, apenas nove (CAm2, CAm15, CAm13, CAm16, CTm3, CTm4, CTm5, CTm7 e CTm8) foram utilizados, para amplificação do DNA das amostras obtidas a partir de cada área de estudo.

A reação de PCR foi ajustada para um volume total de 10 μ L (para cada amostra) contendo 4,1 μ L de Água MilliQ, 0,81 μ L de MgC12 (25mM), 0,8 μ L de dNTP 2,5 mM para cada dNTP), 1,0 μ L de Tampão 10x Buffer (100 mM de Tris-HCl, 500 mM de KCl), 1,0 μ L do *primer forward* (2,0 mM) e 1,0 μ L do *primer reverse*, (2,0mM) 0,2 μ L de Taq Polimerase (5U/ μ l) e 1,0 μ L de DNA (aproximadamente 10 ng de DNA). As reações foram realizadas em um termociclador Thermo (PXE 0.2 — Thermal Cyclor).

A temperatura inicial de desnaturação foi de 92° C por 2 minutos, com um ciclo, seguida por 35 ciclos à 92° C por 40 segundos, 58° C (temperatura de anelamento do *primer*) por 35 segundos e 72° C por 1 minuto e 30 segundos. Em seguida um ciclo à 72° C com uma extensão final por 30 segundos e temperatura

final de quatro (4º C). Todos os *primers forward* foram marcados com fluorescências do tipo FAM -6 e HEX.

O produto da PCR foi visualizado em gel de agarose 0,8%, utilizando um DNA de 100bp (pares de bases) como marcador. Após essa etapa, preparou-se o mix de genotipagem com um volume final de 10uL.

Este mix continha 3ul do produto do PCR diluído 10 vezes com Água MilliQ, 0,25 ul do marcador de tamanho conhecido ET-400 (Amershan Bioscience) e 7,75 ul de Tween 20 (0,1%). Os mix de genotipagens foram colocados em uma placa, a qual foi aquecida a 93º C por 4 minutos (desnaturação do DNA).

Após os 4 minutos, a placa foi colocada imediatamente no gelo e em seguida analisadas em seqüenciador automático MegaBACE1000, com utilização de software específico para genotipagem (MegaBACE *Fragment Profiler*). Esse processo se repetiu para todos os microssatélites e amostras, utilizadas nesse trabalho.

Tabela 4: Características dos microssatélites desenvolvidos por Farias *et al.* (2003) utilizados na genotipagem das 80 amostras de filhotes de *A. gigas*. Sendo: Ta= temperatura de anelamento do primer, Ho= Heterozigosidade observada e He= Heterozigosidade esperada.

Loco	Tipo de Repetição	Tamanho do fragmento em pares de bases	Número de Alelos	Ta (°C)	Ho	He
CAm2	(CA)22	295-323	10	58	0,650	0,760
CAm13	(GTA)2(CA)27	300-334	12	58	0,725	0,733
CAm15	(CA)19	226-244	6	58	0,925	0,664
CAm16	(CA)19	247-273	5	58	0,587	0,603
CTm3	(CT)15	293-299	8	55	0,600	0,767
CTm4	(CT)22	275-283	4	58	0,450	0,525
CTm5	(CT)29	258-280	9	58	1	0,855
CTm7	(CT)29	277-299	11	58	0,975	0,862
CTm8	(CT)5 AT(CT)3 AT (CT)4	272-274	2	58	0,475	0,373
Media					0,710	0,682

2.3 - Análises Genotípicas

As genotipagens foram analisadas utilizando o programa MegaBACE Genetic Profiler e Fragment Profiler (versão 1.2), para que seja identificado o genótipo de cada locus para os indivíduos amostrados (Figura.5). Com isso foi construída uma matriz de dados individual para cada loco genotipado, com as informações dos genótipos presentes nos filhotes de *A. gigas* amostrados. Em seguida foram feitas as análises estatísticas para as amostras em estudo.

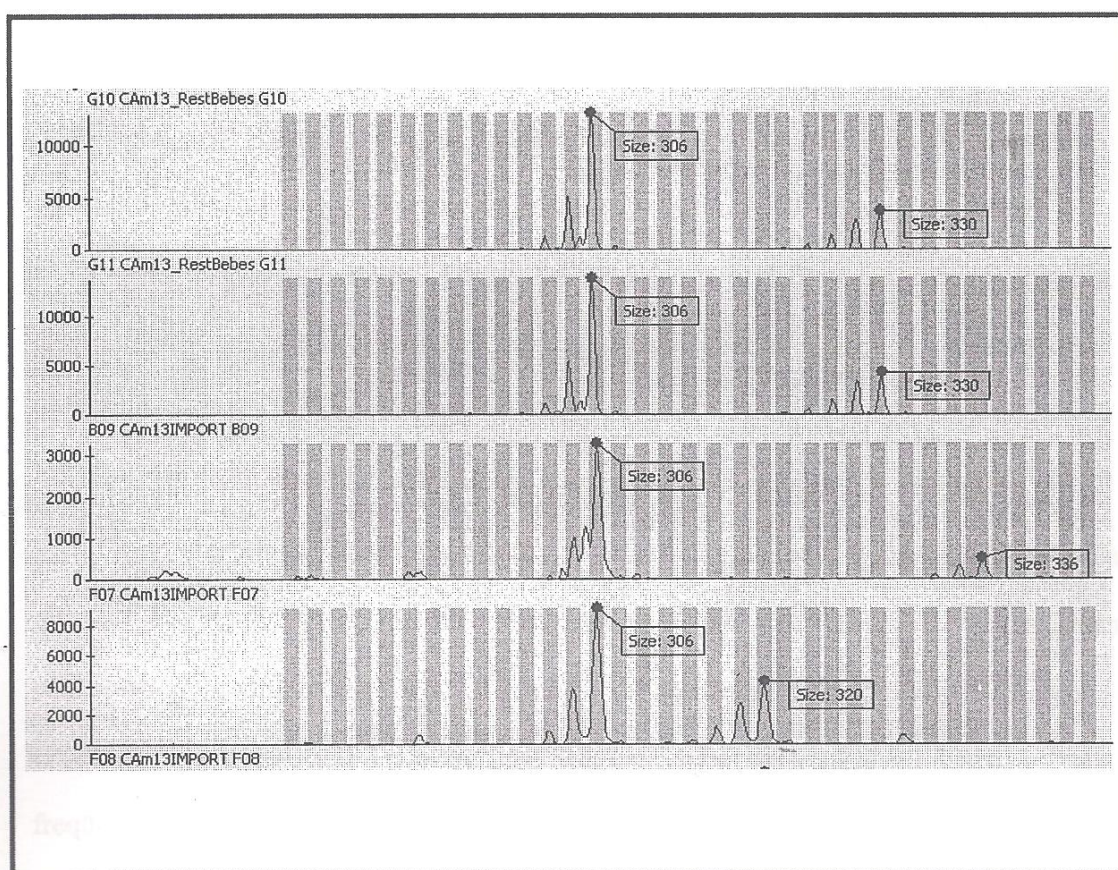


Figura 5: Variabilidade alélica do loco CAM13, visualizada no programa Fragment Profiler (versão 1.2).

2.4 - Análises Genéticas

Variações no tamanho dos *loci* microssatélites formam determinadas através da frequência de heterozigotos (observada e esperada) e testadas para o equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW). Testes de EHW podem resultar numa melhor visão de seleção. exocruzamento, endocruzamento, alelos nulos (que causa excesso de homozigotos devido a alelos não detectados) e efeito de Wahlund (excesso de homozigotos devido à união de populações geneticamente subdivididas).

Desta forma, estas análises foram implementadas no programa ARLEQUIN 3.01 (Excoffier *et al.*, 2005). A análise dos resultados neste programa permitiu o conhecimento da variabilidade genética dos indivíduos dos diferentes ninhos, emitindo a determinação do grau de diferenciação genética entre eles. A significância dos métodos foi avaliada por testes de permutação (1.000 - 10.000 replicações)

A variabilidade genética é quantificada por meio da heterozigosidade esperada (Nei 1973), usualmente chamada de diversidade genética (DG). A medida dessa variabilidade é feita por meio da diversidade (DA), que é o número de alelos de um locus em particular ou a média sobre todos os loci presentes em uma população.

Parâmetros, de estimativa da variabilidade genética, também foram feitos através das análises das frequências e distribuição dos alelos de cada locus microssatélites com o programa GENETIX v.4 (Belkhir *et al.*, 2004). O programa GENETIX também calcula a variabilidade genética por meio das análises das frequências e distribuição dos alelos de cada locus de microssatélites na

população total e por população, fornecendo gráficos, como diagnóstico, dos loci analisados com parâmetros como: número de alelos por locus, número de indivíduos em cada população e número de alelos por locus e por população.

2.5 – Análises de Parentesco

Com base nas frequências alélicas dos nove locos de microssatélites, calcularam-se as probabilidades de identidade genética (I), por loco e combinada, segundo Paetkau *et al.*(1995) e (Selvin, 1980). Da mesma forma, foram determinadas as probabilidades de exclusão de paternidade (Q) de exclusão conjunta (QC) dos locos analisados.

A probabilidade de identidade genética (I), é um parâmetro que demonstra o poder de discriminação dos *loci* de microssatélites nas amostras analisadas. Por exemplo: é a probabilidade de dois indivíduos, não relacionados, possuírem genótipos iguais, dentro de uma população. Quanto mais baixos os valores de identidade genética, maior será o potencial de discriminação dos microssatélites utilizados (Selvin, 1980).e (Slate *et al.*, 2000).

As probabilidades de exclusão de paternidade(Q) e de exclusão de paternidade conjunta (QC), são parâmetros que se baseiam na exclusão de vários machos, envolvidos no acasalamento, mais que podem ser estatisticamente distinguidos.

A partir deste parâmetro, não descobre quem é o pai mais provável. torna possível a exclusão de prováveis não-pais escolhidos ao acaso na população estudada. Por exemplo: se os valores de probabilidade de exclusão conjunta (QC) forem altos, ou seja, próximos de 1 ou 100%, indicam uma probabilidade de quase

100% de excluir corretamente um indivíduo não-pai escolhido ao acaso a população estudada.

Genótipos para todos os filhotes de uma única ninhada, foram usados para calcular coeficientes de relacionamento de pares e a relação de parentesco entre os ninhos (“*pairwise-relatedness coefficients*”). Os índices de relacionamentos entre pares de indivíduos, usando dados de microssatélites, foram obtidas através do programa de computador KINSHIP versão 1.2 (Goodnight, 2000). O programa *ML-RELATE* (Kalinowski *et al.*, 2006), também foi usado para calcular a estimativa de máxima erossemilhança de relacionamento e determinar o nível de parentesco entre os pares de indivíduos.

De acordo com Konovalov *et al.* (2004), o KINSHIP tem sido uma das mais poderosas e flexíveis plataformas para calcular o grau de parentesco, estimar o eficiente de relacionamento entre indivíduos e também para calcular a relação existente entre eles. Esse programa, não é dependente do conhecimento do genótipo dos pais e a partir das freqüências alélicas, pode-se gerar uma matriz de relacionamento para cada par de filhotes para estimar o coeficiente de relacionamento (r) em cada grupo estudado.

Para o cálculo desse coeficiente, é necessário uma estimativa prévia das freqüências dos alelos encontrados na população da qual os animais são provenientes. Desta forma, foram utilizados em nossas análises, indivíduos adultos de pirarucu, provenientes das localidades mais próximas da procedência de cada grupo de filhotes. Por exemplo, para a amostragem de Itacoatiara 1 e 2, utilizaram-se freqüências de Manaus (24 indivíduos); para a amostragem de Rio Preto da Eva, utilizaram-se freqüências de Manacapuru (11 indivíduos), Purus (21)

e Juruá (15). Para a amostragem de Santarém, utilizaram-se freqüências de Santarém (31 indivíduos). As genotipagens dos indivíduos destas localidades foram obtidas do banco de dados genéticos das populações de pirarucu pertencentes ao Grupo de pesquisa da Prof. Izeni Farias (dados não publicados).

O coeficiente de relacionamento varia de (-1 a 1), os valores de (-1 a 0) indicam os filhotes menos relacionados e os valores de (0 a 1) indicam os filhotes mais relacionados. Esses valores refletem a probabilidade dos indivíduos serem irmãos (hipótese 1) ou não (hipótese nula), dando a relação entre essas duas hipóteses. Altos valores da relação favorecem a hipótese 1 e baixo rejeitam em favor da hipótese nula. As situações consideradas para as análises foram duas: Hipótese 1= total irmandade (contribuição de 50% pela linhagem materna, e 50% pela linhagem paterna); Hipótese nula 1= não irmãos; Hipótese nula 2= meio-irmãos (relacionados apenas através de um dos pais).

O programa ML-RELATE segundo Kalinowski *et al.* (2006), assume que o parentesco genealógico é representado de forma convincente, por meio de probabilidades matemáticas baseadas em estimadores de máxima verossimilhança, por exemplo: probabilidades dos indivíduos compartilharem zero (K_0), um (K_1) ou dois (K_2), alelos entre todos os loci analisados. Dois indivíduos são considerados pai-filhotes (PO) quando $K_0 = 1$, $K_1 = 0$ e $K_2 = 0$; dois indivíduos são irmãos verdadeiros (FS), quando K_0 , K_1 e K_2 forem iguais a 0,25, 0,5 e 0,25 respectivamente. Os valores de 0- 0,125 correspondem a categoria de não relacionados (U); de 0,125 a 0,25 a primos; de 0,25 a 0,50 a meio irmãos; e de 0,50 a 1 a irmãos verdadeiros. (ver Lynch & Walsh (1998); Blouin (2003); Buckleton *et al.*, (2005) e Fernández & Toro (2006), para mais detalhes).

O *ML-RELATE* apresenta sumário estatístico que envolve: tamanho amostral para cada locus, número de alelos observados em cada locus, frequência alélica observada e heterozigidade esperada. Através de máxima verossimilhança o programa estima os níveis de relacionamento em quatro categorias de parentesco para cada par de indivíduos; não relacionados/U ($k_0=1$, $k_1=0$, $k_2=0$), meio-irmão/HS ($k_0=0,5$, $k_1=0,5$, $k_2=0$), irmãos - verdadeiros/FS ($k_0=0,25$, $k_1=0,5$, $k_2=0,5$) e Pai-filhotes/PO ($k_0=0$, $k_1=1$, $k_2=0$), fornecendo uma matriz dados corresponde a cada par de indivíduos.

3. Resultados

3.1 – Variabilidade Genética

Dos nove loci de microssateélites, genotipados para os filhotes amostrados, o locus CTm8 apresentou o menor número de alelos para as quatro amostragens (Tabela 5). Na maioria dos casos, os oito loci restantes mostraram considerável grau de polimorfismo. O número total de alelos detectados por locus polimórfico para todas as amostras de filhotes de pirarucu variou de 2 (CTm8) a 12 alelos (CAm13) (Figura 6).

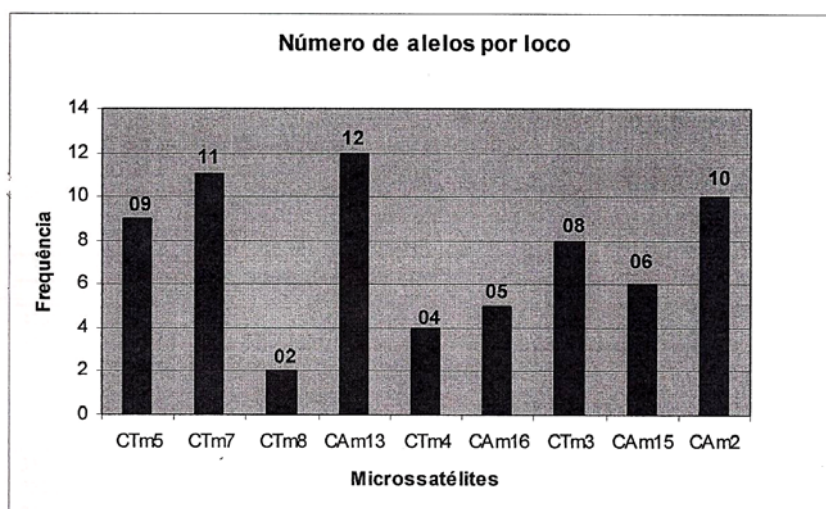


Figura 6: Número de alelos por locus das quatro amostragens de filhotes de pirarucu.

Tabela 5: Alelos e frequências dos nove *loci* de microsstatélites encontrados nas genotipagens, para as amostragens de Itacoatiara 1 & 2, Rio Preto da Eva e Santarém.

Amostras das áreas de cativeiro								
Itacoatiara 1								
CAm2	CAm13	CAm15	CAm16	CTm3	CTm4	CTm5	CTm7	CTm8
Alelos	Alelos	Alelos	Alelos	Alelos	Alelos	Alelos	Alelos	Alelos
297/0,25	305/0,35	231/0,50	256/0,72	294/0,12	280/0,30	260/0,17	281/0,17	277/0,77
299/0,07	319/0,37	247/0,22	258/0,27	296/0,10	286/0,70	274/0,22	295/0,20	279/0,22
311/0,52	339/0,02	249/0,27		298/0,52		280/0,27	301/0,30	
321/0,15				300/0,25		284/0,32	305/0,30	
Rio Preto da Eva								
297/0,34	317/0,04	231/0,28	254/0,66	284/0,22	280/0,24	256/0,26	277/0,26	277/0,78
299/0,30	319/0,78	239/0,22	256/0,34	294/0,10	286/0,76	268/0,24	289/0,24	279/0,22
311/0,24	321/0,14	247/0,50		296/0,24		280/0,24	297/0,28	
315/0,06				298/0,12		276/0,26	301/0,22	
325/0,06				300/0,30				
Itacoatiara 2								
297/0,20	303/0,04	231/0,50	256/0,72	294/0,06	280/0,22	260/0,25	281/0,25	277/0,68
299/0,14	305/0,43	247/0,35	258/0,25	296/0,14	286/0,77	274/0,29	293/0,04	279/0,31
311/0,54	319/0,14	249/0,14		298/0,20		280/0,20	295/0,29	
321/0,10	339/0,35			300/0,54		284/0,22	301/0,20	
				304/0,04			305/0,20	
Amostras da área semi-aberta								
Santarém grupo 1								
315/0,50	305/0,33	231/0,50	256/0,83	296/0,33	278/1,00	274/0,33	295/0,83	277/0,83
313/0,16	319/0,16	233/0,33	248/0,16	302/0,66		276/0,50	299/0,16	279/0,16
311/0,33	323/0,16	247/0,16				278/0,16		
	333/0,16							
	335/0,16							
Santarém grupo 2								
311/0,30	305/0,30	231/0,60	256/0,30	300/0,60	278/1,00	260/0,20	287/0,20	277/1,00
325/0,20	319/0,30	245/0,10	258/0,60	302/0,40		268/0,20	279/0,20	
313/0,10	329/0,20	247/0,30	260/0,10			276/0,30	295/0,30	
315/0,10	333/0,10					280/0,30	299/0,30	
327/0,20								
Santarém grupo 3								
325/0,75	305/0,50	247/0,66	254/0,50	300/0,50	278/0,83	268/0,16	287/0,16	277/0,66
	335/0,50	231/0,33	258/0,33	302/0,16	284/0,16	276/0,50	295/0,50	279/0,33
			260/0,16	296/0,33		278/0,33	297/0,33	

3.2 – Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) e Índices de diversidade genética.

A heterozigiosidade média observada (H_o) e esperada (H_e), sobre todos os *loci*, para cada localidade variou de 0,71 (amostragem de Rio Preto da Eva) a 0,73 (amostragem de Itacoatiara 1) (Tabela 6). Os índices de diversidade genética variaram de $0,584 \pm 0,31$ (RPE) a $0,620 \pm 0,34$ (STM). A diferença entre os pares variou de $4.580 \pm 2,77$ (STM) a $5,261 \pm 2,58$ (RPE). A amostragem de Santarém apresentou a maior diversidade ($0,620 \pm 0,34$) dentre todas as amostragens analisadas. A amostragem de Rio Preto da Eva foi a que apresentou menor diversidade genética ($0,584 \pm 0,31$) (Tabela 6).

Os valores de H_o e H_e , obtidos a partir de cada loco de microssatélite, para cada amostragem está discriminado na Tabela 7. O valor de endogamia (FIS), calculado para as quatro amostragens, foi baixo e não significativo (0.19777), entre os indivíduos; indicando pouca quantidade de homozigotos dentro de cada grupo analisado.

Tabela 6. Médias da diversidade genética e equilíbrio de Hardy-Weinberg em amostras filhotes de pirarucu das quatro localidades estudadas.

População	N	Diversidade Genética	Diferenças entre os pares	Nº de Alelos	HWE $H_o - H_e$
Ita. 1	20	$0,597 \pm 0,32$	$5,376 \pm 2,64$	3,5	$0,73 - 0,601$
R.P.E.	25	$0,584 \pm 0,31$	$5,261 \pm 2,58$	3,6	$0,71 - 0,517$
Ita. 2	24	$0,594 \pm 0,32$	$5,350 \pm 2,62$	3,7	$0,72 - 0,598$
S.T.M.	11	$0,620 \pm 0,34$	$4,580 \pm 2,77$	<u>4,5</u>	$0,72 - 0,647$
Todas	80	$0,681 \pm 0,36$	$6,132 \pm 2,93$	3,8	$0,71 - 0,683$

Tabela 7. Valores de Heteroziguidade Observada e Esperada por *locus* por população. N: Número de alelos; H_o: Heteroziguidade Observada; H_e: Heteroziguidade Esperada. Valores significantes em negrito.

Locus	Itacoatiara 1			Rio Preto da Eva			Itacoatiara 2			Santarém		
	Ho	He	P	Ho	He	P	Ho	He	P	Ho	He	P
CAm2	0,5	0,652	0,082	0,72	0,75	<0,001	0,666	0,644	0,260	0,727	0,878	0,051
CAm13	0,95	0,712	0,051	0,36	0,408	0,108	0,792	0,675	0,004	1	0,818	0,810
CAm15	1	0,639	<0,001	1	0,635	<0,001	1	0,616	<0,001	0,455	0,636	0,349
CAm16	0,55	0,408	0,258	0,60	0,457	0,185	0,541	0,414	0,342	0,727	0,771	0,655
CTm3	0,5	0,652	0,006	0,80	0,81	<0,001	0,458	0,650	<0,001	0,636	0,662	0,311
CTm4	0,6	0,43	0,115	0,48	0,372	0,276	0,458	0,393	0,292	0,090	0,177	1
CTm5	1	0,756	<0,001	1	0,764	<0,001	1	0,772	<0,001	1	0,797	0,675
CTm7	1	0,767	<0,001	1	0,763	<0,001	1	0,780	<0,001	0,818	0,757	0,946
CTm8	0,45	0,396	0,527	0,44	0,381	0,296	0,625	0,439	0,055	0,273	0,325	1
Média	0,73	0,601		0,711	0,517		0,727	0,598		0,727	0,647	

Todas as amostras										
Locus	CAM2	CAM13	CAM15	CAM16	CTm3	CTm4	CTm5	CTm7	CTm8	Média
Ho	0,65	0,725	0,925	0,588	0,6	0,45	1	0,98	0,475	0,710
He	0,759	0,734	0,665	0,603	0,768	0,525	0,856	0,863	0,374	0,683
P	<0,001	0,014	<0,001	0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	0,004	

3.4 – Potencial dos microssatélites para as análises de parentesco

Com relação ao poder desses microssatélites para análises de paternidade e de parentesco, a probabilidade de identidade genética (I) variou de 0,08279595 (CAm2) a 4,44454820 (CTm8); já a probabilidade de exclusão de paternidade (Q), variou de 0,18473263 (CTm8) a 0,54149703 (CAm2).

O resultado de probabilidade de identidade genética conjunta (IC) foi baixo ($4,88461818 \times 10^{-7}$), demonstrando o alto poder de discriminação desses locos nos filhotes de *A. gigas*. A probabilidade de exclusão conjunta (QC) calculada foi alta 0,98725124), indicando uma probabilidade de quase 99% de excluir corretamente um indivíduo não-pai escolhido ao acaso na população (Tabela 8).

Tabela 8 - Características dos locos microssatélites analisados em *A. gigas*. Sendo: A= número de alelos, Ho=Heterozigosidade observada, I= probabilidade de identidade genética, Q=probabilidade de exclusão de paternidade, IC= probabilidade combinada de identidade genética, QC= probabilidade de exclusão conjunta para os cinco locos.

Loco	A	Ho - He	I	Q
CTm5	6	0,856	0,16056195	0,44771069
CTm7	6	0,863	0,16056195	0,44771069
CTm8	3	0,374	0,44454820	0,18473263
CAm13	7	0,734	0,10196567	0,53299453
CTm4	3	0,450	0,26259521	0,31985706
CAm16	6	0,588	0,33671193	0,24472912
CTm3	3	0,600	0,22525884	0,32435706
CAm15	5	0,925	0,25347567	0,31015709
CAm2	7	0,650	0,08279595	0,54149703
Média	4,286	0,671	IC= $4,88461818 \times 10^{-7}$	QC= 0,98725124

3.5 – Análise de Parentesco

Considerando o conjunto de alelos encontrado nos grupos de filhotes, de cada localidade estudada, e a ausência das amostras dos pais, iniciamos com uma análise simples, com base nos padrões básicos de herança mendeliana, ou seja, considerando que cada filhote possui 50% do genótipo da mãe e 50 % do genótipo do pai naturalmente, a quantidade de alelos encontrados nas genotipagens de cada filhote seria de no máximo quatro, caso os dois pais fossem heterozigotos.

A presença de cinco alelos na ninhada sugere uma possível contribuição extra de um dos pares do acasalamento (dois alelos maternos, dois alelos de um macho, e o quinto de um extra-par). A quantidade de homozigotos presentes no conjunto de alelos dos filhotes foi importante para se fazer uma pré-estimativa de quantos indivíduos adultos poderiam estar contribuindo geneticamente em cada grupo de filhotes (Tabela 9). Por exemplo, um dado alelo materno pode ser inferido quando um filhote é homozigoto de um dado locus (AA), e o genótipo maternal completo pode ser inferido, quando filhotes são homozigotos para dois diferentes alelos (AA e BB; genótipo materno = AB).

Dos *loci* analisados, neste estudo, dois CAm2 e CTm3 (ambos nas amostras de RPE), apresentaram cinco alelos nas ninhadas analisadas das áreas de cativeiro (Figura 7). Esse resultado sugere que, para o *locus* CAm2, quando observamos o genótipo do único filhote homozigoto (297/297), e inferimos que um dos pais possui o genótipo 297/299, podemos sugerir três possibilidades (A, B e C) para o aparecimento dos alelos 299, 315 e 325 observados na prole (ver figura 7).

Possibilidade A: digamos que o genótipo dos pais seja 297/299 x 297/i; os genótipos dos filhotes seria: 297/297, 297/299, i /297 e i / 299, isso explicaria o aparecimento do homozigoto 297/297 nas genotipagens feitas com o locus CAm2.

Possibilidade B: considerando que o genótipo dos pais seja 297/299 x 325i, os genótipos dos filhotes serão 297/325, 297/i, 299/325 e 299/i, justificando a presença do alelo 325 e do genótipo 299/311, que aparece doze vezes nas genotipagens desses filhotes com o locus CAm2.

Possibilidade C: tendo como genótipo dos pais 315/i x 297/299 e dos filhotes 315/297, 315/299, i/297 e i/299, podemos explicar a presença do alelo 315 no genótipo desses filhotes.

Diante dessas três possibilidades para o CAm2, percebemos que no mínimo três indivíduos adultos contribuíram geneticamente para essa ninhada.

No caso do loco CTm3, para a mesma ninhada, temos a presença de dois filhotes homozigotos (alelos 300 e 298), sugerindo duas alternativas: 1^a- a presença de pelo menos dois casais diferentes contribuindo geneticamente para essa ninhada, que poderia explicar a presença dos alelos 284, 294 e 296, visto que eles aparecem no mínimo 3 vezes no genótipo dos filhotes; 2^a - a presença de dois pares iguais de heterozigotos (298/300 x 298/300) para explicar a presença dos alelos 300 e 298 na ninhada.

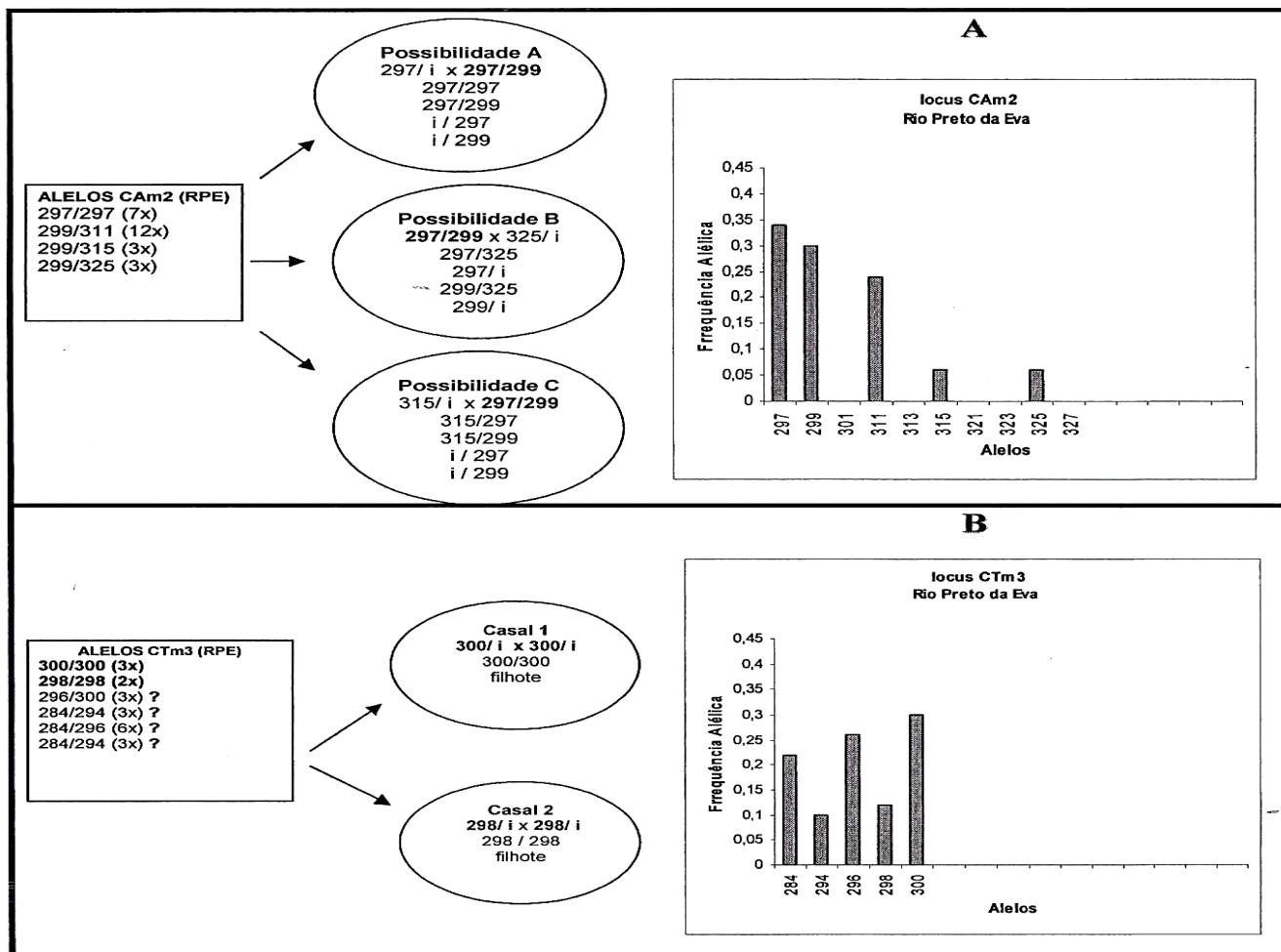


Figura 7: Alelos encontrados nos filhotes de Rio Preto da Eva, onde A (loco CAm2) e B (loco CTm3).

Tabela 9: Quantidade de Homozigotos (Hm) e Heterozigotos (Ht) presentes no conjunto alélico, dos filhotes de pirarucu, de cada localidade estudada.

Amostras Cativeiro						
Loco	Itacoatiara 1		Rio Preto da Eva		Itacoatiara 2	
Alelos	Hm	Ht	Hm	Ht	Hm	Ht
CAm2	6/311, 3/297,1/299	10	7/297	18	6/311	18
CAm13	1/305	19	13/319,1/317	11	4/305	20
CAm15	0	20	0	20	0	24
CAm16	9/256	11	9/254,1/256	15	10/256	14
CTm3	7/298,3/300	10	3/300,2/298	20	9/300,3/298	13
CTm4	8/286	12	13/286	12	13/286	11
CTm5	0	20	0	25	0	24
CTm7	0	20	0	25	0	24
CTm8	11/277	9	14/277	11	9/277	15
Total	49	131	63	157	42	163

Amostras de Áreas Semi-abertas (lagos)						
Loco	Santarém Grupo 1		Santarém Grupo 2		Santarém Grupo 3	
Alelos	Hm	Ht	Hm	Ht	Hm	Ht
CAm2	0	3	1/311	4	1/325	1*
CAm13	0	3	0	5	0	3
CAm15	1/231	2	2/231	3	2/247,1/231	0
CAm16	2/256	1	1/258	4	0	3
CTm3	1/302	2	1/300	4	1/300,1/296	1
CTm4	0	3	0	5	0	3
CTm5	0	3	0	5	0	3
CTm7	0	3	0	5	0	3
CTm8	2/277	1	5/277	0	1/277	2
Total	6	21	10	35	7	18

Considerando-se que ataxa de mutação de microssatélites, em peixes, é de 2×10^{-3} por geração (Jones *et al.*, 1999), existe a probabilidade de que ocorra o aparecimento de novos alelos que não sejam provenientes de relacionamento entre os pares. Desta forma, assumimos a seguinte situação: se um grupo de filhotes apresentou um alelo inesperado, em um único locus, esse alelo pode ser proveniente de uma mutação nova; mas, se esse quadro se repetiu em diferentes locos de microssatélites no mesmo indivíduo, poderemos inferir que esses alelos são provenientes de pais diferentes, sugerindo uma contribuição extra de um dos pares do acasalamento. Assim, os alelos derivados de novas mutações foram excluídos das análises.

3.5 – Coeficiente de relacionamento (r)

- **Grupos de filhotes de áreas de cativeiro:** as matrizes de relacionamento para cada par de filhotes, de cada localidade, geradas no programa KINSHIP; mostraram que as médias dos coeficientes de relacionamento variaram de 0,480 (Ita 2 e RPE) a 0,51 (Itacoatiara); com máxima de 1,00 em Itacoatiara 1 e Rio Preto da Eva, e mínima de - 0,076 em Itacoatiara 2, como descrito na Tabela 10, A distribuição dos valores de (r) podem ser observados nos gráficos da figura 8.

Tabela 10: Valores de relacionamento (mínimo, médio e máximo) observados nas matrizes entre cada par de filhotes, de cada grupo estudado nas áreas de cativeiro.

Localidades	Ita 1	RPE	ITA2	Todos da área de cativeiro
Mínima	0,05	-0,12	-0,08	0,05
Média	0,51	0,48	0,48	0,48
Máxima	1	1	0,94	0,85

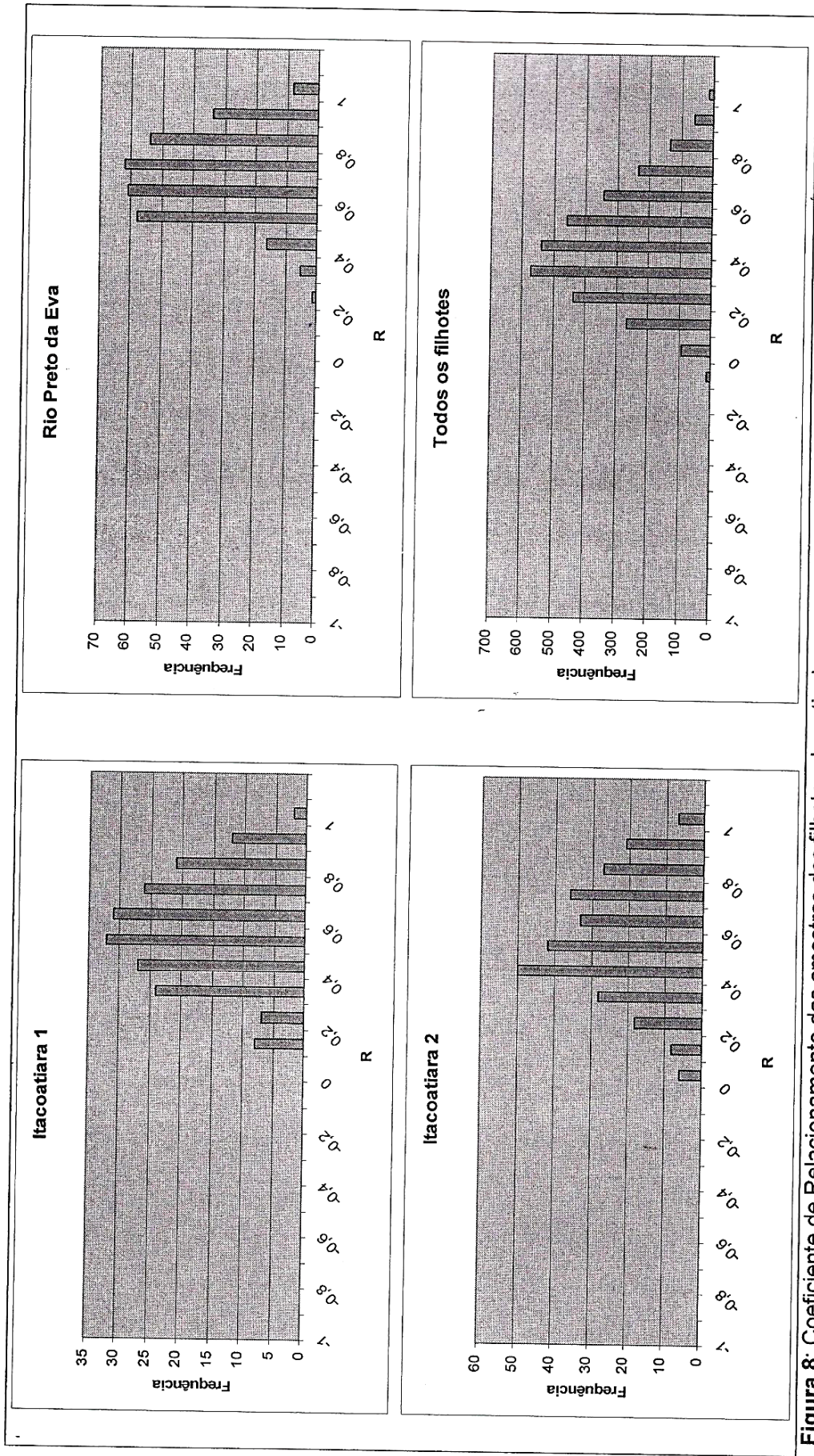


Figura 8: Coeficiente de Relacionamento das amostras dos filhotes de cativeiro.

- **Grupos de filhotes de áreas semi-abertas (lagos):** nos filhotes de Santarém, as médias dos coeficientes de relacionamento variaram de 0,46 (STM G2) a 0,80 (STM G3); com máxima de 0,73 no grupo 1 e mínima de 0,29, também no grupo 1, como descrito na tabela 11. Os valores do coeficiente de relacionamento (r), variaram de 0,20 (STM G2) a aproximadamente 1,00 grupo 3 de Santarém, indicando que, no geral, todos os filhotes são relacionados, mas podemos observar no grupo 2 a presença de dois subgrupos mais relacionados, um com (r) entre (0,20-0,50) e (0,60-0,90) respectivamente, A distribuição dos valores de (r) podem ser observados na figura 09.

Tabela 11: Valores de relacionamento (mínimo, médio e máximo) observados nas matrizes entre cada par de filhotes, de cada grupo estudado nos filhotes de Santarém.

Localidades	STM G1	STM G2	STM G3	Todos da área de cativeiro
Mínima	0,29	0,34	0,49	0,29
Média	0,51	0,46	0,80	0,51
Máxima	0,73	0,66	0,62	0,73

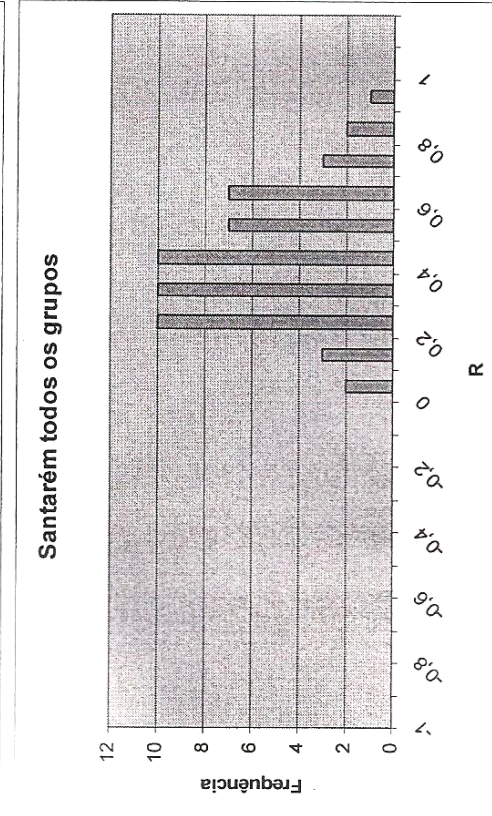
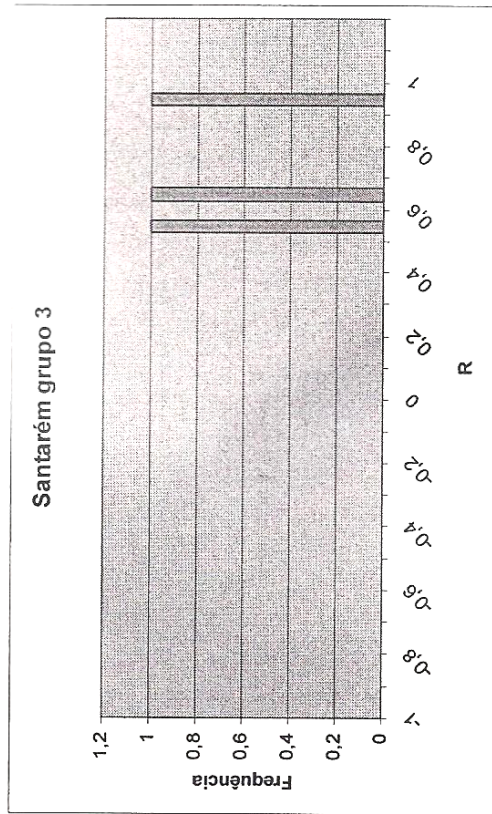
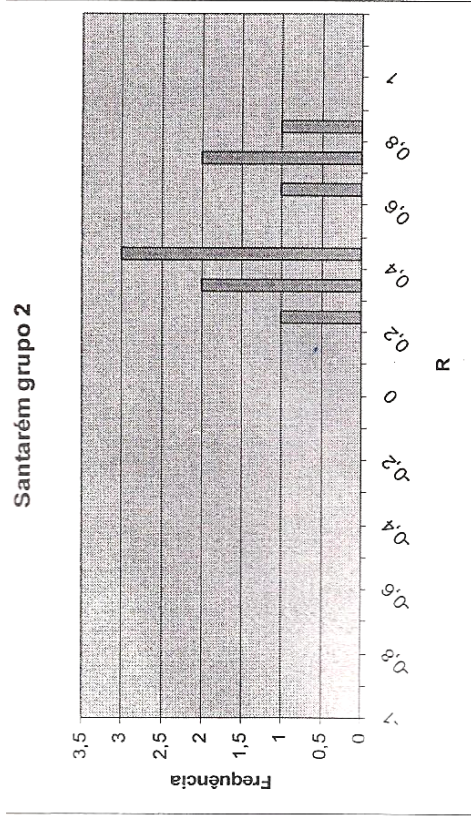
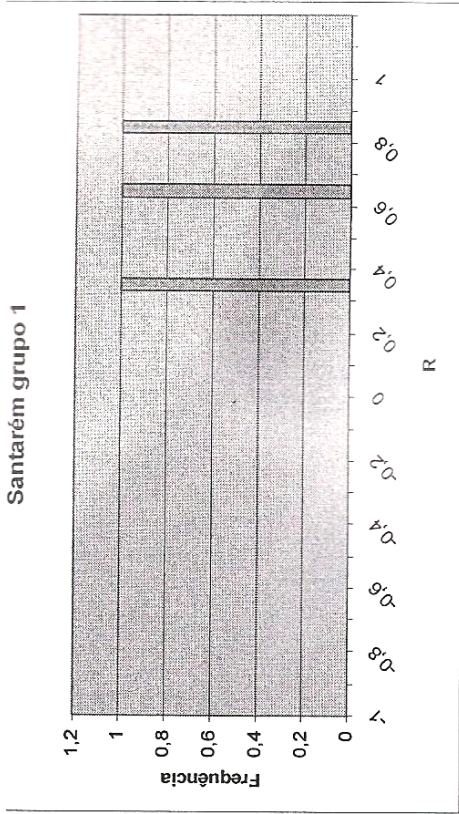


Figura 9: Coeficiente de Relacionamento das amostras dos filhotes de áreas semi-abertas (Santarém).

3.6 – Categorias de relacionamento:

As matrizes de categorias de relacionamento, fornecidas pelo programa *ML-RELATE*, mostraram as comparações feitas entre cada par de filhotes de cada grupo estudado. Os resultados mostram que tanto nos grupos de cativeiro, como nos grupos de área semi-aberta, a maior frequência observada nos filhotes é da categoria não relacionados (U) (Figura 10 e 11); mesmo quando analisamos cada grupo separadamente, assim como, quando estão todos juntos formando dois grandes grupos: todos os grupos de cativeiro e todos de Santarém.

Esses resultados sugerem a existência de subgrupos dentro de cada grupo de filhotes analisados; isso é devido às probabilidades matemáticas, baseadas em estimadores de máxima verossimilhança, calculadas no programa *ML-RELATE*. Quando as comparações são feitas, irmandades são agrupadas de acordo com os alelos compartilhados entre os filhotes, em que (k) , é uma constante das categorias de relacionamento, ou seja, indica as probabilidades dos alelos dos indivíduos, não compartilharem alelos (K_0), compartilharem um (K_1) ou dois (K_2), alelos entre todos os loci analisados. Dois indivíduos são considerados pai-filhote (PO) quando $K_0 = 1$, $K_1 = 0$ e $K_2 = 0$; irmãos verdadeiros (FS), quando K_0, K_1 e K_2 forem iguais a 0,25, 0,5 e 0,25, - meio-irmãos (HS), quando K_0, K_1 e K_2 forem iguais a 0,50, 0,50 e 0 e não-relacionados quando K_0, K_1 e K_2 forem iguais a 1, 0 e 0, respectivamente (Kahnowski *et al.*, 2006).

Baseando-se nessas comparações e no compartilhamento de alelos, os filhotes presentes em cada irmandade, quando comparados uns com os outros, são classificados dentro de cada categoria, numa matriz de relacionamento. Quando analisamos separadamente cada matriz, percebemos que: em Itacoatiara

1, as comparações feitas entre cada par de filhotes mostram a presença de três categorias de relacionamento irmãos-verdadeiros (FS), meio-irmãos (HS) e não-relacionados (U). Para essa amostragem, notamos que 66 comparações entre filhotes, apresentaram duas categorias de relacionamento, onde uma não pode ser descartada em função da outra, por exemplo: na comparação dos filhotes IT1-01/IT1-02, temos a presença das categorias FS/HS (ver tabela 13).

Nos filhotes de Itacoatiara 2 e Rio Preto da Eva, essas mesmas condições se repetem, sendo que em ITA-2 e RPE, notamos que, respectivamente, apenas 29 e 32 comparações entre os filhotes apresentaram duas categorias de relacionamento.

Os valores médios e as freqüências observadas em cada categoria, para cada grupo, das áreas de cativeiro e semi-aberta, estão discriminados na tabela 12.

Tabela 12: Freqüências das categorias de relacionamento dos filhotes de pirarucu das áreas de cativeiro e de área semi-aberta.

Grupos de Cativeiro			
Localidades	Categorias de relacionamento		
	FS	HS	U
ITA 1	38	13	139
ITA 2	58	20	195
RPE	60	22	210
Média	52	18,33	181,33
TODOS	477	254	1615

Grupos de área semi-aberta			
Localidades	Categorias de relacionamento		
	FS	HS	U
STM G1	0	0	3
STM G2	1	0	9
STM G3	1	0	2
Média	0,67	0	4,67
TODOS	3	4	48

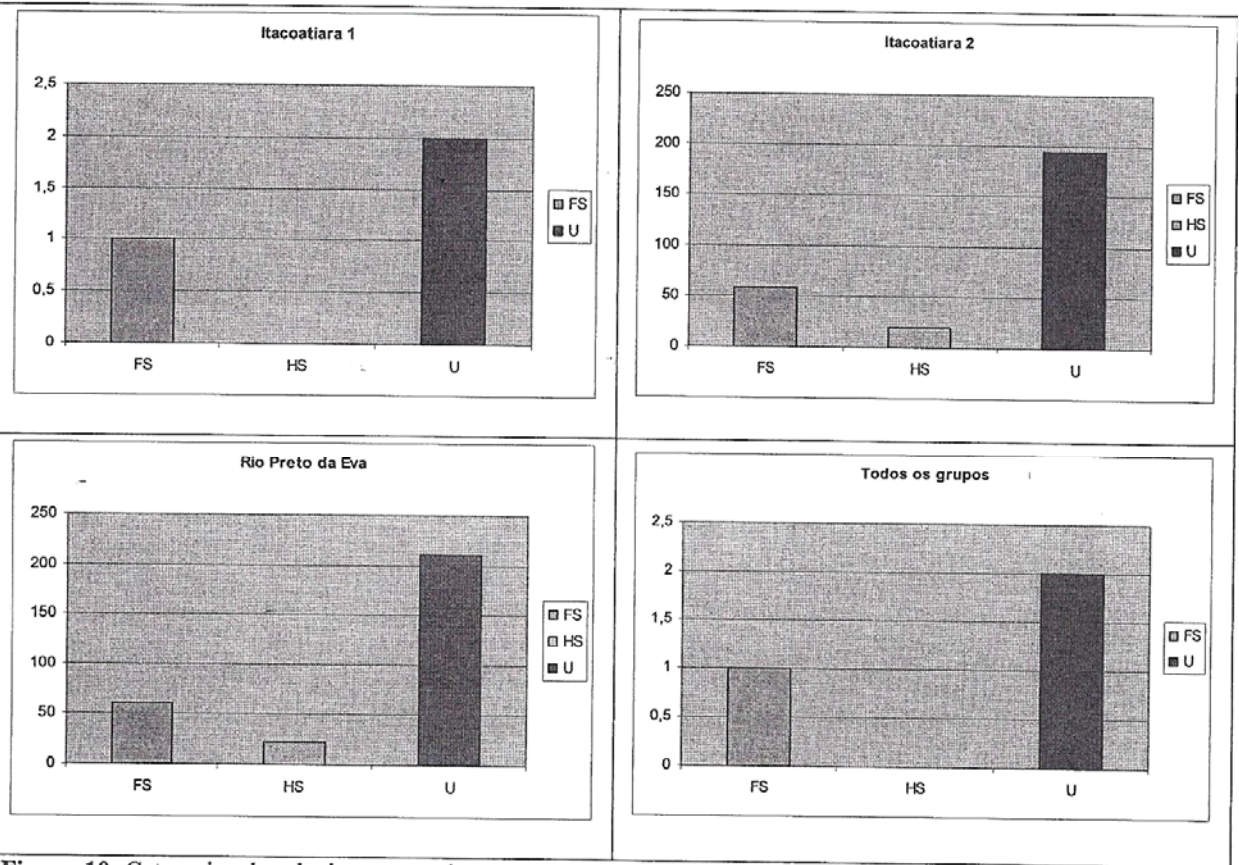


Figura 10: Categorias de relacionamento irmãos-verdadeiros (FS), meio-irmãos (HS) e não-relacionados (U), dos filhotes das áreas de cativeiro.

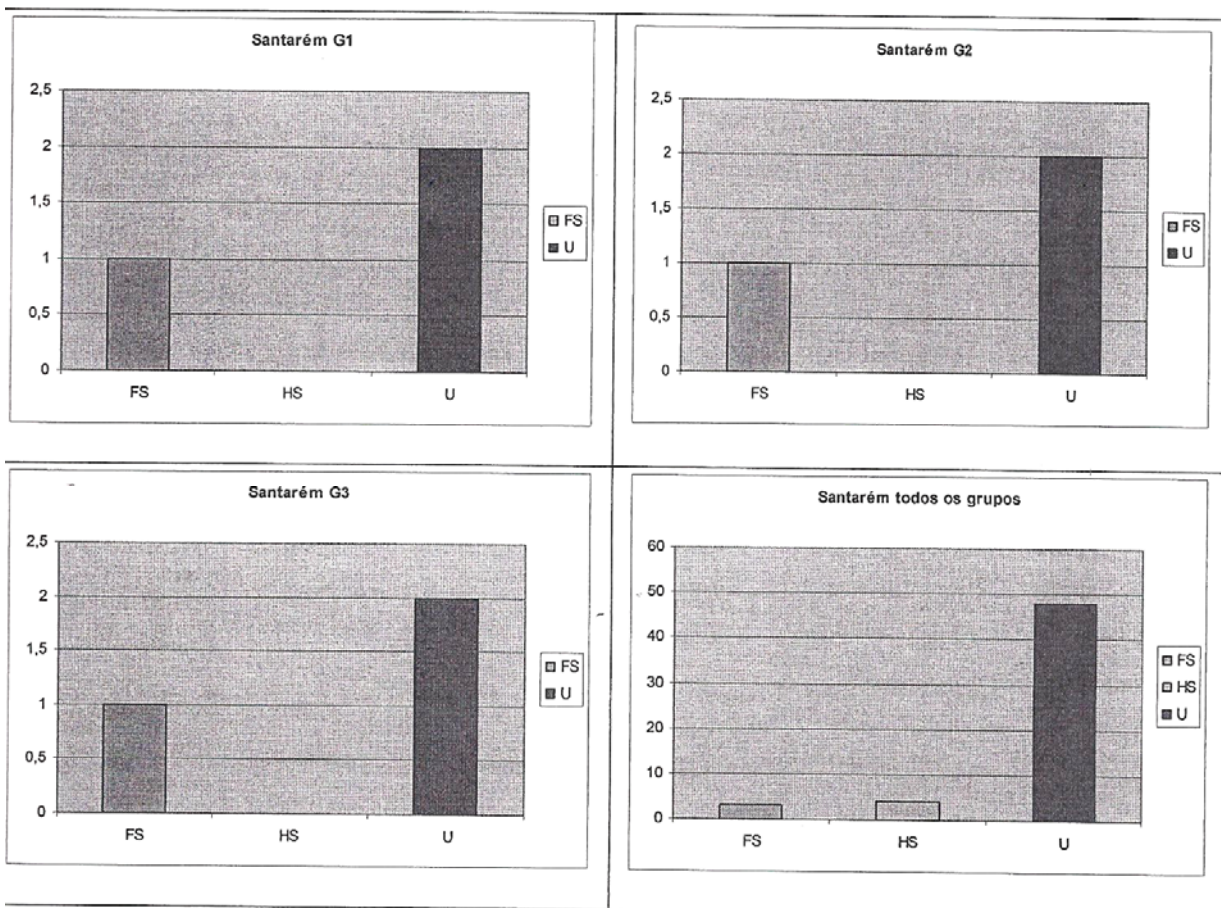


Figura 11: Categorias de relacionamento irmãos-verdadeiros (FS), meio-irmãos (HS) e não-relacionados (U), dos filhotes da área semi-aberta (Santarém).

Tabela 13: Matriz das categorias de relacionamento do grupo de filhotes de pirarucu, provenientes de Itacoatiara 1. Sendo: FS= irmãos-verdadeiros, HS= meio-irmãos e U= não relacionados. Dados com nível de significância = 0,05.

ITACOATIARA I																				
	ITI-01	ITI-02	ITI-03	ITI-04	ITI-05	ITI-06	ITI-07	ITI-08	ITI-09	ITI-10	ITI-11	ITI-12	ITI-13	ITI-14	ITI-15	ITI-16	ITI-17	ITI-18	ITI-19	ITI-20
ITI-01																				
ITI-02	FS/HS																			
ITI-03	FS/U	U/HS																		
ITI-04	U/HS	U	FS/U																	
ITI-05	U/HS	U	FS	FS/HS																
ITI-06	FS/HS	U/HS	HS/U	FS/HS	U															
ITI-07	U/HS	U/HS	U/HS	U/HS	U	U														
ITI-08	U/HS	U/HS	U/HS	U	U	FS														
ITI-09	HS/U	PO/U	U/HS	U	U	U	U													
ITI-10	FS/U	U/HS	HS/U	PO/U	U	FS/HS	U	U												
ITI-11	U/HS	U/HS	U/HS	U	U	FS/U	U	U	U											
ITI-12	U/HS	U/HS	U/HS	U	U	FS	FS/HS	U	U	FS/HS										
ITI-13	U/HS	U/HS	U/HS	HS/U	U	U	U	FS/HS	HS/U	U	FS/HS									
ITI-14	U	U	U/HS	U	U	U	U	U	FS/HS	HS/U	U	U								
ITI-15	U	U	U/HS	U	FS/HS	U	U	U	U	FS/HS	FS	U	HS/U							
ITI-16	FS/HS	U/HS	FS	U	FS	U	FS/U	U	U	FS/HS	U	U	U	U						
ITI-17	FS/HS	HS/U	U/HS	HS/U	U	U	U	U	FS/HS	U	U	U	U	U	U					
ITI-18	U/HS	U/HS	U/HS	U	U	HS/U	U	U	U	U	FS/HS	U	U	U	U	U			U	
ITI-19	U/HS	HS/U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	HS/U	U	U	HS/U	U	U	HS/U	FS
ITI-20	U/HS	U/HS	U/HS	U	U	U	U	U	U	HS/U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U

Tabela 14: Matriz das categorias de relacionamento do grupo de filhotes de pirarucu, provenientes de Itacoatiara 2. Sexo: ♂- irmãos-verdadeiros, HS= meio-irmãos e U= não relacionados. Dados com nível de significância = 0,05.

		ITACOATIARA 2																							
		IT2-46	IT2-47	IT2-48	IT2-49	IT2-50	IT2-51	IT2-52	IT2-53	IT2-54	IT2-56	IT2-57	IT2-58	IT2-59	IT2-60	IT2-61	IT2-62	IT2-63	IT2-64	IT2-65	IT2-66	IT2-67	IT2-68	IT2-69	
IT2-46	-																								
IT2-47	U																								
IT2-48	U																								
IT2-49	FS																								
IT2-50	U																								
IT2-51	U																								
IT2-52	FS/HS																								
IT2-53	U																								
IT2-54	U																								
IT2-56	U																								
IT2-57	U																								
IT2-58	U																								
IT2-59	FS																								
IT2-60	U																								
IT2-61	U																								
IT2-62	FS																								
IT2-63	U																								
IT2-64	U																								
IT2-65	FS																								
IT2-66	U																								
IT2-67	U																								
IT2-68	U																								
IT2-69	U																								
IT2-70	FS																								

Apêndice 1b: Matriz das categorias de relacionamento do grupo de filhotes de pirarucu, provenientes de Rio Preto da Eva. Sendo: FS= irmãos-verdadeiros, HS= meio-irmãos e U= não relacionados. Dados com nível de significância = 0,05.

		RIO PRETO DA EVA																									
		RP-21	RP-22	RP-23	RP-24	RP-25	RP-26	RP-27	RP-28	RP-29	RP-30	RP-31	RP-32	RP-33	RP-34	RP-35	RP-36	RP-37	RP-38	RP-39	RP-40	RP-41	RP-42	RP-43	RP-44	RP-45	
RP-21	-																										
RP-22	U																										
RP-23	U	FS/HS																									
RP-24	U	FS/U	FS																								
RP-25	U	U	U	HS/U	-																						
RP-26	U	U	U	U	U																						
RP-27	U	U	HS/U	U	U	FS	-																				
RP-28	FS/HS	U	U	U	U	HS/U	HS/U	-																			
RP-29	U	U	U	U	U	U	U	U																			
RP-30	FS	U	U	U	U	HS/U	U	U	FS	U	-																
RP-31	HS/U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	FS	-														
RP-32	U	FS	FS	FS/U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	FS	-												
RP-33	U	FS	FS	FS	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	FS	-										
RP-34	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	FS	-							
RP-35	HS/U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	FS	-					
RP-36	U	FS/HS	FS	FS	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	FS/HS	-		
RP-37	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U
RP-38	FS	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U
RP-39	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U
RP-40	U	HS/U	FS	FS	HS/U	HS/U	HS/U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U
RP-41	U	HS/U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U
RP-42	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U
RP-43	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U
RP-44	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U
RP-45	U	U	U	U	U	FS	U	U	HS/U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U

Tabela 16: Matriz das categorias de relacionamento do grupo de filhotes de pirarucu, provenientes de área semi-aberta (Santarém) . Sendo: FS= irmãos-verdadeiros, HS= meio-irmãos e U= não relacionados. Dados com nível de significância = 0,05.

SANTARÉM TODOS OS GRUPOS											
	ST-I.1	ST-I.2	ST-I.3	ST-2.1	ST-2.2	ST-2.3	ST-2.4	ST-2.5	ST-3.1	ST-3.2	ST-3.3
ST-I.1	-										
ST-I.2	HS	-									
ST-I.3	HS/U	U	-								
ST-2.1	U	U	U	-							
ST-2.2	U	U	U	FS/HS	-						
ST-2.3	U	U	U	U	HS/U	-					
ST-2.4	U	U	U	U	U	U	-				
ST-2.5	U	HS/U	U	U	U	U	HS/U	-			
ST-3.1	U	U	U	U	U	U	U	U	-		
ST-3.2	U	U	U	U	U	U	U	U	FS	-	
ST-3.3	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	-

SANTARÉM- G1				SANTARÉM- G3			
	ST-I.1	ST-I.2	ST-I.3		ST-3.1	ST-3.2	ST-3.3
ST-I.1	-				ST-3.1	-	
ST-I.2	U	-			ST-3.2	FS/HS	-
ST-I.3	U	U	-		ST-3.3	U	U

SANTARÉM- G2					
	ST-2.1	ST-2.2	ST-2.3	ST-2.4	ST-2.5
ST-2.1	-				
ST-2.2	FS/U	-			
ST-2.3	U	U	-		
ST-2.4	U	U	U	-	
ST-2.5	U	U	U	U	-

4. Discussão

Este trabalho investigou a eficiência dos microssatélites para análises de parentesco em filhotes de pirarucu (*Arapaima gigas*), com o auxílio de programas computacionais, atualmente utilizados, para estimar relações de parentesco ou categorias de relacionamento entre indivíduos. Os resultados mostram que as informações, obtidas por meio das relações de parentesco, geram uma ferramenta poderosa para avaliar o sistema ou padrão reprodutivo dessa espécie, mostrando quais as possíveis estratégias ou táticas reprodutivas que podem ser utilizadas pelos pirarucus para a manutenção da diversidade genética.

4.1 – Variabilidade genética das amostras estudadas

Altos níveis de variabilidade genética e baixos níveis de endocruzamento, são os maiores objetivos dos programas de conservação. A variação genética é um pré-requisito para que as populações estejam aptas para possíveis mudanças e para os processos naturais de seleção (Frankham *et al.*, 2002).

Quando observamos os valores de heterozigosidade observada e esperada, percebemos que, em sua maioria, a H_o é maior que a H_e (ver tabela 7). Esses valores não correspondem aos valores encontrados para *Arapaima gigas* nos estudos já realizados, com populações naturais desta espécie, pelos autores Hrbek *et al.* (2005) e Farias *et al.* (2006). Acreditamos que nossos resultados são fruto de uma amostragem não aleatória, pois é constituída de filhotes proximamente relacionados.

Entretanto, a variabilidade alélica, encontrada no filhotes de pirarucu, analisados neste trabalho, são congruentes com os valores encontrados nas

populações naturais de Manaus e Santarém, estudadas por Farias *et al.* (2006), e refletem o grande potencial de recuperação genética dessa espécie; quando manejado (no caso das amostras de área semi-aberta) ou mesmo em ambientes de cativeiro (ITA1, 2 e RPE) visto que, o sucesso reprodutivo está diretamente relacionado com os níveis de diversidade genética e fluxo gênico (Flagstad *et al.*, 2003; Randi *et al.*, 2003).

Esses resultados corroboram ainda com a afirmação de Avise *et al.* (2002) “A variabilidade alélica na maioria das populações de peixes é extremamente alta”.

4.2 – Análise de Parentesco

De acordo com Avise *et al.* (2002), a análise de dados provenientes de microssatélites, permite a obtenção de informações poderosas sobre o parentesco genético dos peixes. O acúmulo dessas informações entre cem ou milhões de peixes, a partir de vários ninhos, podem revelar com sucesso as Táticas Reprodutivas Alternativas (ARTs) que poderiam ser um sistema reprodutivo presente em populações naturais de peixes.

Das 30 espécies de peixe-sol da América do Norte, uma espécie, o peixe-sol de guelra azul (*Lepomis macrochirus*), tem sido o sistema modelo para o estudo das ARTs (Gross, 1979; 1996 e Neff & Gross 2000). Vários autores (Taborsk, 1994; Breder & Rosen, 1996; Taborsk, 1998 e Taborsk, 2001) discutem os diversos comportamentos e táticas reprodutivas encontradas em peixes, algumas delas estão listadas na Tabela 17.

Tabela 17: Algumas Táticas Reprodutivas Alternativas (ARTs) utilizadas por peixes.

ARTs	Características	Espécies de peixes
“Pais-aproveitadores”	Fertilizam várias desovas que não são suas.	<i>Lepomis macrochirus</i>
“Mães aproveitadoras”	Desovam em vários ninhos que não são seus.	<i>Micropterus salmoides</i>
“Machos Competidores”	Utilizam a corte e o tamanho do corpo, em lutas por territórios, para atrair as fêmeas.	<i>Gadus morhua</i> (Bacalhau)
“Tomadores de ninho”	Tomam posse de ninhos alheios para realizar seu acasalamento.	<i>L. macrochirus</i> e <i>L. gibbosus</i>
“Acasalamentos múltiplos de pais verdadeiros”	Várias Fêmeas desovam em um ninho de um pai verdadeiro.	<i>L. marginatus</i> , <i>L. auritus</i> e <i>L. punctatus</i>
“Imitadores de ovos”	Utilizam ovos de outros ninhos para atrair fêmeas grávidas.	<i>Etheostoma virgatum</i>
“Fêmea Promíscua” (Poliandria)	Fêmeas que fazem múltiplos acasalamentos para garantir seu sucesso reprodutivo, evitando que todos os seus filhotes corram o risco da predação.	<i>Poecilia reticulata</i>

Quando observamos as várias táticas reprodutivas alternativas, realizadas pelos peixes citados acima, e comparamos com nossos resultados, obtidos com os filhotes de pirarucu analisados, percebemos que esta espécie pode possuir um sistema de acasalamento que não está restrito apenas a um padrão reprodutivo monogâmico. Segundo Berglund *et al.*, 1989; Vincent *et al.*, 1992 e Avise *et al.*, 2002, muitas espécies de peixes (p.ex. os *Syngnantideos*), possuem um sistema de acasalamento baseado em estratégias de “regras sexuais reversas” que envolvem seleção sexual e dimorfismo sexual, onde a fêmea compete mais intensamente pelo macho durante o período do acasalamento. Os dados genéticos sobre o sistema de acasalamento desses *Syngnantideos* podem variar dentro dos vários tipos de comportamento reprodutivo: Poligenia - um macho acasalando com várias fêmeas; Poliandria - uma fêmea acasalando com vários machos; Monogamia - um macho acasalando apenas com uma fêmea e vice-

versa, e Poligamia - um macho acasalando com várias fêmeas e uma fêmea acasalando com vários machos.

Um caso interessante foi o estudado por Liebgold *et al.*, (2006), que observaram múltipla paternidade em anfíbios (*Plethodon cinereus*), com comportamento social monogâmico. Os autores concluíram que a monogamia, fez parte do comportamento de apenas 15% das fêmeas estudadas e que a poliandria foi o comportamento predominante, no sistema de acasalamento nessa população de *Plethodon cinereus*.

As suspeitas sobre a afirmação de que *Arapaima gigas*, não possui um sistema reprodutivo restrito ao padrão monogâmico são suportadas quando visualizamos os coeficientes de relacionamento (r), onde todos os filhotes tanto os de Santarém (área semi-aberta) quanto os das áreas de cativeiro são proximamente relacionados.

Quando analisamos as categorias de relacionamento, percebemos que apesar dos filhotes estarem proximamente relacionados, são classificados em categorias de relacionamento diferentes como: 1- irmãos-verdadeiros/FS ($r = 0,5$), categoria presente em todas as amostras analisadas; 2- meio-irmãos/HS ($r = 0,25$), categoria que pode ser observada em Ita 1 , 2 e RPE (áreas de cativeiro) e no grupo 2 das amostras de área semi-aberta - Santarém; 3- categoria de primos ($r = 0,125$) observados em Ita1 e 2 (cativeiro) e no grupo 2 de Santarém (semi-aberta); sustentando a hipótese de possíveis “contribuições- extra” dos pares no acasalamento.

As amostragens de Ita 2 e RPE, apresentaram a categoria de meio-irmãos (HS) e também cinco alelos diferentes, genotipados com o locus CTm3, indicando

que houve uma possível contribuição “extra” com um dos pares do acasalamento, principalmente quando levamos em consideração as condições de cativeiro em que os peixes adultos ficam no mesmo viveiro, o que pode facilitar a ocorrência de alguma tática reprodutiva alternativa dessa espécie para “driblar” um dos pais.

Para as amostras de Santarém (área semi-aberta - lagos), os resultados obtidos demonstram que as possibilidades de “Contribuição extra-par” são altíssimas, principalmente quando comparamos a variabilidade alélica, coeficiente e categorias de relacionamento.

Certamente não podemos desconsiderar, que esses resultados possam ter sido influenciados pelo número amostral reduzido dessa área e por uma provável migração de filhotes de uma ninhada para outra (na hora da coleta). Acreditamos que o aumento do número de amostras de Santarém, para estudos posteriores, seria indispensável para a confirmação e consolidação desta hipótese.

Provavelmente os altos índices da categoria de não-relacionados, em todas as amostragens estudadas, seja devido a pequenos subgrupos de irmãos (irmandades provenientes de combinação de pelo menos um parente diferente), dentro de cada grupo analisado, pois as comparações são feitas aos pares e quando alelos não são compartilhados, entre essas irmandades, são então classificados como não-relacionados ($k_0=1$, $k_1=0$ e $k_2=0$) e $(r) = 0$.

Nos casos em que as comparações dos filhotes apresentaram mais de uma categoria de relacionamento (p.ex. FS/HS, FS/U e HS/U, ver Tabelas 13,14 e 15), a abordagem de nossos resultados foi considerada como proposto por Steven *et al.*, (2006). Os referidos autores encontraram em seus estudos com hienas (sendo considerada uma espécie com comportamento social monogâmico), que os

resultados de relacionamento (gerados no programa *ML-RELATE*) apresentaram duas categorias: irmãos-verdadeiros e não-relacionados (FS/U). Essas hienas foram consideradas em sua maioria como irmãs-verdadeiras (FS), entretanto os autores não puderam excluir a possibilidade delas serem não-relacionadas (U), pois os índices de verossimilhança entre os pares para esta categoria foram também significativamente altos.

Da mesma forma, interpretamos nossas matrizes das categorias de relacionamento, em que todas as comparações que apresentaram mais de uma categoria (FS/HS, FS/U e HS/U), a primeira alternativa é predominante sobre a segunda mas, esta última, não pode ser descartada pois, tanto a primeira quanto a segunda alternativa de categoria de relacionamento são estatisticamente possíveis.

4.3 – Implicações para a conservação

Acreditamos que as informações obtidas, por meio de nossos resultados, têm grande importância e fortes implicações para a conservação de *Arapaima gigas* pois, esta espécie, possui grande importância econômica para a região Amazônica e já passou por grandes níveis de exploração, hoje mais ou menos, mas não inexistentes.

As suspeitas, fortemente suportadas em nossos resultados, de que o pirarucu possui um sistema reprodutivo que não está restrito ao padrão monogâmico é muito vantajosa, e se revela como uma estratégia natural da espécie para a manutenção de sua diversidade genética nas próximas gerações. Em contrapartida, se nossos resultados mostrassem que o pirarucu possui um

sistema reprodutivo, restrito ao padrão monogâmico, seria preocupante, pois demonstraria a vulnerabilidade de *Arapaima gigas* a catástrofes naturais, superexploração e endocruzamento, sujeito a um gargalo de garrafa.

Dessa forma, nossos resultados, subsidiarão estudos futuros e mais complexos sobre o sistema de acasalamento e as possíveis táticas reprodutivas alternativas realizadas pelos reprodutores de pirarucu; contribuindo com uma importante ferramenta para as pesquisas e criação de pirarucus em cativeiro, como por exemplo uma sugestão baseada nos resultados aqui obtidos seria a manutenção de vários casais reprodutores nos tanques de criação.

Consideramos nossos resultados como mais uma contribuição dos métodos biotecnológicos para a pesquisa, o manejo e a conservação do pirarucu, que é importante não somente para a preservação da biodiversidade, mas também para que se garanta a manutenção de um alimento importante a nível local. Portanto, estudos genéticos, relacionados ao comportamento reprodutivo e ao perfil genético da prole, feitos com *Arapaima*, são imprescindíveis para estimar a contribuição relativa dos pares, envolvidos no acasalamento, e considerá-la como uma estratégia reprodutiva natural para a conservação da diversidade genética dessa espécie. Com importantes implicações para a ecologia, estrutura genética das populações e monitoramento dos estoques pesqueiros.

5 – Referências Bibliográficas

- Avise C, J., Jones A, G, Walker D, DeWoody A (2002) Genetic Mating Systems and Reproductive Natural Histories of Fishes: Lessons for Ecology and Evolution. Annu. Rev. Genet. 36, 19-45.*
- Baca LC (2001) Historia Biológica del paiche o Pirarucu Arapaima gigas (Cuvier) y bases para su cultivo em la Amazônia, Iquitos, Peru.*
- Bard J, Imbiriba E, P, (1986) Pscicultura do Pirarucu (Arapaima gigas,). Embrapa-CPA TU (Circular Técnica) 52.*
- Bekkevold D, Hansen M, M,, Loeschcke V (2002) Male reproductive competition in spawning aggregations of cod (Gadus morhua, L.). Molecular Ecology, 91-102.*
- Belkhir K, Borsa P, Chikhi L, Raufaste N, Bonhomme F (2004) GENETIX 4,05, logiciel sous Windows TM pour la génétique des populations, Laboratoire Génome, Populations, Interactions,, p. CNRS UMR 5000. Université de Montpellier H, Montpellier, (France).*
- Berglund A, Rosenqvist G, Svensson 1. 1989. Reproductive success off emales limited by males in two pipefish species. Am. Nat. 133:506-16 Birkhead T, Molier AP (1998) Sperm Competition and Sexual Selection. Academic Press, London.*
- Blouin MS (2003) DNA-based methods for pedigree reconstruction and kinship analysis in natural populations. Trends in Ecology and Evolution 18, 503-511.*
- Breder CM, DE. R (1936) Reproduction in Fishes. Natl. Hist. Press.*

- Breder CM, DE. R (1996) *Modes of Reproduction in Fishes*. In: *Natl. Hist. Press*, New York.
- Buckleton J, Triggs CM, SJ W (2005) *Forensic DNA Evidence Interpretation*. In: *CRC Press, Boca Raton, Florida*.
- Carvalho L, O, D, M, Nascimento C, N, B, (1992) *Engorda de pirarucus (Arapaima gigas) em associação com búfalos e suínos*. *Embrapa-CPATU (Circular Técnica) 65*, 21 p.
- Cavero B, A, S, (2002) *Densidade de estocagem de juvenis de pirarucu, Arapaima gigas (Cuvier, 1829) em tanques -rede de pequeno volume, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Fundação Universidade o Amazonas*.
- Cavero B, A, S,, Pereira-Filho M, Roubach R, Ituassú D R (2003) *Efeito da densidade de estocagem na homogeneidade do crescimento de juvenis de pirarucu em ambiente confinado*. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* **38**, 103-107.
- Chapman D, D,, Prodohl P, A,, Gelsleichter J, Manire C, A, , Shivji M (2004) *Predominance of genetic monogamy by females in a hammerhead shark, Sphyrna tiburo: implications for shark conservation*. *Molecular Ecology*, 1965-1974.
- Colbourne JK, Neff BD, Wright JM, Gross MR (1996) *DNA fingerprinting of bluegill sunfish (Lepomis macrochirus) using (GT)_n microsatellites and its potential for assessment of mating success*. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* **53**, 324-348.

- Crescêncio R (2001) *Treinamento alimentar de alevinos de pirarucu, Arapaima gigas (Cuvier, 1829), utilizando atrativos alimentares, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazonia, Fundação Universidade do Amazonas.*
- Grossa M (1997) *Biotelemetria do pirarucu (Arapaima gigas), em lagos de várzea do município de Santarém, PA.*
- 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.*
- Farias IP, Hrbek T, Grossa M, Sampaio I, Meyer A (2006) *Long-term loss of genetic diversity, and bottleneck in Arapaima gigas, the largest fish of the Amazon basin. Conservation Genetics.*
- Flagstad Ø, Walker CW, Vilà G, et al. (2003) *Two centuries of the Scandinavian wolf population: patterns of genetic variability and migration during an era of dramatic decline. Molecular Ecology 12, 869-880.*
- Fernández J, Toro M (2006) *A new method to estimate relatedness from molecular markers. Molecular Ecology 10, 1-11.*
- Fontenele O (1948) *Contribuição ao conhecimento da biologia do pirarucu (Arapaima gigas) em cativeiro. In: Brasil Biologia, pp. 445-459.*
- Fontenele O (1952) *O posto de piscicultura de Lima Campos: suas instalações, sua organização e seus primeiros anos de funcionamento. Boletim Soc. Brasil. Med. Vet.*
- Fontenele O (1955) *Contribuição ao conhecimento do pirarucu Arapaima gigas (Cuvier, 1829) em cativeiro (Actinopterygii, Osteoglossidae)*

Departamento Nacional de Obras Contra as Secas 166, Fortaleza.

Gerri C (1995,) *O Crepúsculo do Gigante*,. Rev, *Globo Rural* 10, 28 -32.

Goodnight KK (2000) *Kinship 1 .2. Software for population Biology*. Dept. of Ecology & Evolutionary Biology MS-170.

Gross MR. 1979. *Cuckoldry in sunfishes (Lepomis: Centrarchidae)*. *Can. J. Zool.* 57:1507—9

Gross MR, RC. S (1985) *The evolution of male and female parental care in fishes*. *Am. Zool.* 25, 807—822.

Gross MR. 1996. *Alternative reproductive strategies and tactics: diversity within sexes*. *TREE*11:92—98

Taborsky M. 1998. *Sperm competition in fish: “bourgeois” males and parasitic spawning*. *TREE*13:222—27

Hrbek T, Farias IP, Crossa M, et ai. (2005) *Population genétic analysis of Arapaima gigas, one of the largest freshwater fishes of the Amazon basin: implications for its conservation*. *Animal Conservation* 8, 297-308.

Imbiriba E, P, (1994) *Reprodução, larva e alevinagem de pirarucu (Arapaima gigas)*. In: *EMBRAPA-CPA TU Recomendações básicas*, p. 4.

Imbiriba E, P,, Juncr J, BL,, Carvalho L, O,D,M,, et tal. (1996) *Criação de Pirarucu*. *Coleção Criar (EMBRAPA)*, 93p.

Imbiriba E, P, (2001) *POTENCIAL DE CRIAÇÃO DO PIRARUCU (Arapaima gigas) EM CATIVEIRO*. *Acta Amazonica* 31, 299-316.

Jones AG, Kvarnemo C, Moore GI, Simmons LW, Avise JC (1998) *Microsatellite evidence for monogamy and sex-biased recombination in the Western*

- Australian seahorse Hippocampus angustus. Molecular Ecology* 7, 1497-1505.
- Jones AG, Rosenquist G, Berglund A, Avise JC (1999) Clustered microsatellite mutations in the pipefish *Syngnathus typhle*. *Genetics* 152, 1957-1963.
- Kalinowski ST, Wagner A, Taper ML M-Racpfmleorar, *Molecular Ecology Notes* 6:576-579, (2006) ML-Relate: a computer program for maximum likelihood estimation of relatedness and relationship,. *Molecular Ecology*
- Konovalov DA, C M, H MT (2004) KINGROUP: a program for pedigree relationship reconstruction and kin group assignments using genetic markers. *Molecular Ecology*, 779—782.
- Li G, Q., Wilson M, V, H, (1996,) *Phylogeny of Osteoglossomorfa*, In: Stiassny, M, L, ; Parenti, L, R,; Johnson, G, D, (Ed), *Interrelations of Fishes*. San Diego: Academic, P, 163-174.
- Liebgold EB, Cab RP, Jager RG, Leberg PL (2006) Multiple paternity in salamander with socially monogamous behaviour. *Molecular Ecology*.
- Lüling V (1964) Zur Biologie und cDkologie von *Arapaima gigas* (Piscos, Osteoglossidae). *Zeitschrift für Morphologie und Ökologie der Tiere* **54**, 436-530.
- Lundberg J, Chernoff B (1992) A miocene fossil of the amazonian fish *Arapaima* (Teleostei: Arapaimidae) from the Magdalena river region of Colombia: biogeographic and evolutionary implications. *Biotropica* **24**, 2-14.
- Lynch M, B W (1998) *Genetics and Analysis of Quantitative Traits*. In: Sinauer Associates, Su nderland, Massach usetts.

- Neff B, D., Repka J, Gross M, R, (2000) Parentage analysis with incomplete sampling of candidate parents and offspring. *Molecular Ecology*,, 515-528.
- Nei M (1973) Analysis of gene diversity in subdivided populations. effective size of small populations. *Genetics* 157, 867—874.
- Nelson JS (1994) *Fishes of the World*, 3rd edition John Wiley and Sons, mc., New York, NY.
- Oliveira CE (1944) *Piscicultura amazônica*. In: *A voz do mar*, pp. 104-106.
- Ostrensky A, Borghetti J, Pedini M (2000) Situação atual da aquicultura brasileira e mundial, Brasília.
- Paetkau D, Clauvert W, Stirling 1, Strobeck C (1995) Microsatellite analysis of population structure in Canadian polar bears. *Mol. Ecol.* 4 347-354.
- Petrere Jr M (1989) *River fisheries in Brazil. A review*.
- Sawaya P (1946) Sobre a biologia de alguns peixes de respiração aérea (*Lepidosirem paradoxa* e *Arapaima gigas*). *Boletim Faculdade de Filosofia e Ciência - Zoologia* 11, 255-286.
- Selvin S (1980) Probability of nonpaternity determined by multiple allele cocominant systems. *American Journal of Human Genetics* 32, 276 - 278.
- Souza R, H, de S, , Vai A, L, (1991) O gigante das águas doces. *Ciência Hoje* 11, 129-133.
- SLATE J, MARSHALL T, J P (2000) A retrospective assessment of the accuracy of the paternity inference program CERVUS. *Molecular Ecology* 9, 801 -808.
- Stockley P (1999) Sperm selection and genetic incompatibility: does relatedness of mates affect male success in sperm competition? *Proceedings of the Royal Society of London, Series B*, 266, 1663—1669.

Taborsky M. 1998. Sperm competition in fish: "bourgeois" males and parasitic spawning. *TREE* 13:222—27

Taborsky M. 2001. The evolution of bourgeois, parasitic and cooperative reproductive behaviors in fishes. *J. Hered.* 92:100—9

Vari RP, Maiabarba LR (1998) Neotropical ichthyology: an overview. In: *Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes* (eds. Malabarba LR, Reis RE, Vari RP, Lucena ZMS, Lucena CAS), pp. 1-11. EDIPUCRS, Porto Alegre, Brazil.

Veríssimo J (1895) *A Pesca na Amazônia* Livraria Clássica, de Alves & C., Rio de Janeiro, Brazil.

Vincenta, Ahnesjö 1, Berglund A, Rosenqvist G. 1992. Pipefishes and seahorses: Are they all sex-role reversed? *TREE* 7:237—41.