

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

**Genética populacional do bagre amazônico**  
***Pseudoplatystoma punctifer* (Siluriformes: Pimelodidae) nas sub-bacias dos**  
**rios Madeira e Mamoré/Guaporé**

**ANTONIO SAULO CUNHA MACHADO**

**Manaus**

**2013**

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

**ANTONIO SAULO CUNHA MACHADO**

**Genética populacional do bagre amazônico**  
*Pseudoplatystoma punctifer* (Siluriformes: Pimelodidae) nas sub-bacias dos  
rios Madeira e Mamoré/Guaporé

Dissertação apresentada ao Programa Multi-Institucional de Pós-Graduação em Biotecnologia/PPGBIOTEC- UFAM como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia, na área de concentração Conservação e Uso de Recursos Genéticos Animais da Amazônia.

**Orientadora: Dra. Izeni Pires Farias**  
**Co-orientadora: Dra. Jacqueline da Silva Batista**

**Manaus**  
**2013**

Ficha Catalográfica  
(Catalogação realizada pela Biblioteca Central da UFAM)

M149g Machado, Antonio Saulo Cunha.  
Genética populacional do bagre amazônico *Pseudoplatystoma punctifer*  
(Siluriformes: Pimelodidae) nas sub-bacias dos Rios Madeira e  
Mamoré/Guaporé / Antonio Saulo Cunha Machado. - 2013.  
89 f. : il. color.  
Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) — Universidade Federal do  
Amazonas.  
Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Izeni Pires Farias.  
Co-orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Jacqueline da Silva Batista

1. Bagre (Peixe) 2. Peixe 3. Rio Madeira (Am) 4. Surubim I. Farias, Izeni  
Pires, orientador II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

CDU (1997): 597.554.4 (811) (043.3)

*Tudo o homem pode fazer, só depende é de querer.*

**Mestre Gabriel**

## AGRADECIMENTO INSTITUCIONAL

Agradecemos aos financiadores e apoiadores da pesquisa científica, projetos: CNPq/CT-Amazonia 554054/2006-0 e 575603/2008-9, CNPq/BrBol 564953/2010-5, FAPEAM/PPP 3036/2012, FINEP/DARPA e FAPEAM/Pronex. À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM) pela concessão da bolsa de estudos, ao Programa Multi-Institucional de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas (UFAM) pela estrutura acadêmica, ao Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA) pelo apoio institucional e por toda infraestrutura do Laboratório Temático de Biologia Molecular (LTBM) onde este trabalho foi desenvolvido. Ao suporte técnico do Laboratório de Genética Evolução Animal (LEGAL) da UFAM e ao Laboratório de Ictiologia e Pesca da Universidade Federal de Rondônia (UNIR) pelo envio de parte das amostras de tecidos de *Pseudoplatystoma punctifer* utilizadas nesse estudo. E ao IBAMA pelas licenças de coleta e transporte de material biológico N<sup>os</sup>. 017, 130, 14278-1 e 25890-1.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço ao DIVINO MESTRE, que está à cima de tudo e de todos os critérios do Método Científico, pela saúde, pelo merecimento de poder cursar um Mestrado e pela força para que eu persistisse na realização dos meus objetivos. Ao DIVINO MESTRE que ao longo de minha vida me auxiliou a passar por dificuldades, que serviram para aguçar o autoconhecimento de minhas limitações e reforçar minha fé.

Ao meu pai José Almir e a minha avó Aldenice de Souza, por tudo que fizeram por mim, pelo exemplo de honra, dignidade e honestidade. Por terem me mostrado o caminho da LUZ. E especialmente para minha Mãe Maria da Conceição Cunha Paixão onde quer que esteja.

Agradeço, com uma reverência especial, à minha ORIENTADORA, Dra. Izeni Pires Farias, uma brilhante professora e pesquisadora, acima de tudo uma pessoa maravilhosa, carismática que transborda ética e amor profundo pela ciência, que é para mim um exemplo de pessoa e de profissional.

A minha Co-orientadora Dra. Jacqueline da Silva Batista por ter acompanhado de perto todo o meu trabalho, pela orientação e contribuição substancial (em vários sentidos), pelos seus conselhos, paciência e oportunidades.

Ao Dr. Tomas Hrbek pela valiosa contribuição durante a fase de interpretação e análise de dados de alguns resultados teste trabalho.

A MSc. Kyara Formiga que me deu a oportunidade de trabalhar com a biologia molecular e a ingressar na área da pesquisa científica, quando eu ainda estava na graduação.

A minha AMIGA doutoranda Izaura Bezerra Francini, pessoa de alto nível de bondade e evolução espiritual que vem contribuindo consideravelmente em todas as etapas acadêmicas em que tive êxito, sem o seu auxílio com certeza a caminhada seria mais difícil.

Ao amigo Jones Batista pelos conselhos e incentivo para sempre me dedicar aos estudos e pelas boas palavras, e ensinamentos SUPERIORES.

Aos professores do Programa Multi-Institucional de Pós-Graduação em Biotecnologia (PPGBiotec) da Universidade Federal do Amazonas (UFAM), pela oportunidade do aperfeiçoamento.

Ao Dr. Edmar Vaz de Andrade coordenador do PPGBiotec, e a Nubiane Freitas secretária do PPGBiotec pela compreensão durante algumas fases difíceis do mestrado.

À contribuição dos doutores avaliadores da qualificação Dr. Cleiton Fantin Rezende, Dra. Maria Claudia Gross e Dra. Maria da Conceição Freitas Santos, pelas valiosas sugestões, as quais aprimoraram consideravelmente este trabalho.

Aos colegas do Laboratório Temático de Biologia Molecular (LTBM), pelo auxílio durante o trabalho e pelos momentos de convivência no dia-a-dia do laboratório: Giselle Moura (considerada) Adriel Lira (ilhas de diversidade), Karen e Keroleny Dantas, João Capurucho, Santiago Linorio e Henrique Lima.

Aos colegas da turma do Mestrado: Geórgia Holanda, Raiane Souza, Tamiris Fonseca, Priscilla Louise, Patrícia Dutra, Ana Mara, Jefferson dos Santos, Adriel Lira e Vanessa Correa, pessoas que passaram por um exame de seleção histórico (2010-2011) no PPGBiotec-UFAM, valeu!

Aos colegas do Laboratório de Genética Evolução Animal (LEGAL), José Gregório, Maria Doris, Emanuell Duarte, Jennifer Gomes, Guilherme Dias, e ao Mário da Silva que sempre estava disposto a auxiliar no que fosse preciso com programas de análises de genética e procedimentos de laboratório.

Um agradecimento especial às pessoas que fizeram as coletas das amostras de *Pseudoplatystoma punctifer* usadas nesse trabalho: Waleska Gravena, Olavo Colatreli, Natasha Meliciano, Maria Doris, Mauro Ortiz, Iamili Aguiar, Tomas Hrbek, Jacqueline Batista e Izeni Farias.

E a Dra. Carolina Rodrigues da Costa Doria da Universidade Federal de Rondônia (UNIR) pelo envio de parte das amostras de Guajará-Mirim.

A Dra. Vera Margarete Scarpassa pelo importante auxílio, oportunidades e compreensão durante a reta final do meu mestrado.

Aos meus professores da graduação por terem contribuído e me preparado para a futura profissão, pela amizade, pela sabedoria em seus ensinamentos profissionais, em especial à professora MSc. Maria Inês, à professora MSc. Lucivana Mourão e ao professor MSc. Obed Garcia por terem acreditado e incentivado.

Enfim aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para que esse momento e esse trabalho se realizassem.

## RESUMO

O grande bagre *Pseudoplatystoma punctifer* (surubim) está entre as cinco espécies de bagres da bacia Amazônica com maior valor comercial. Desempenha importante papel como predador de topo nos ecossistemas de água doce da Amazônia. O movimento das espécies aquáticas, nas bacias hidrográficas, pode ser interrompido por barreiras biogeográficas naturais formadas por corredeiras e cachoeiras que produzem biotas distintas. Existem diferenças claras entre as biotas (assembléias) de peixes da área que fica à montante e à jusante das cachoeiras do rio Madeira. As cachoeiras do rio Madeira delimitam duas regiões distintas: à montante, a sub-bacia dos rios Mamoré/Guaporé (que será chamada de sub-bacia do Mamoré/Guaporé) e à jusante, a sub-bacia do rio Madeira. O conhecimento de como o ciclo de vida de *P. punctifer* é influenciado pelas corredeiras e cachoeiras do rio Madeira, levando em consideração a sua rota migratória e o quanto de variação genética ocorre nesta espécie, dentro e entre as sub-bacias, é muito importante para a conservação e para possíveis medidas de manejo. Foram realizadas análises moleculares através do sequenciamento do gene COI do DNA mitocondrial e de 10 locos microssatélites. O objetivo foi verificar se *P. punctifer* constitui uma população panmítica ou se existe algum tipo de segregação genética que possa ser relacionada com as cachoeiras do rio Madeira. Foram analisados 96 espécimes com o gene COI e 99 com os locos microssatélites, de seis localidades, sendo duas na sub-bacia do Mamoré/Guaporé e quatro na sub-bacia do rio Madeira, ambas na bacia Amazônica. Com o marcador COI foram observados 11 haplótipos, uma diversidade haplotípica de 0,600 e uma diversidade nucleotídica de 0,00157. Todos os locos microssatélites analisados foram altamente polimórficos, com o número de alelos por loco variando de dois (Ppu8) a 22 (Ppu4), em média 10,4 alelos por loco. O número total de alelos observados foi de 104, com 27 alelos exclusivos. Com base nos resultados da análise de variância molecular (AMOVA) e de fluxo gênico ( $Nm$ ) observados entre das sub-bacias, para os microssatélites ( $F_{ST} = 0,067$ ;  $Nm = 6,883$ ) e para o gene COI ( $\Phi_{ST} = 0,391$ ;  $Nm = 0,643$ ), não podemos rejeitar totalmente a hipótese de panmixia para *Pseudoplatystoma punctifer*. No entanto, foi evidenciada que os espécimes de *P. punctifer* das sub-bacias do rio Madeira e do Mamoré/Guaporé apresentam uma diferenciação genética grande e intermediária para o gene COI e microssatélites, respectivamente. A diferenciação genética observada na análise bayesiana do programa BAPS, com os dados de COI, mostrou claramente a existência de duas linhagens maternas, uma em cada sub-bacia. Este resultado pode estar relacionado com: o sedentarismo das fêmeas; as diferentes condições ambientais; o regime hídrico das sub-bacias do rio Madeira e do Mamoré/Guaporé e às corredeiras e cachoeiras do rio Madeira, que interrompem parcialmente o fluxo gênico. Propomos um modelo de migração dos machos, tendo como base os resultados da análise dos locos microssatélites e estudos prévios de ecologia. Nossos resultados indicaram a ocorrência de dois estoques pesqueiros, que precisam gestão separada ou prioridade para conservação. No entanto, as ações antropogênicas na área de estudo, tais como: a construção das hidrelétricas, o desmatamento e a exploração pesqueira, tornam as medidas de conservação e manejo complexas.



## ABSTRACT

The great catfish *Pseudoplatystoma punctifer* (surubim) is among the five species of catfish of the Amazon basin with greater commercial value. It plays important role as top predator in freshwater ecosystems of the Amazon. The movement of aquatic species, in watersheds, can be interrupted by natural biogeographic barriers, formed by rapids and waterfalls that produce distinct biota. There are clear differences between the biota (assemblies) of fish in the area that is upstream and downstream of the falls of the Madeira River. The waterfalls of Madeira River delimit two distinct regions: upstream the sub-basins of the Mamoré/Guaporé (which will be called the Mamoré/Guaporé sub-basin) and downstream the sub-basin of the Madeira River. The knowledge of how the life cycle of *P. punctifer* is influenced by the Madeira River rapids and waterfall, taking into account their migratory route and how much genetic variation occurs in this species, within and between sub-basins, is very important for the conservation and for possible management measures. Molecular analyzes were performed by sequencing the COI gene of mtDNA and 10 microsatellite loci. Our objective was to determine whether *P. punctifer* constitutes a panmictic population or if there is some kind of genetic segregation, associated with space and time, which can be related to the waterfalls of the river Madeira or the homing behavior. Were analyzed 96 specimens with the COI gene and 99 with microsatellite loci from six localities, being two in the the Mamoré/Guaporé sub-basin and four in the sub-basin of the Madeira River, both in the Amazon basin. With the COI marker were observed 11 haplotypes, a haplotype diversity of 0.600 and a nucleotide diversity of 0.00157. All analyzed microsatellite loci were highly polymorphic, the number of alleles per locus ranging from two (Ppu8) to 22 (Ppu4), on average 10.4 alleles per locus. The total number of observed alleles was 104, with 27 unique alleles. Based on the results of the analysis of molecular variance (AMOVA) and gene flow ( $Nm$ ) observed between the sub-basins to the microsatellite ( $F_{ST} = 0.067$ ;  $Nm = 6.883$ ) and for the gene COI ( $\Phi_{ST} = 0.391$ ;  $Nm = 0.643$ ), we cannot reject the hypothesis of panmixia for *Pseudoplatystoma punctifer*. However, it was evidenced that the specimens of *P. punctifer* of Madeira River and Mamoré/Guaporé sub-basins feature a large genetic differentiation and intermediate for the gene COI and microsatellites, respectively. Genetic differentiation observed in Bayesian analysis of BAPS, with the COI data clearly showed the existence of two maternal lines, an in each sub-basin. This result may be related to: sedentary females; the different environmental conditions; the water regime of the Madeira River and Mamoré/Guaporé sub-basins and with rapids and waterfalls and of the Madeira River, which partially disrupt the gene flow. We propose a model of migration of males on the basis of the results of the analysis of microsatellite loci and prior studies of ecology. Our results indicated the occurrence of two fishing stocks, which require separate management or priority for conservation. However, anthropogenic actions in the area of study, such as: the construction of dams, deforestation and the fishing exploitation, make the complex conservation and management measures.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** As oito espécies do gênero *Pseudoplatystoma*. (Imagens de Buitragro-Suárez e Burr, 2007). ..... 3
- Figura 2.** Distribuição das espécies de *Pseudoplatystoma* (adaptado de Buitragro-Suárez e Burr, 2007). ..... 4
- Figura 3.** *Pseudoplatystoma punctifer*. ..... 11
- Figura 4.** Localidades onde foram amostrados os espécimes de *P. punctifer*. A jusante das cachoeiras e corredeiras, do alto rio Madeira (sub-bacia do rio Madeira): Bo, Borba; Mc, Manicoré; Hu, Humaitá; e PV, Porto Velho. A montante das cachoeiras (sub-bacia do Mamoré/Guaporé): no rio Mamoré em Gu, Guajará-Mirim e Ca, rio Cautário, tributário do rio Guaporé. As linhas transversais representam as cachoeiras do alto rio Madeira. .... 19
- Figura 5.** Redes de haplótipos para *Pseudoplatystoma punctifer* obtidas de sequências parciais do gene mitocondrial COI. A, rede de haplótipos por sub-bacia hidrográfica (vermelho: sub-bacia do rio Madeira, verde: sub-bacia do Mamoré/Guaporé); B, rede de haplótipos por localidade. Legenda: Bo, Borba; Hu, Humaitá; Mc, Manicoré; PV, Porto Velho; Gu, Guajará-Mirim; Ca, Rio Cautário. .... 31
- Figura 6.** Análise Bayesiana de estrutura populacional de *Pseudoplatystoma punctifer*. Dados obtidos de 96 sequências nucleotídicas do gene COI do DNAm. Correspondendo a sub-bacia do rio Madeira (Bo, Borba; Mc, Manicoré; Hu, Humaitá; e PV, Porto Velho) e a sub-bacia do Mamoré/Guaporé (Gu, Guajará-Mirim e Ca, rio Cautário)..... 34
- Figura 7.** Resultados do STRUCTURE HARVESTER, indicando K= 4, como a maior probabilidade para os dados do presente estudo, resultado para 10 locos. Na vertical temos a média da estimativa da distribuição das probabilidades dos dados e na horizontal número de clusters testados (K) e o desvio padrão (SD) da probabilidade média. .... 42
- Figura 8.** A) Distribuição das zonas úmidas, na sub-bacia do Mamoré/Guaporé e na bacia Amazônica (rio Madeira) (modificado de Junk, 2007). B) Curvas de inundação dos rios Madeira e Guaporé; as curvas representam a variação do nível de água (em metros), durante o ciclo anual entre 1970 e 2010; a curva em negrito representa a média diária do nível da água e as curvas acima e abaixo, os valores máximos e mínimos diários para este período (para efeitos comparativos, o valor mínimo absoluto de todas as curvas foi definido como zero); os números abaixo dos nomes dos rios indicam os valores médios da amplitude do pulso de inundação (em metros). ..... 52
- Figura 9.** Frequência das grandes queimadas e focos de incêndios recentes na América do Sul. Fonte: NASA FIRMS..... 60

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Multiplex da genotipagem para os 10 locos microssatélites analisados em 99 espécimes de *Pseudoplatystoma punctifer* amostrados na sub-bacia do rio Madeira e na sub-bacia do Mamoré/Guaporé. ....25
- Tabela 2.** Diversidade genética do *Pseudoplatystoma punctifer*, a partir da análise do gene COI (DNAMt). As estimativas da diversidade genética são apresentadas, separadamente: para cada uma das seis localidades, para o total (T) de cada sub-bacia (em negrito) e para o total do banco de dados. Foram estimados: o número sequências analisadas (*Nseq*); o número total de haplótipos (*nH*); a frequência de haplótipos (H1 a H11) por amostra (COI Haplótipos), número total de amostras para cada haplótipo entre parênteses, e em negrito os haplótipos únicos; diversidade haplótípica (*Hd*); diversidade de nucleotídeos ( $\pi$ ) e número de sítios variáveis (*S*). ....30
- Tabela 3.** Análise da variância molecular (AMOVA) (análises 1 a 4) para *Pseudoplatystoma punctifer* (surubim) com base nas 96 sequências de COI utilizadas neste trabalho. Análise 1, para as 6 localidades agrupadas e analisadas em um nível hierárquico; Análise 2, para dois níveis hierárquicos, localidades da sub-bacia do rio Madeira e da sub-bacia do Mamoré/Guaporé; Análise 3, localidades da sub-bacia do rio Madeira (Bo, Borba; Mc, Manicoré; Hu, Humaitá; PV, Porto Velho); Análise 4, para localidades da sub-bacia do Mamoré/Guaporé (Gu, Guajará-Mirim;Ca, rio Cautário). ....33
- Tabela 4.** Comparações par-a-par dos valores de *Nm* (valores acima da diagonal) e  $\Phi_{ST}$  (valores abaixo da diagonal) estimados entre os espécimes de *Pseudoplatystoma punctifer* amostrados nas seis localidades, com base no gene COI do DNAMt. ....34
- Tabela 5. Índices de diversidade genética para os 99 espécimes de *Pseudoplatystoma punctifer*, amostrados em seis localidades ao longo das sub-bacias do rio Madeira e do Mamoré/Guaporé, calculados com base em 10 locos microssatélites. *N<sub>a</sub>*, número de alelos por loco; *H<sub>E</sub>*, heterozigosidade esperada; *H<sub>O</sub>*, heterozigosidade observada; *F<sub>is</sub>*, coeficiente de endogamia.....35
- Tabela 6. Alelos exclusivos observados em 10 locos microssatélites de *Pseudoplatystoma punctifer* em seis localidades amostradas. O número dos alelos e sua frequência relativa (entre parênteses) são listados para cada loco, localidade e sub-bacia analisada. ....37
- Tabela 7. Índices de diversidade genética obtidos para os 10 locos microssatélites de *Pseudoplatystoma punctifer* considerados, separadamente, os grupos de espécimes por localidade de coleta. ....38
- Tabela 8. Análise da variância molecular (AMOVA) (análise 1 a 4) para *Pseudoplatystoma punctifer* (surubim) com base em 10 locos microssatélites. Análise 1, As seis localidades foram agrupadas e analisadas em um nível hierárquico; Análise 2, analisadas em dois níveis hierárquicos, localidades da sub-bacia do rio Madeira e da sub-bacia do Mamoré/Guaporé; Análise 3, localidades da sub-bacia do rio Madeira (Bo, Borba; Mc, Manicoré; Hu, Humaitá; PV, Porto Velho); Análise 4, para localidades da sub-bacia do Mamoré/Guaporé (Gu, Guajará-Mirim; Ca, rio Cautário). ....40

Tabela 9. Comparações par-a-par dos valores de  $Nm$  (valores acima da diagonal) e  $F_{ST}$  (valores abaixo da diagonal) estimados entre os espécimes de *Pseudoplatystoma punctifer* amostrados nas seis localidades, com base em 10 locos microssatélites.....41

## SUMÁRIO

|   |           |
|---|-----------|
| <b>1. INTRODUÇÃO GERAL .....</b>  | <b>1</b>  |
| 1.1. Diversidade de Peixes.....   | 1         |
| 1.2 O Gênero <i>Pseudoplatystoma</i> taxonomia e filogenética.....  | 2         |
| 1.3 Genética de populações .....  | 6         |
| 1.4 Marcadores Moleculares.....   | 8         |
| <b>2. OBJETIVOS .....</b>   | <b>13</b> |
| 2.1 Objetivo geral .....  | 13        |
| 2.2 Objetivos específicos .....   | 13        |
| <b>3. CAPÍTULO I – Artigo .....</b>   | <b>14</b> |
| <b>INTRODUÇÃO .....</b>   | <b>15</b> |
| <b>MATERIAL E MÉTODOS .....</b>   | <b>19</b> |
| Amostragem e extração de DNA.....   | 19        |
| DNA mitocondrial .....  | 20        |
| Amplificação e sequenciamento do gene COI .....   | 20        |
| Análise dos dados – gene COI.....   | 21        |
| Microssatélites .....   | 24        |
| Amplificação e genotipagem .....  | 24        |
| Análise dos dados - Microssatélites.....  | 25        |
| <b>RESULTADOS .....</b>   | <b>29</b> |
| Diversidade genética de <i>P. punctifer</i> com COI.....  | 29        |
| Estrutura Genética de populações de <i>P. punctifer</i> para o COI .....  | 32        |
| Diversidade genética de <i>P. punctifer</i> com microssatélites .....   | 35        |
| Estrutura Genética de populações de <i>P. punctifer</i> para microssatélites .....                                  | 39        |
| <b>DISCUSSÃO .....</b>  | <b>43</b> |
| Diferenciação genética e fluxo gênico para <i>Pseudoplatystoma punctifer</i> .....                                  | 43        |
| Evidências genéticas do sedentarismo das fêmeas e da migração dos machos de <i>Pseudoplatystoma punctifer</i> ..... | 48        |
| Cachoeiras e corredeiras do rio Madeira - barreiras ao fluxo gênico? .....  | 52        |
| Variabilidade genética e demografia de <i>Pseudoplatystoma punctifer</i> .....                                      | 53        |
| Conservação e Manejo do <i>Pseudoplatystoma punctifer</i> .....   | 57        |
| <b>4. CONCLUSÕES .....</b>  | <b>62</b> |
| <b>5. REFERÊNCIAS .....</b>   | <b>64</b> |

# 1. INTRODUÇÃO GERAL

## 1.1. Diversidade de Peixes

As águas doces, salobras e salgadas do mundo abrigam cerca de 32.100 espécies de peixes (2011 *FishBase*: <http://www.fishbase.org>), das quais 4.231 têm distribuição na região Neotropical (Lévêque *et al.*, 2008). Este número continua aumentando, podendo chegar a mais de 6.000 espécies, incluindo espécies reconhecidas, mas ainda não descritas (Reis *et al.*, 2003). Considerando os peixes de água doce, existe registro de elevado endemismo de espécies pertencentes às Ordens Characiformes e Siluriformes. A província da Amazônia (bacia Amazônica, do Orinoco, do Araguaia-Tocantins, do Paraíba e dos rios costeiros das Guianas) apresenta o maior nível de endemismo do mundo com 2.072 espécies de peixes. Seguida da província do Paraná (bacia do São Francisco, do Paraná-Paraguai e La Plata) com 517 espécies (Lévêque *et al.*, 2008).

Os grandes bagres migradores (Siluriformes: Pimelodidae) representam um dos grupos mais significativos em termos de diversidade da ictiofauna da região Neotropical (Ferraris, 2007). A principal característica da morfologia externa desta Ordem é a ausência de escamas, sendo os peixes revestidos por uma pele espessa ou cobertos por placas ósseas, total ou parcialmente. São conhecidos como peixes lisos, bagres, cascudos, acaris, entre outros (Santos *et al.*, 2006; Buitrago-Suárez e Burr, 2007).

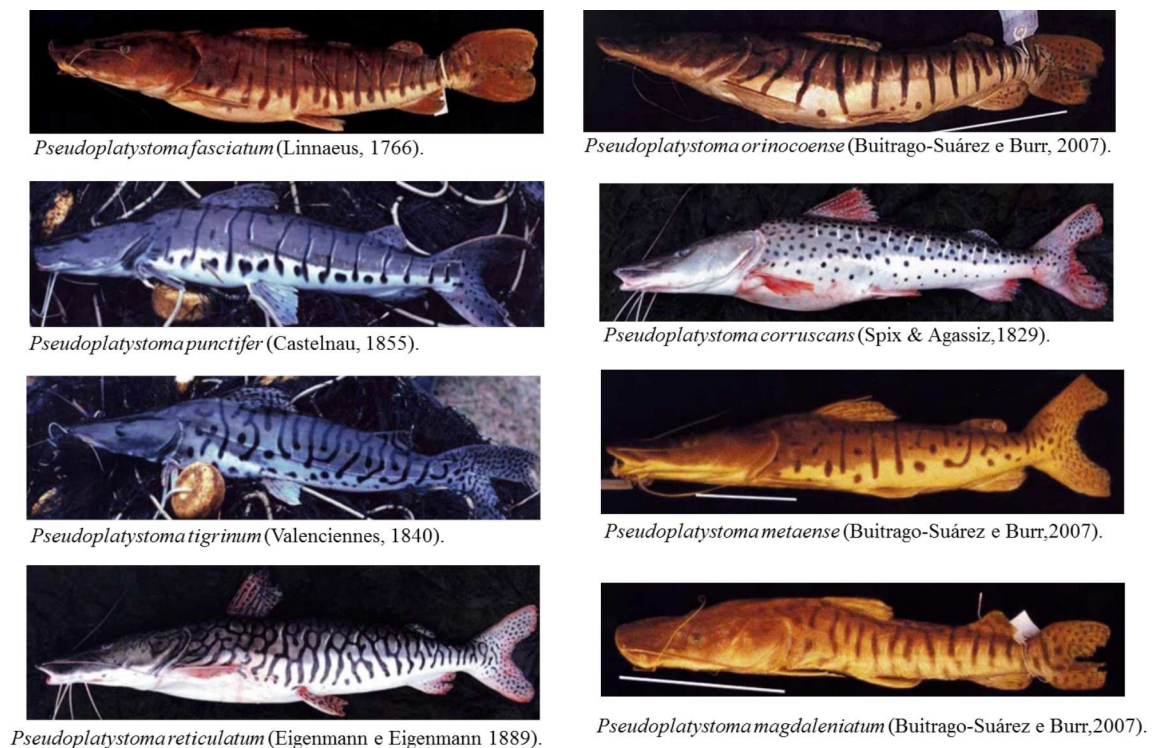
A família Pimelodidae é formada por 29 gêneros e 93 espécies (Ferraris, 2007). São, em sua maioria, predadores de topo na cadeia alimentar como, por exemplo, as espécies: dourada (*Brachyplatystoma rousseauxii*), piramutaba (*Brachyplatystoma vaillantii*), piraíba (*Brachyplatystoma filamentosum*), jaú (*Zungaro zungaro*) e o surubim (*Pseudoplatystoma punctifer*). Estas espécies têm grande importância comercial, por serem usados como fonte de alimento por populações locais, proporcionando a geração de emprego e renda (Barthem e

Goulding, 1997). Considerando a grande importância comercial e ecológica dessas espécies, são de suma importância estudos genéticos populacionais para efeitos de planos de conservação e manejo na bacia Amazônica.

## **1.2 O Gênero *Pseudoplatystoma* taxonomia e filogenética**

As espécies do gênero *Pseudoplatystoma* habitam exclusivamente regiões de água doce e são amplamente distribuídas pelas bacias hidrográficas da América do Sul. Durante muito tempo a diversidade do gênero *Pseudoplatystoma* foi subestimada, pela falta de estudos taxonômicos que pudessem diagnosticar e delimitar as fronteiras das espécies, situação que resultou em dúvidas sobre o real número de espécies do gênero (Buitrago-Suárez e Burr, 2007). Esse gênero era dividido em apenas três espécies: *P. fasciatum*, *P. tigrinum* e *P. corruscans* (Welcome, 1985; Petrere, 1995; Lundberg e Littmann; 2003), até ter revisão taxonômica, após o que foram validadas as espécies *P. punctifer* (Castelnau, 1855) e *P. reticulatum* (Eigenmann e Eigenmann, 1889) além de serem descritas três novas espécies: *P. orinocoense*, *P. metaense* e *P. magdaleniatum* (Buitrago-Suárez e Burr, 2007). Desta forma, o número de espécies do gênero foi elevado de três para oito (Figura 1).

As espécies de *Pseudoplatystoma* possuem a seguinte distribuição geográfica: *P. punctifer* e *P. tigrinum* são simpátricas e ocorrem na bacia amazônica; *P. metaense* e *P. orinocoense* simpátricas na bacia do Orinoco; *P. reticulatum* e *P. corruscans* simpátricas nas bacias do Paraná-Paraguai e Uruguai, com *P. corruscans* ocorrendo também na bacia do São Francisco; *P. magdaleniatum* na Bacia do rio Magdalena e *P. fasciatum* nos rios das Guianas (Figura 2). Embora, Buitrago-Suárez e Burr (2007) tenham considerado a ocorrência de *P. reticulatum* na Amazônia central (rio Negro), o material examinado por eles se restringia a região do Mato Grosso e à bacia do Paraná-Paraguai.

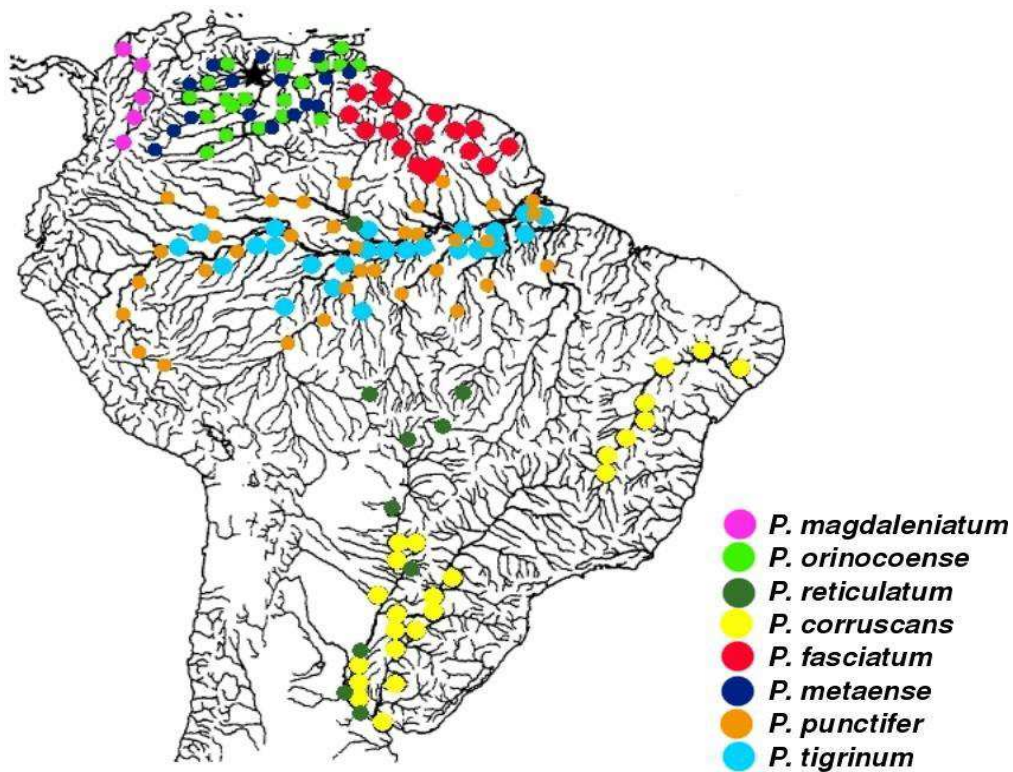


**Figura 1.** As oito espécies do gênero *Pseudoplatystoma*. (Imagens de Buitrago-Suárez e Burr, 2007).

As espécies de *Pseudoplatystoma* são identificadas morfológicamente pela forma do corpo, pelo padrão de coloração, pela anatomia do esqueleto (número de vértebras) e pela distribuição geográfica. Apesar da revisão taxonômica, muitos trabalhos atuais adotam a nomenclatura anterior, a exemplo disso, temos trabalhos sobre reprodução (Nunez *et al.*, 2008, Romagosa, 2010), sobre alimentação de peixes em cativeiro (Arslan *et al.*, 2009) e trabalhos envolvendo marcadores moleculares relacionados com DNA mitocondrial (Ardura *et al.*, 2010a,b).

Além desta problemática, existem divergências na literatura atual, com relação ao real número de espécies dentro do gênero *Pseudoplatystoma*, considerando os resultados taxonômicos (Buitrago-Suárez e Burr, 2007) e moleculares (Torrico *et al.*, 2009; Carvalho-Costa *et al.*, 2011).





**Figura 2.** Distribuição das espécies de *Pseudoplatystoma* (adaptado de Buitrago-Suárez e Burr, 2007).

Usando os dados de marcadores moleculares da região controle (D-loop) e citocromo b (Cyt-b), Torrico *et al.*, (2009) validaram o estado taxonômico de *P. corruscans*, *P. reticulatum*, *P. tigrinum* e *P. magdaleniatum*. Sequências nucleotídicas da região controle, correspondentes a *P. metaense* e *P. orinocoense*, ambos da bacia do Orinoco, resultaram em um único clado. Não foi verificada diferenciação genética entre estas duas espécies, que são morfologicamente distintas. No entanto, os próprios autores afirmam que, uma maior amostragem e análises complementares, são necessárias para definir a relação filogenética exata entre as espécies da bacia do Orinoco. Da mesma forma, não foi possível diferenciar *P. punctifer* (da bacia Amazônica) de *P. fasciatum* (da bacia das Guianas), a nível molecular (Torrico *et al.*, 2009). Provavelmente, este resultado deve-se ao fato, de para *P. fasciatum* terem sido usadas apenas duas sequências para o D-loop e duas para o Cyt-b.

Lundberg *et al.*, (2011) estudando a filogenia da família de bagres pimelodídeos da América do Sul, analisaram mais de sete kilobases de sequências nucleotídicas, dos genes nucleares RAG1 e RAG2, e os genes mitocondriais 12S, 16S e citocromo b. Os autores reconheceram quatro espécies de *Pseudoplatystoma*: *P. magdaleniatum*, *P. corruscans*, *P. fasciatum* e *P. tigrinum*. Note-se que para este gênero os autores usaram apenas um espécime para cada espécie.

Carvalho-Costa *et al.*, (2011) com base na sistemática molecular do gênero *Pseudoplatystoma*, usando os marcadores RAG1 (intron), S7 e Cyt-b, sugerem a divisão em apenas quatro espécies: *P. magdaleniatum*, *P. corruscans*, *P. tigrinum* (lato sensu) e *P. fasciatum* (lato sensu). Estes autores afirmam que a questão continua mal resolvida e que outros marcadores moleculares podem ser a solução. Além do que, para *P. fasciatum* foi utilizado um baixo número amostral (três espécimes).

Segundo, Hausdorf *et al.*, (2011) as sequências de RAG1 dificilmente contribuirão para a reconstrução de árvores filogenéticas e não são úteis para distinguir espécies, porque há pouca variação dessas sequências entre os grupos e o polimorfismo é compartilhado entre as espécies. Porém, (Carvalho-Costa *et al.*, 2011) sugeriram, que seja feita uma reavaliação crítica dos caracteres morfológicos, utilizados para a separação destas espécies, que foi apoiado principalmente no padrão de cores.

Torna-se importante, conservar os recursos genéticos de peixes, para garantir e manter a diversidade genética intra e interespecífica, identificando maneiras de conservação e estabelecendo programas de manejo e monitoramento (Zamparetti, 1996). Mas, para serem tomadas essas medidas, o status taxonômico dos organismos deve ser estabelecido acuradamente (Frankham *et al.*, 2004).

### 1.3 Genética de populações

A genética de populações diz respeito à origem, quantidade e distribuição da variabilidade genética presente em populações de organismos e ao destino desta variação no tempo e no espaço (Templeton, 2011).

Do ponto de vista da conservação, é importante e necessário entender a distribuição da variação genética das espécies, dentro e entre populações naturais (Spruell *et al.*, 2003). A variabilidade genética permite que as espécies se mantenham no tempo e no espaço, adaptando-se aos efeitos das flutuações ambientais (O'Connell e Wright, 1997).

Em peixes, a variabilidade genética intraespecífica tem despertado um grande interesse devido a sua importância tanto na aquicultura como no manejo da pesca (Ramírez, 2001). A variabilidade genética inter e intrapopulacional é a base fundamental de qualquer programa de melhoramento genético. Mediante a seleção artificial e/ou a manipulação genética dos genótipos de uma dada população é escolhida porque determinam características desejáveis, incluindo-se aspectos econômicos e comerciais (Zapata, 1987). Assim, é muito importante conservar as populações naturais, fontes da variabilidade genética, matéria prima para aumentar a produtividade e o valor comercial das espécies de peixes de cativeiro (Ramírez, 2001). Portanto, o conhecimento da variabilidade genética entre populações naturais tem grande importância para a formulação de planos de manejo da pesca.

Os trabalhos de genética de populações de peixes da Amazônia, que têm importância comercial devido à utilização na alimentação e ornamentação, identificaram pelo menos três padrões populacionais na bacia amazônica: espécies panmíticas em toda a bacia tais como a dourada (*Brachyplatystoma rousseauxii*) (Batista e Alves-Gomes, 2006; Batista, 2010), piramutaba (*Brachyplatystoma vaillantii*) (Formiga-Aquino, 2004), filhote capapreta (*Brachyplatystoma capapretum*) (Lira, 2013), o tambaqui (*Colossoma macropomum*) (Santos, 2010), o curimatã (*Prochilodus nigricans*) (Machado, 2009) e o jaraqui (*Semaprochilodus*

*insignis*) (Passos, 2009); espécies com padrões de diferenciação genética, amplamente distribuídas em regiões geográficas na bacia amazônica, como a piraíba (*Brachyplatystoma filamentosum*) (Huego, 2009), o aruanã (*Osteoglossum bicirrhosum*) (Silva, 2009) e o pirarucu (*Arapaima gigas*) (Hrbek *et al.*, 2005; Hrbek *et al.*, 2007); e espécies com padrões de forte estruturação populacional, como o acará-disco (*Symphysodon spp.*) (Farias e Hrbek, 2008, Amado *et al.*, 2011), o babão (*Brachyplatystoma platynemum*) (Orrego, 2012) e o peixe borboleta (*Carnegiella marthae*) (Piggott *et al.*, 2011). As espécies que apresentam populações geneticamente diferenciadas, são isoladas reprodutivamente seja por barreiras geográficas, seja pelo tipo de água ou por sub-bacias hidrográficas diferentes (Farias e Hrbek, 2008; Huego, 2009; Farias *et al.*, 2010; Cook *et al.*, 2012; Terencio *et al.*, 2012).

De acordo com Beaumont e Hoare (2003) são usadas várias denominações para grupos geneticamente diferenciados: “variedades”, “raças”, “linhagens”, “populações” e “estoques”. Estes termos são utilizados desde o passado para descrever diferenciação genética dentro das espécies, mas nem sempre foram claramente definidos. No caso da biologia pesqueira, a palavra “estoque” tem sido frequentemente utilizada pelos gestores de pesca (Beaumont e Hoare, 2003).

Alguns termos vêm sendo utilizados em sinonímia na literatura para denominar grupos geneticamente diferenciados que inclui “Unidades de Conservação” (*Conservation Units*, CUs) que são unidades populacionais identificadas dentro da espécie (Fraser e Bernatchez, 2001; Allendorf e Luikart, 2007; Funk *et al.*, 2012). No presente estudo o termo “estoque” significa: população intercruzante geneticamente homogênea (pool de genes comum), cujos indivíduos possuem os mesmos parâmetros de crescimento e mortalidade, que habitam uma área geográfica particular, geneticamente distinguível de outros estoques contemporâneos e passível de ser manejado (Larkin, 1972; Jamielson, 1974; Sparre e Venema, 1995).

Identificar Unidades de Conservação ou estoque é o primeiro passo para que os gestores conheçam os limites das unidades populacionais que devem ser conservadas (Funk *et al.*, 2012). Não é possível avaliar o status de uma população ou desenvolver uma gestão estratégica, para aumentar as taxas de crescimento da população, sem sabermos os limites populacionais (Funk *et al.*, 2012).

Neste sentido o manejo da pesca e a aplicação de modelos estatísticos para administração pesqueira dependem do conhecimento da diferenciação genética populacional das espécies (Ramírez, 2001).

#### **1.4 Marcadores Moleculares**

A diferenciação genética populacional de uma espécie é o padrão da distribuição da variação genética dentro e entre populações (Laikre *et al.*, 2005). A identificação da diferenciação genética populacional e diversos outros parâmetros é possível mediante a utilização de marcadores moleculares.

No fim da década de 50 iniciaram-se os estudos com marcadores moleculares usando métodos histoquímicos associados à eletroforese de isoenzimas. Tornou-se possível o conhecimento do grau de polimorfismo genético espécie específica (Market e Moller, 1959). Porém, esse marcador não permitiu uma avaliação muito precisa dos níveis de variabilidade genética e de estrutura populacional (Prakash e Lewontin, 1968).

Podemos usar os trabalhos desenvolvidos com espécies do gênero *Pseudoplatystoma* como exemplos dos diversos tipos de marcadores moleculares utilizados ao longo dos últimos anos: marcadores isoenzimáticos e RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) (Ramírez, 2001), isoenzimáticos e PCR-RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) (Coronel *et al.*, 2004), sequência de DNA de marcadores mitocondriais (COI e *D-loop*) e microsatélites (Abreu *et al.*, 2009; Pereira *et al.*, 2009; Carvalho *et al.*, 2012).

Ramírez (2001), em um estudo de genética populacional de duas espécies de bagres da Amazônia, *Pseudoplatystoma fasciatum* (surubim) (atual *P. punctifer*), *P. tigrinum* (caparari), coletadas em três bacias hidrográficas, Magdalena, Orinoco e Amazônica, observou que a maioria dos locos de isoenzimas analisados apresentaram-se monomórficos para duas espécies. Só após análise de dois sistemas isoenzimáticos PGI (Glucose-6-fosfato isomerase) e MDHP (Malato desidrogenase) e cinco marcadores RAPD foi possível observar um alto grau de diferenciação genética entre as populações das diferentes bacias hidrográficas estudadas. No entanto, o autor afirmou que mais estudos de genética de populações, utilizando mais marcadores genéticos, deveriam ser feitos para determinar a distribuição da variação genética das populações dentro e entre as bacias.

Coronel *et al.* (2004), também usando locos de isoenzimas, observaram um baixo nível (ou ausência) de diferenciação genética para populações de *P. fasciatum* (atual *P. punctifer*) dos rios Beni e Ichilo da drenagem Boliviana, no entanto, usando PCR-RFLP de três marcadores mitocondriais: NADH *dehydrogenase* subunidade 2 (ND2), Citocromo-b e *D-loop* detectaram diferenciação genética de linhagem materna entre as duas populações dos dois rios.

Métodos moleculares tradicionais, tais como enzimas de restrição e eletroforese de isoenzimas, vêm sendo amplamente substituídos por outros marcadores moleculares que incluem sequências de genes do DNA mitocondrial, como o COI, e de locos microssatélites (Turner *et al.*, 2004; Carvalho *et al.*, 2012).

O DNA mitocondrial, particularmente o gene Citocromo Oxidase I (COI), além de ser utilizado como código de barras de DNA (*DNA barcode*), vem sendo utilizado também para estimar o grau de diversidade e estruturação genética entre populações de espécies de animais (Turner *et al.*, 2004; Carvalho *et al.*, 2012). Isto se deve a algumas vantagens: à

facilidade de ser isolado, pelo seu tamanho reduzido, por apresentar herança uniparental, ausência de recombinação e elevada taxa de mutação (Avisé, 1994).

Os marcadores microssatélites ou SSRs (*Simple Sequence Repeats* – Sequência Simples Repetidas) são trechos curtos de DNA repetitivo, menores de que 100 pb (Tautz e Renz, 1984) que se repetem em *tandem* (fila) de 1 a 6 nucleotídeos, encontrados em todos os procariotos e eucariotos estudados até o momento (Zane *et al.*, 2002).

No fim da década de 80 Tautz *et al.* (1989) demonstraram a hipervariabilidade dessas regiões. Isto foi possível graças à técnica de PCR, e a utilização de oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) que são sequências complementares às regiões flancadoras dos locos microssatélites, garantindo a aplicação destes como marcadores moleculares. Os microssatélites apresentam alto nível de polimorfismo sendo uma ferramenta molecular bastante eficiente, gerando o dobro de informação, duas vezes mais rapidamente do que obtido com outros marcadores (Weber, 1990). Logo, o seu uso tornou-se extremamente difundido, sendo utilizado em um grande número de estudos, para investigar a diferenciação genética de populações, respondendo a perguntas específicas nas áreas da biologia evolutiva e da conservação (Balloux e Lugon-Moulin, 2002).

Usando sete marcadores moleculares microssatélites, Abreu *et al.*, (2009) observaram alta estruturação genética entre duas populações de *Pseudoplatystoma reticulatum* de dois rios da bacia do Paraguai. Diferenciação genética que também foi observada para *P. corruscans*. Após análise Bayesiana Pereira *et al.*, (2009) confirmaram a divisão *P. corruscans* em seis grupos, que coincidem com seis rios onde foram amostrados na bacia do Paraguai.

Existe semelhança morfológica entre espécimes de *P. corruscans* oriundos da bacia do São Francisco e espécimes da bacia do Paraná-Paraguai. Apesar desta semelhança, Carvalho *et al.*,(2012), usando COI e microssatélites, identificaram alta divergência genética entre as populações de *P. corruscans* destas duas bacias. Estas diferenças estão associadas com a

separação histórica destas bacias hidrográficas, indicando fortemente que os dois grupos populacionais de *P. corruscans* evoluíram independentemente a partir de um ancestral comum. Estas populações foram classificadas como duas UES (Unidade Evolutiva Significativa) (*Evolutionarily significant units*, ESUs) distintas.

As espécies de *Pseudoplatystoma* podem estar ameaçadas devido à grande exploração pesqueira, projetos hidroelétricos, desmatamento e contaminação (Carolsfeld *et al.*, 2003). Estes são os principais fatores que podem contribuir para extinção e aumento dos efeitos estocásticos ambientais e genéticos dentro das populações (Frankham *et al.*, 2004). E, principalmente, pela exploração pesqueira é que *P. reticulatum* e *P. corruscans* se encontram vulneráveis a extinção, de acordo com as categorias de ameaça recomendadas pela IUCN (*International Union for Conservation of Nature*) nas bacias do Paraná-Paraguai (Marques *et al.*, 2002).

*Pseudoplatystoma punctifer*, surubim (Figura 3) espécies-alvo deste estudo, tem distribuição na bacia Amazônica, está entre os cinco bagres Amazônicos com maior valor comercial e mais explorados pela pesca, no entanto, os dados da estatística pesqueira não discriminam as três espécies (*P. punctifer*, *P. tigrinum* e *P. reticulatum*) que ocorrem na bacia Amazônica, apenas tratam como surubim, *Pseudoplatystoma spp.*



**Figura 3.** *Pseudoplatystoma punctifer*.

Historicamente *Pseudoplatystoma punctifer* vem sendo considerado sobre explorado pela pesca, em alguns dos principais pontos de desembarque pesqueiro da Amazônia (por exemplo, no rio Madeira em Porto Velho) (Veríssimo, 1895; Barthem e Goulding, 2007), com



sinais de declínio populacional nos rios da drenagem Boliviana (rios Mamoré, Guaporé, Beni e Ichilo) (Goulding, 1979; Coronel *et al.*, 2004).

No rio Madeira (em Porto Velho), o maior tributário do rio Amazonas, está situado um dos principais pontos do desembarque pesqueiro da Amazônia. Historicamente uma série de corredeiras e cachoeiras do alto rio Madeira (sendo as principais as cachoeiras de Jirau, Santo Antônio e Teotônio), delimitavam duas regiões distintas da bacia Amazônica, a montante a sub-bacia dos rios Mamoré e Guaporé (que será chamada no presente trabalho de sub-bacia do Mamoré e Guaporé) e a jusante a sub-bacia do rio Madeira. E atualmente essas sub-bacias são separadas pelas hidroelétricas de Jirau e Santo Antônio.

Neste sentido e de fundamental importância o conhecimento de como a variabilidade genética de *P. punctifer* estava distribuída antes da construção das hidroelétricas, levando em consideração o papel das cachoeiras do rio Madeira como barreira geográfica para peixes de várzea na bacia Amazônica. Informação essa que pode ser utilizada para conservação e manejo de *P. punctifer* nessas sub-bacias.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo geral**

Estimar a variabilidade genética de *Pseudoplatystoma punctifer* dos rios Madeira, Mamoré e Guaporé na bacia Amazônica, com o uso de marcadores moleculares (mitocondrial e microssatélites), para verificar se a espécie compõe uma população panmítica nesta região.

### **2.2 Objetivos específicos**

- Verificar se existem congruências dos resultados obtidos com os marcadores microssatélites e mitocondrial (gene citocromo c oxidase subunidade 1, COI).
- Estimar se as cachoeiras e corredeiras do alto rio Madeira atuam como barreiras biogeográficas, limitando o fluxo gênico e contribuindo para uma possível estruturação genética.

### **3. CAPITULO I – Artigo**

---

## INTRODUÇÃO

Os bagres são distribuídos nas Américas do Sul e do Norte, Eurásia e África (Briggs, 2005). Pertencem à Ordem Siluriformes, a mais diversa das Ordens de peixes de água doce. São representados por 36 famílias, 478 gêneros e 3.093 espécies (Ferraris, 2007). Dentre os peixes desta Ordem, a família Pimelodidae, exclusivamente Neotropical, destaca-se por sua riqueza de espécies (Briggs, 2005; Lévêque *et al.*, 2008.). Os bagres da família Pimelodidae, são na sua maioria predadores de topo e apresentam um comportamento generalista e oportunista (Mérona e Rankin-de-Mérona 2004; Luca 2010). Além da importância ecológica, os bagres são utilizados na alimentação humana como fonte de proteína. Têm um elevado valor econômico, por apresentarem uma excelente qualidade de carne, com poucos ossos intramusculares e uma alta taxa de crescimento (Coronel *et al.*, 2004), conseqüentemente, são altamente explorados na pesca.

A distribuição das espécies, em geral, depende da conectividade entre habitats, o que, em certa medida permite a dispersão de organismos entre áreas (MacArthur e Wilson, 1967; *apud* Torrente-Vilara *et al.*, 2011). O movimento das espécies aquáticas, nas bacias hidrográficas, pode ser interrompido por: barreiras biogeográficas naturais formadas por corredeiras e cachoeiras; tipo de água, composição química dentre outras características; pela separação entre sub-bacias hidrográficas diferentes, produzindo biotas distintas (Rahel, 2007; Farias e Hrbek, 2008; Farias *et al.*, 2010; Strayer e Dudgeon, 2010; Cook *et al.*, 2012; Terencio *et al.*, 2012). O que tem implicações na forma de se fazer o manejo e a conservação das espécies de água doce (Olden *et al.*, 2010). Por exemplo, no Rio Madeira, principal tributário do rio Amazonas em área, vazão e transporte de sedimentos (Latrubesse *et al.*, 2005), uma área de 19 cachoeiras e corredeiras que se estendem por cerca de 300 km, funciona como barreira de distribuição de algumas espécies de água doce locais (Goulding *et al.*, 2003; Torrente-Vilara *et al.*, 2011). As corredeiras e cachoeiras do rio Madeira delimitam

duas regiões distintas da bacia Amazônica (Goulding *et al.*, 2003): a montante a sub-bacia dos rios Mamoré e Guaporé (que será chamada no presente trabalho de sub-bacia Mamoré/Guaporé) e a jusante a sub-bacia do rio Madeira. Há diferenças claras entre as biotas (assembleias) de peixes da área que fica à montante e à jusante das cachoeiras, indicando que as cachoeiras do Madeira são barreiras geográficas para a migração de algumas espécies de peixes na bacia Amazônica (Farias *et al.*, 2010; Torrente-Vilara *et al.*, 2011).

A compreensão do padrão de distribuição da diversidade genética, nas sub-bacias do rio Madeira e do Mamoré/Guaporé, é um fator fundamental para o conhecimento do papel das cachoeiras do rio Madeira como barreira geográfica para peixes de várzea na bacia Amazônica. A existência de fluxo gênico ou não, entre os organismos aquáticos destas duas sub-bacias hidrográficas, tem papel essencial na dinâmica evolutiva e na modelagem dos padrões de distribuição da diversidade genética na grande bacia Amazônica (Farias *et al.*, 2010).

Os grandes bagres Pimelodídeos, do gênero *Pseudoplatystoma* foram considerados peixes migratórios de longa distância na bacia Amazônica (Barthem e Goulding, 1997). Esses parecem migrar através das cachoeiras do alto rio Madeira sem dificuldade, que aparentemente, não representam uma barreira para as migrações dessas espécies (Goulding, 1979). No entanto, estudos ecológicos e de genética de populações realizados até o presente, têm indicado que as migrações das espécies de *Pseudoplatystoma* da bacia do Paraná-Paraguai ocorrem em uma escala local, e não ao longo de toda a extensão das bacias hidrográficas (Godinho *et al.*, 2007, Abreu *et al.*, 2009; Pereira *et al.*, 2009).

Godinho *et al.*, (2007) com base no estudo de rádio telemetria monitoraram 24 fêmeas de *Pseudoplatystoma corruscans* na bacia do São Francisco. Estes autores observaram que estas fêmeas apresentaram área de vida limitada (localizada), apesar *P. corruscans* ter ampla distribuição nesta bacia. O padrão de migração é dualista: com fêmeas residentes no sítio de

desova (sedentárias) até a próxima estação de desova (movendo-se para montante ou para jusante, para forrageamento ou refúgio) e com fêmeas que migram curtas distâncias e todas retornam no período reprodutivo para os sítios de desova anteriormente ocupados (Godinho *et al.*, 2007).

Em um estudo de genética populacional de ampla amostragem (223 espécimes) para *Pseudoplatystoma corruscans*, na bacia do Paraná-Paraguai, foram identificadas seis populações diferenciadas geneticamente: uma população na calha principal do rio Paraná, uma população em um tributário (rio Ivinhema) do lado esquerdo e outra população no tributário (rio Paranapanema) do lado direito, as outras três populações pertenciam a três tributários (rios Cuiabá, Taquari e Negro) da margem direita do rio Paraguai, ou seja, uma população para cada rio onde foram feitas as amostragens (Pereira *et al.*, 2009). Apesar da amostragem (53 espécimes) uma alta diferenciação genética foi observada entre as populações de *Pseudoplatystoma reticulatum*, do rio Paraguai e de um de seus tributários o rio Juruá (Abreu *et al.*, 2009). Em ambos os casos a diferenciação genética observada foi relacionado ao comportamento de *homing* (Abreu *et al.*, 2009; Pereira *et al.*, 2009).

Coronel *et al.* (2004), usando marcadores moleculares codominantes isoenzimáticos, observaram um baixo nível de diferenciação genética para populações de *P. punctifer* dos rios Beni e Ichilo nas drenagens Boliviana. No entanto, usando PCR-RFLP de três marcadores mitocondriais: NADH *dehydrogenase* subunidade 2 (ND2), Citocromo-b e *D-loop*, detectaram alto nível de diferenciação genética entre as populações dos dois rios, identificando as linhagens maternas.

*Pseudoplatystoma punctifer* (Pimelodidae) espécie-alvo deste estudo, está entre os cinco bagres da bacia Amazônica com maior valor comercial. Tem distribuição em toda a Bacia Amazônica (Buitrago-Suárez e Burr, 2007). *P. punctifer* desempenha importante papel como predador de topo nos ecossistemas de água doce da Amazônia (Petrere, 2004; Mérona e

Rankin-de-Mérona, 2004), e como muitos pimelodídeos da Amazônia é uma espécie generalista e oportunista (Luca, 2010).

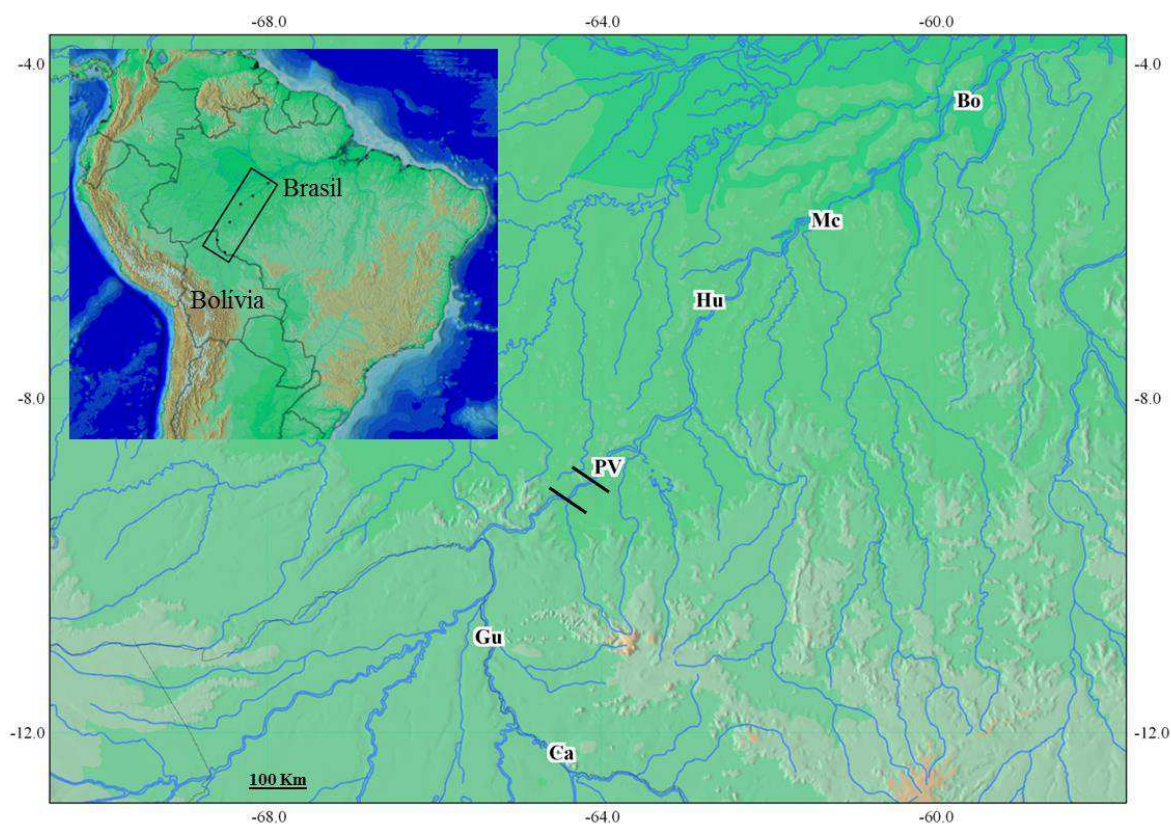
Neste trabalho, foram usados marcadores de DNA nuclear (microsatélites) e mitocondrial (COI) para análise de genética de populações de *P. punctifer*, oriundas da sub-bacia do rio Madeira e da sub-bacia Mamoré/Guaporé, ambas na bacia Amazônica. O conhecimento de como o ciclo de vida de *P. punctifer* tem sido influenciado pelas corredeiras e cachoeiras alto rio Madeira, levando em consideração a sua rota migratória e o quanto de homogeneização genética ocorre entre populações desta espécie, dentro das sub-bacias do rio Madeira e do Mamoré/Guaporé, é muito importante para a conservação e também para o manejo de *P. punctifer*.

Nós testamos a hipótese de panmixia entre as localidades, ou seja, que existe fluxo gênico entre as populações de *Pseudoplatystoma punctifer* destas duas sub-bacias e que as cachoeiras e corredeiras do alto rio Madeira não atuam como barreiras biogeográficas. Estimamos a diversidade genética, fluxo gênico e estruturação genética, em todas as localidades amostradas. Nosso objetivo foi estimar o nível de conectividade genética dos indivíduos de *P. punctifer* entre as sub-bacias do rio Madeira e do Mamoré/Guaporé.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Amostragem e extração de DNA

Foram utilizadas 99 amostras de *Pseudoplatystoma punctifer*, coletadas em seis localidades, entre os anos de 2005 a 2011. Destas, duas localidades estão à montante (Guajará Mirim e rio Cautário - sub-bacia do Mamoré/Guaporé) e quatro localidades à jusante (Porto Velho, Humaitá, Manicoré e Borba - sub-bacia do rio Madeira) das áreas de corredeiras e cachoeiras do rio Madeira (Figura 4).



**Figura 4.** Localidades onde foram amostrados os espécimes de *P. punctifer*. A jusante das cachoeiras e corredeiras, do alto rio Madeira (sub-bacia do rio Madeira): Bo, Borba; Mc, Manicoré; Hu, Humaitá; e PV, Porto Velho. A montante das cachoeiras (sub-bacia do Mamoré/Guaporé): no rio Mamoré em Gu, Guajará-Mirim e Ca, rio Cautário, tributário do rio Guaporé. As linhas transversais representam as cachoeiras do alto rio Madeira.

Em Borba, Humaitá e no rio Cautário os peixes foram coletados com redes de pesca (malhadeira). As demais amostras foram coletadas em desembarques pesqueiros, oriundos da pesca artesanal, como é classificada a pesca comercial na região (Isaac e Barthem, 1995). As amostras de tecido muscular, barbilhão e/ou nadadeiras foram fixados em etanol 95% e



depositados na Coleção de Tecidos de Genética Animal do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Amazonas (CTGA-ICB-/UFAM), no Banco de Tecidos de Recursos Genéticos do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA) e no Laboratório de Ictiologia e Pesca da Universidade Federal de Rondônia (UNIR). O DNA total foi extraído de acordo com o protocolo de fenol-clorofórmio (Sambrook *et al.*, 1989) e com o kit DNeasy blood & tissue (Qiagen), de acordo com o protocolo do fabricante.

## **DNA mitocondrial**

### **Amplificação e sequenciamento do gene COI**

Fragmentos com 536 pares de bases (pb) do gene mitocondrial (DNAm<sub>t</sub>) citocromo-oxidase subunidade 1 (COI), foram obtidos através de reações de polimerase em cadeia (PCR, *polymerase chain reaction*) utilizando os pares de *primers*: BOLCOIF3: 5'TCAACYAATCAYAAAGATATYGGCCA3' e BOLCOIR3: 5'CTTCYGGGTGRCCRAARAATCA3' modificado de Ward *et al.*, (2005) por Ortiz, (2010). Foi adicionado a cauda M13 (-21) (Messing, 1983) no *primer forward* (BOLCOIF3) de acordo com Ivanova *et al.*, (2007). As PCRs foram realizadas em um volume total de 25µL contendo: 9,2 µL de ddH<sub>2</sub>O; 2,0 µL de MgCl<sub>2</sub> a 25mM; 5µL de dNTPs a 1mM; 2,5 µL de tampão 10x (100 mM Tris-HCl, 500 mM KCl); 2,0µL do *primer forward* a 4µM; 2,0µL do *primer reverse* a 4µM; 0.3µL de *Taq* DNA polimerase (Invitrogen) e 2,0 µL de DNA com a concentração variado entre 50-100 nanogramas (ng). As PCRs foram realizadas com a ciclagem: 35 ciclos de desnaturação a 94 °C durante 1 min, anelamento a 55 °C por 40 segundos e extensão a 72 °C durante 1 min, seguido de extensão final a 72 °C por 10min. Os produtos de PCRs foram purificados usando polietilenoglicol 8000 (PEG) e etanol (Paithankar e Prasad, 1991). As reações de sequenciamento nucleotídico foram realizadas de acordo com Platt *et al.*, (2007) usando o Kit *BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing* (Applied Biosystems). Foram realizadas duas

reações de sequenciamento distintas, uma usando o *primer* M13F (-21) e outra com o primer BOLCOIR3. O sequenciamento foi realizado no analisador de DNA *3130xl Genetic Analyzer* (Applied Biosystems).

### **Análise dos dados – gene COI**

Foi utilizado o programa SEQSCAPE 2.7 (Applied Biosystems) para editar e gerar sequências consensos parciais do gene COI. Para o alinhamento das sequências foi utilizado o algoritmo CLUSTALW (Thompson *et al.*, 1994), implementado no programa BIOEDIT (Hall, 1999).

As estimativas de diversidade genética e história demográfica foram calculadas com o programa DNASP 5.00 v.5 (Librado e Rozas, 2009). Testes estatísticos de neutralidade seletiva  $D$  de Tajima (Tajima, 1989) e  $F_s$  de Fu (Fu, 1997), foram utilizados para avaliar se as amostras populacionais se encontram em equilíbrio genético. Estes testes são fundamentais, uma vez que, um desvio significativo do equilíbrio genético do DNA mitocondrial indica expansão ou retração do tamanho populacional. Em condições onde não existe vantagem seletiva entre haplótipos, as mutações detectadas nas sequências nucleotídicas são neutras (não significativas). Teste  $D$  de Tajima é baseado na relação entre o número de sítios polimórficos e no número médio das diferenças nucleotídicas par-a-par, enquanto o teste  $F_s$  de Fu é baseado na probabilidade de se observar um determinado número de alelos, associado à estimativa do parâmetro populacional  $\theta$  (*theta*).

As genealogias entre os haplótipos foram inferidas pela rede de haplótipo construída pelo método de máxima parcimônia (MP), para um intervalo de confiança de 95% (Templeton *et al.*, 1992), a árvore de MP foi gerada no programa TREEFINDER (Jobb *et al.*, 2004) e posteriormente importada para o HAPLOVIEWER (Salzburger *et al.*, 2011) para visualização da rede de haplótipos. Este programa considera a relação entre haplótipos,

agrupando-os a partir das mutações parcimoniosamente informativas presentes em suas sequências nucleotídicas. Na rede de haplótipos, o tamanho dos círculos é proporcional ao número de indivíduos que compartilham o mesmo haplótipo.

A diferenciação genética populacional dos espécimes de *P. punctifer* entre a sub-bacia do rio Madeira e sub-bacia do Mamoré/Guaporé foram quantificadas por meio da Análise de Variância Molecular (AMOVA) (Excoffier *et al.*, 1992). Por se tratar de uma análise hierárquica, a AMOVA foi realizada para quatro agrupamentos diferentes: (1) as seis localidades foram agrupadas e analisadas em um nível hierárquico; (2) analisadas em dois níveis hierárquicos, localidades da sub-bacia do rio Madeira e da sub-bacia do Mamoré/Guaporé; (3) para localidades da sub-bacia do rio Madeira; (4) para localidades da sub-bacia do Mamoré/Guaporé.

Para a análise da AMOVA as amostras das localidades também foram agrupadas em macrorregiões: da sub-bacia do rio Madeira e sub-bacia do Mamoré/Guaporé.

O nível de significância da correlação entre distâncias genéticas e distâncias geográficas entre localidades foi estimado através do teste de Mantel (Mantel, 1967). A distância geográfica (com as medidas em quilômetros) foi estimada usando o programa GOOGLE EARTH (Google Inc., Mountain View, CA, USA), seguindo o curso dos rios entre cada par de localidades onde foram feitas as amostragens.

A AMOVA gera diferentes estimativas: (i) diversidade genética total ( $V_t$ ); (ii) diversidade genética para cada uma das diferentes populações ( $V_a$ ); (iii) diversidade genética entre as populações ( $V_b$ ). Desta forma, o nível de significância da variabilidade genética dentro e entre populações é estimado. Através dos componentes de covariância ( $V_a$  e  $V_b$ ) foi calculado o índice de fixação  $\Phi_{ST}$  (distância genética) entre sub-bacias e entre localidades, que é análogo ao  $F_{ST}$  (Weir e Cockerham, 1984). Os valores de  $\Phi_{ST}$  entre localidades foram organizados em uma matriz de comparação par-a-par. Foi aplicada a correção de Bonferroni

(Rice, 1989) para os valores da probabilidade (P) nos testes de comparação múltipla de  $\Phi_{ST}$ , a fim de avaliar o nível de significância da distância genética. O valor de P com a referida correção foram calculados a partir da razão entre o valor de  $P= 0,05$  e o número de comparações.

A partir dos valores de  $\Phi_{ST}$  foi possível estimar o fluxo gênico (taxas de migração entre sub-bacias e entre localidades). O fluxo gênico é representado pelo número efetivo de fêmeas migrantes por geração ( $Nm$ ), onde  $\Phi_{ST}$  é convertido em  $Nm$ , usando a fórmula  $\Phi_{ST} = (1+4 Nm)^{-1}$  (Slatkin, 1985). Todas as análises (AMOVA, teste de Mantel,  $\Phi_{ST}$  e  $Nm$ ) foram realizadas no programa ARLEQUIN 3.11 (Excoffier *et al.*, 2005) e tiveram sua significância avaliada por testes de permutação (10.000 replicações).

Foi utilizado o programa IMA2 (Hey, 2010) para estimar as taxas de migração ( $m$ ) entre os espécimes das duas sub-bacias ao longo da história coalescente, obtendo-se o número de imigrantes e emigrantes de cada sub-bacia. Para isso, cada par de localidades (a montante e jusante das cachoeiras) foi analisado utilizando 15 cadeias independentes, com 10 mil passos cada e amostragem a cada 100 gerações. Foram armazenadas 100 árvores com descarte das 10 primeiras (considerando *burn-in*= 10%) para cada uma das cadeias.

Para estimar a ocorrência da diferenciação genética populacional foi também usado um método de agrupamento bayesiano através do programa BAPS 5.1 (*Bayesian Analysis of Genetic Population Structure*) (Corander e Tang, 2007; Corander *et al.*, 2008). Este método usa o algoritmo Bayesiano para a formação de *clusters* (grupos) genéticos a partir das frequências nucleotídicas de todas as localidades. *A priori*, o programa considera o número de populações como “desconhecido” para *a posteriori* inferir o número de grupos genéticos. Como parâmetros da análise foram considerados de 1 até 6 grupos genéticos (este último correspondendo ao número total de localidades amostradas), cinco corridas independentes foram realizadas para cada grupo genético com o modelo de mistura (*admixture model*) de

populações, a escolha do número de *clusters* foi realizado pela comparação e escolha do melhor valor da probabilidades (log-likelihood), realizada pelo próprio programa.

## **Microssatélites**

### **Amplificação e genotipagem**

Foram selecionados 10 locos microssatélites polimórficos dos quinze desenvolvidos e disponíveis, para *P. punctifer* (Saulo-Machado *et al.*, 2011). Os locos foram amplificados através de PCRs em um volume total de 10  $\mu$ L contendo: 3,8 $\mu$ L de ddH<sub>2</sub>O; 0,3  $\mu$ L de MgCl<sub>2</sub> a 50 mM, 2,1 $\mu$ L de dNTPs a 1mM, 1 $\mu$ L de tampão 10x (Tris HCl a 750 mM, KCl a 500 mM, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a 200 mM, pH 9,0), 0,4 $\mu$ L do primer *forward* a 4 $\mu$ M com cauda de M13 (Schuelke, 2000), 0,4 $\mu$ L do primer M13 a 4 $\mu$ M marcado (com a fluorescência FAM, HEX ou NED), 0,8 $\mu$ L do primer *reverse* a 4 $\mu$ M, 0,2 $\mu$ L *Taq* DNA polimerase (Invitrogen) e 1,0 $\mu$ L de DNA com a concentração variado de 10-20 ng. As ciclagens da PCR foram realizados de acordo com Batista *et al.*, (2010) e as características genéticas dos *primers* estão descritos em Saulo-Machado *et al.*, (2011). Os produtos das PCRs foram verificados em eletroforese de gel de agarose 1,5%, coradas com GelRed (Biotium) e foto documentados através de luz ultravioleta (UV).

A partir dos produtos de PCR dos locos, foram organizados sistemas multiplex para as genotipagens, levando em consideração o tipo de fluorescência (FAM, HEX ou NED) usada para marcação do loco e os tamanhos dos fragmentos em pb. Estes sistemas permitiram a análise simultânea de cinco locos em cada *well* da placa para cada amostra de DNA (Tabela 1).

Os produtos de PCRs que apresentaram bandas com pouca intensidade foram diluídos em 10-30  $\mu$ L de água ultra pura e os produtos das PCRs que apresentaram bandas intensas, foram diluídas em 30-50  $\mu$ L de água ultra pura. Destas diluições foram utilizados 1,0  $\mu$ L (de cada loco) juntamente com 8,0  $\mu$ L de formamida e 1,0  $\mu$ L do *size standard* ROX este

utilizado como marcador de pb para genotipagem. Posteriormente as amostras foram genotipadas em analisador de DNA automático *3130xl Genetic Analyzer* (Applied Biosystems). O marcador de tamanho padrão ROX (6-carboxi-X-rodamina, ROX *size standard*), consiste em uma série de fragmentos de tamanhos diferentes e conhecidos amplificados com *primers* específicos a partir de um molde de DNA conhecido (pUC19) de acordo com DeWoody *et al.*, (2004).

**Tabela 1.** Multiplex da genotipagem para os 10 locos microssatélites analisados em 99 espécimes de *Pseudoplatystoma punctifer* amostrados na sub-bacia do rio Madeira e na sub-bacia do Mamoré/Guaporé.

| Multiplex  | Locos | Motivo de repetição  | Tamanho (pb) | Fluorescência |
|------------|-------|--|--------------|---------------|
| Multiplex1 | Ppu1  | (AG) <sub>9</sub> aa(AG) <sub>13</sub> aa(AG) <sub>6</sub> | 212-242      | FAM           |
|            | Ppu8  | (AC) <sub>11</sub>   | 300-302      | FAM           |
|            | Ppu7  | (GT) <sub>10</sub>   | 222 -228     | NED           |
|            | Ppu14 | (AC) <sub>10</sub>   | 327-355      | NED           |
|            | Ppu2  | (GT) <sub>14</sub>   | 257-285      | HEX           |
| Multiplex2 | Ppu5  | (GT) <sub>7</sub>  | 234-262      | FAM           |
|            | Ppu11 | (GT) <sub>7</sub>  | 337-343      | FAM           |
|            | Ppu13 | (TG) <sub>13</sub>   | 240-256      | NED           |
|            | Ppu4  | (AG) <sub>15</sub>   | 282 -288     | NED           |
|            | Ppu12 | (CA) <sub>11</sub> cg(CA) <sub>5</sub>                     | 263-279      | HEX           |

### **Análise dos dados - Microssatélites**

O tamanho dos alelos dos microssatélites foi estimado em pb e conferido com o auxílio do programa GENEMAPPER v 4.0 (Applied Biosystems). Após isso, foi construída uma matriz com os tamanhos dos alelos em pares de bases encontrados para todos os espécimes, das seis localidades para os 10 locos estudados. Após a montagem da matriz foram excluídos 18 pb do tamanho de cada alelo correspondente a cauda M13 (Schuelke, 2000).

Após a formação da matriz de dados com os tamanhos dos alelos, esta foi submetida ao programa MICRO-CHECKER (Van Oosterhout *et al.*, 2004) para verificar a ocorrência de alelos nulos (resultantes da não amplificação de alguns alelos, devido às substituições,

inserções ou deleções no sítio de anelamento dos *primers*) (Callen *et al.*, 1993), *stutters* (picos/bandas de gaguejos) e *large dropout* que são alelos amplificados preferencialmente na PCR (Banks *et al.*, 1999).

Foi usado o programa GENALEX 6.41 para calcular a heterozigosidade observada ( $H_O$ ) e esperada ( $H_E$ ). A riqueza alélica ( $A_R$ ), o número total de alelos ( $A_T$ ), o coeficiente de endogamia ( $F_{IS}$ ) e o teste de desequilíbrio de ligação (ocorre quando dois locos estão ligados completamente, não ocorre segregação mendeliana) entre os pares de locos foram estimados no programa FSTAT 2.9.3 (Goudet, 2002). O teste de desvio do Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) foi realizado no programa ARLEQUIN 3.11 (Excoffier *et al.*, 2005).

Os níveis de significância para o teste de equilíbrio de EHW e para desequilíbrio de ligação foram corrigidos pelo método de Bonferroni (Rice, 1989). O número de alelos exclusivos e sua frequência (encontrado em apenas uma amostra, presente em uma localidade) foram obtidos através do programa GENALEX 6.41 (Peakall e Smouse, 2006).

No presente estudo foram utilizadas as estimativas de  $F_{ST}$  de Weir e Cockerham (1984) para análise dos locos microssatélites, recomendada quando são usados nas análises com menos de 20 locos (Gaggiotti *et al.*, 1999). Estas análises são calculadas com base nas frequências alélicas, sob o modelo de mutação por alelos infinitos (IAM, *infinite allele model*). A fim de avaliar o nível de diferenciação genética de *P. punctifer* entre as sub-bacias do rio Madeira e do Mamoré/Guaporé foi usado análise de variância molecular (AMOVA) (Excoffier *et al.*, 1992).

Foram seguidos os mesmos agrupamentos para AMOVA que foram usados para os dados do DNAm: (1) as seis localidades foram agrupadas e analisadas em um nível hierárquico; (2) dois níveis hierárquicos, agrupando as amostras das localidades da sub-bacia do rio Madeira (Borba, Manicoré, Humaitá e Porto Velho) e da sub-bacia do Mamoré/Guaporé (Guajará-Mirim e Cautário); (3) um nível hierárquico para as localidades da

sub-bacia do rio Madeira e (4) um nível hierárquico para as localidades da sub-bacia Mamoré/Guaporé, separadamente.

Para a análise da AMOVA as amostras das localidades também foram agrupadas em macrorregiões: da sub-bacia do rio Madeira e sub-bacia do Mamoré/Guaporé.

Para averiguar uma possível correlação entre distância genética e distancia geográfica foi usado o teste de Mantel considerando duas matrizes, uma com os valores de  $F_{ST}$  par-a-par entre as localidades e outra com as distâncias geográficas.

A matriz com valores de  $F_{ST}$  também foi usada para estimar o fluxo gênico (taxas de migração entre sub-bacias e entre localidades) para o número efetivo de migrantes por geração ( $Nm$ ), em que o  $F_{ST}$  é convertido em  $Nm$ , usando a fórmula  $F_{ST} = (1 + 4 Nm)^{-1}$  (Slatkin, 1985). Todas as análises (AMOVA, teste de Mantel,  $F_{ST}$  e  $Nm$ ) foram realizadas no programa ARLEQUIN 3.11 (Excoffier *et al.*, 2005) e tiveram sua significância avaliada por testes de permutação (10.000 replicações). O fluxo gênico também foi estimado usando-se o programa POP-GEN 1.32 (Yeh e Boyle, 1997) com base na fórmula  $Nm = 0.25(1 - F_{ST})/F_{ST}$ .

Foi calculado o número de imigrantes e emigrantes de cada sub-bacia, ou seja, estimado o sentido da migração ( $m$ ) entre os espécimes das duas sub-bacias ao longo da história coalescente, usando-se o programa IMA2 (Hey, 2010). Para isso, cada par de localidades (a montante e jusante das cachoeiras) foi analisado utilizando 15 cadeias independentes, com 10 mil passos cada e amostragem a cada 100 gerações. Foram armazenadas 100 árvores com descarte das 10 primeiras (considerando *burn-in*= 10%) para cada uma das cadeias.

A diferenciação genética populacional de *P. punctifer* foi avaliada também por análise Bayesiana usando o método de Cadeias de Markov Monte Carlo (MCMC, *Markov Chain Monte Carlo*) no programa STRUCTURE 2.3.4 (Pritchard *et al.*, 2000). Esse programa assume equilíbrio de Hardy Weinberg e de ligação entre os locos analisados dentro de cada



amostra populacional, para atribuir os espécimes a um determinado número K de *clusters* genéticos ou populações. Foi usado o modelo de mistura (*admixture model*), tendo como parâmetros das análises 10 corridas (réplicas) independentes para cada valor de K. Os valores de K variaram entre 1 a 12 (este último correspondendo ao dobro de localidades amostradas) usando valores de corte (*burnin*) de 100.000 permutações e 1.000.000 simulações em cadeias de Monte Carlo (MCMC). O modelo de mistura (*admixture model*) assume que cada espécime pode ter ancestrais oriundos de mais de uma população. As frequências alélicas relacionadas favorecem a identificação de populações estruturadas (Falush *et al.*, 2003). Para estimar o valor mais provável de K foi usando o maior valor da probabilidade L(K). Para estimar o valor de L(K) foi usado o programa STRUCTURE HARVESTER versão da web 0.6.93 (Earl, 2009) disponível no site <http://taylor0.biology.ucla.edu/structureHarvester/#>.

## RESULTADOS

### Diversidade genética de *P. punctifer* com COI

O sequenciamento de 536 pares de bases (pb) do gene mitocondrial COI foi realizado com sucesso em 82 amostras de *Pseudoplatystoma punctifer*, adicionalmente, foram recuperadas 14 sequências do GenBank (5 de Porto Velho, 3 de Manicoré e 6 de Guajará-Mirim, amostras depositadas no INPA) (Ortiz, 2010). Assim, foram analisadas 96 sequências do gene COI de espécimes de *P. punctifer* para as seis localidades amostradas nas sub-bacias do rio Madeira e do Mamoré/Guaporé. Não foram observados códons de parada e inserções ou deleções nas sequencias analisadas. A frequência média da composição de bases nucleotídicas foi de 27,9 % para citosina, 28,3 % para timina, 27,6 % para adenina e 16,2 % para guanina, encontrando-se dentro das proporções esperadas presente no gene COI, observada em teleósteos (Ward *et al.*, 2005) e para espécies de *Pseudoplatystoma* (Ortiz, 2010).

A maior diversidade do COI para *P. punctifer* foi encontrada na sub-bacia do rio Madeira, com a maior diversidade haplotípica ( $0,491 \pm 0,068$ ) e nucleotídica ( $0,00146 \pm 0,00030$ ). Entre as localidades a diversidade haplotípica variou de  $0,324 \pm 0,108$  (Guajará-Mirim) a  $0,667 \pm 0,160$  (Borba), enquanto a diversidade nucleotídica variou de  $0,00060 \pm 0,00020$  (Guajará-Mirim) a  $0,00188 \pm 0,00051$  (Porto Velho) (Tabela 2).

O Teste de neutralidade seletiva  $D$  de Tajima (Tajima, 1989) não foi significativo para nenhuma das seis localidades amostradas. O mesmo resultado foi observado mesmo quando as localidades foram agrupadas em sub-bacias hidrográficas diferentes e para o total do banco de dados (Tabela 2). Os valores de  $F_s$  de  $F_u$  estimados foram em sua maioria negativos, tanto para cada localidade, quanto para os agrupamentos feitos por sub-bacias. Apenas para o total do banco de dados o valor de  $F_s$  de  $F_u$  foi significativo ( $P < 0,001$ ,  $F_s = - 6.336$ ) (Tabela 2).

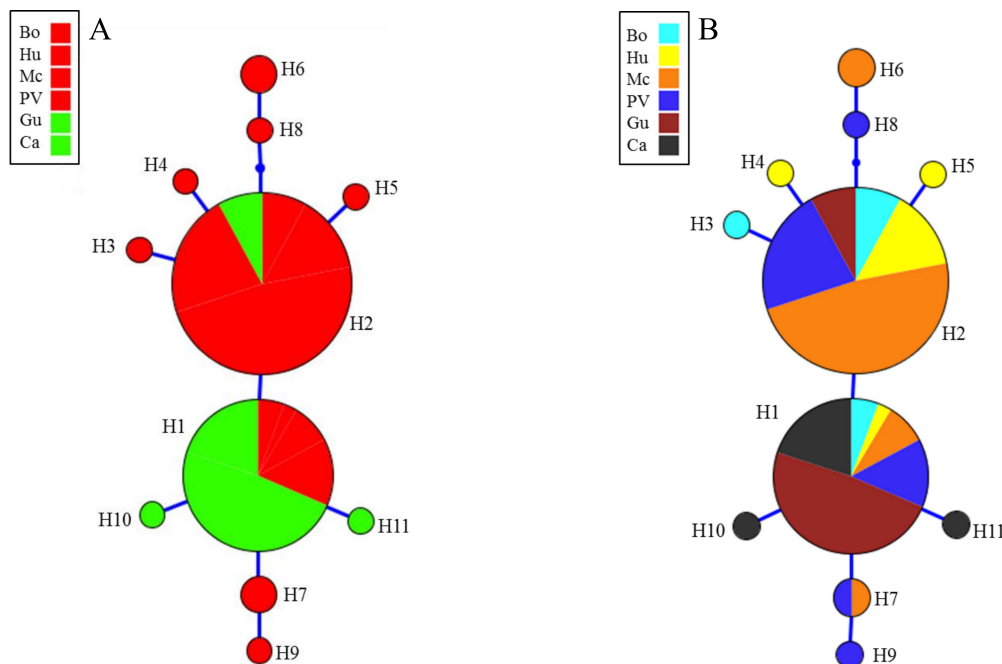
**Tabela 2.** Diversidade genética do *Pseudoplatystoma punctifer*, a partir da análise do gene COI (DNAm). As estimativas da diversidade genética são apresentadas, separadamente: para cada uma das seis localidades, para o total (T) de cada sub-bacia (em negrito) e para o total do banco de dados. Foram estimados: o número de seqüências analisadas (*Nseq*); o número total de haplótipos (*nH*); a frequência de haplótipos (H1 a H11) por amostra (COI Haplótipos), número total de amostras para cada haplótipo entre parênteses, e em negrito os haplótipos únicos; diversidade haplótipica (*Hd*); diversidade de nucleotídeos ( $\pi$ ) e número de sítios variáveis (*S*).

| Rio/localidade                     | <i>Nseq</i> | <i>nH</i> | COI Haplótipos                                    | <i>Hd</i>            | $\pi$                    | <i>S</i> | <i>D</i> de Tajima | <i>F<sub>s</sub></i> de Fu |
|------------------------------------|-------------|-----------|---|----------------------|--------------------------|----------|--------------------|----------------------------|
| Madeira/Borba                      | 7           | 3         | H1(2); H2(4); <b>H3(1)</b>                        | 0,667 ± 0,160        | 0,00142 ± 0,00043        | 2        | -0,27492           | -0,438                     |
| Madeira/Manicoré                   | 30          | 4         | H1(3); H2(24); H6(2); H7(1)                       | 0,356 ± 0,106        | 0,00129 ± 0,00049        | 5        | -1,23243           | -0,470                     |
| Madeira/Humaitá                    | 10          | 4         | H1(1); H2(7); <b>H4(1)</b> ; <b>H5(1)</b>         | 0,533 ± 0,180        | 0,00112 ± 0,00044        | 3        | -1,56222           | -1,964                     |
| Madeira/Porto Velho                | 19          | 5         | H1(5); H2(11); H7(1); <b>H8(1)</b> ; <b>H9(1)</b> | 0,620 ± 0,099        | 0,00188 ± 0,00051        | 5        | -0,92332           | -1,168                     |
| <b>T) Sub-bacia rio Madeira</b>    | <b>66</b>   | <b>9</b>  |   | <b>0,491 ± 0,068</b> | <b>0,00146 ± 0,00030</b> | <b>9</b> | <b>-1,55926</b>    | <b>-4,851</b>              |
| Mamoré/Guajará-Mirim               | 21          | 2         | H1(17); H2(4);                                    | 0,324 ± 0,108        | 0,00060 ± 0,00020        | 1        | 0,29203            | 0,684                      |
| Cautário/Cautário                  | 9           | 3         | H1(7); <b>H10(1)</b> ; <b>H11(1)</b>              | 0,417 ± 0,191        | 0,00083 ± 0,00041        | 2        | -1,36240           | -1,081                     |
| <b>T) Sub-bacia Mamoré/Guaporé</b> | <b>30</b>   | <b>4</b>  |   | <b>0,011 ± 0,103</b> | <b>0,00069 ± 0,00022</b> | <b>3</b> | <b>-1,19598</b>    | <b>-1,885</b>              |
| Total do banco de dados            | 96          | 11        |   | 0,600 ± 0,033        | 0,00157 ± 0,00020        | 11       | -1,59367           | -6,336*                    |

\* Valor significativo ( $P < 0,05$ ).

Foram observados 11 haplótipos, 11 sítios variáveis, e destes 5 sítios informativos para parcimônia, para o total de 96 sequências analisadas. A rede de haplótipos está apresentada na Figura 5. Entre os haplótipos identificados nota-se um círculo diminuto (em azul) que corresponde à haplótipos perdidos ou não amostrados (*missing haplotypes*) (Figura 5).

Do total de haplótipos observados, sete correspondem a haplótipos únicos, representados por apenas um espécime (ou amostra): H3(Borba), H4 e H5 (Humaitá), H8 e H9 (Porto Velho) e H10 e H11(Cautario). O haplótipo mais frequente (H2) foi observado para 46 amostras provenientes da sub-bacia do rio Madeira e quatro amostras da sub-bacia do Mamoré/Guaporé (Figura 5; Tabela 2). O segundo haplótipo mais frequente (H1) foi compartilhado por todas as localidades amostradas, com maior frequência nas localidades da sub-bacia do Mamoré/Guaporé, sendo mais bem representadas.



**Figura 5.** Redes de haplótipos para *Pseudoplatystoma punctifer* obtidas de sequências parciais do gene mitocondrial COI. A, rede de haplótipos por sub-bacia hidrográfica (vermelho: sub-bacia do rio Madeira, verde: sub-bacia do Mamoré/Guaporé); B, rede de haplótipos por localidade. Legenda: Bo, Borba; Hu, Humaitá; Mc, Manicoré; PV, Porto Velho; Gu, Guajará-Mirim; Ca, Rio Cautário.

## **Estrutura Genética de populações de *P. punctifer* para o COI**

A AMOVA (análise 1, Tabela 3), considerando todas as localidades em um único grupo hierárquico, revelou variação genética significativa ( $\Phi_{ST} = 0,274$ ,  $P = 0,000$ ), em que 27,37 % da variabilidade genética foi encontrada entre as localidades. A AMOVA (análise 2, Tabela 3), considerando dois níveis hierárquicos, localidades da sub-bacia do rio Madeira e da sub-bacia do Mamoré/Guaporé, foi observado que 38,43 % da variação genética encontra-se entre sub-bacias. As análises 3 e 4 da AMOVA (Tabela 3), foram realizadas separadamente com um nível hierárquico, a fim de verificar se as localidades das sub-bacias do rio Madeira e do Mamoré/Guaporé, estavam contribuindo para estruturação detectada na AMOVA da análise 2 (Tabela 3). Tanto na análise 3 da sub-bacia do rio Madeira e a análise 4 da sub-bacia do Mamoré/Guaporé, não foi observada estruturação genética significativa entre as localidades (Tabela 3). Quando foram consideradas as duas macrorregiões, agrupando as amostras das localidades da sub-bacia do rio Madeira e da sub-bacia do Mamoré/Guaporé separadamente, a análise de variância molecular mostrou que 39,14 % da variação genética ocorre entre as sub-bacias hidrográficas e 60,86 % dentro das sub-bacias hidrográficas ( $\Phi_{ST} = 0,391$ ;  $P = 0,000$ ). Seguindo o mesmo agrupamento anterior, é observado um restrito número de migrantes entre as sub-bacias ( $Nm = 0,643$ ).

As comparações par-a-par de  $\Phi_{ST}$  entre as localidades obtidas no programa ARLEQUIN evidenciaram diferenciação genética significativa e um baixo número de migrantes ( $Nm$ ) quando comparadas as localidades da sub-bacia do rio Madeira com as localidades da sub-bacia do Mamoré/Guaporé (Tabela 4). O número efetivo de migrantes estimados com o programa IMA2, entre as sub-bacias, indicam que existe uma alta taxa de fluxo gênico da sub-bacia do Mamoré/Guaporé para a sub-bacia do rio Madeira ( $Nm = 34,37$ ), enquanto, fluxo gênico da sub-bacia do rio Madeira para a sub-bacia do Mamoré/Guaporé foi cerca de duas ordens de magnitude menor ( $Nm = 0,55$ ).

**Tabela 3.** Análise da variância molecular (AMOVA) (análises 1 a 4) para *Pseudoplatystoma punctifer* (surubim) com base nas 96 sequências de COI utilizadas neste trabalho. Análise 1, para as 6 localidades agrupadas e analisadas em um nível hierárquico; Análise 2, para dois níveis hierárquicos, localidades da sub-bacia do rio Madeira e da sub-bacia do Mamoré/Guaporé; Análise 3, localidades da sub-bacia do rio Madeira (Bo, Borba; Mc, Manicoré; Hu, Humaitá; PV, Porto Velho); Análise 4, para localidades da sub-bacia do Mamoré/Guaporé (Gu, Guajará-Mirim; Ca, rio Cautário).

| Análises | Partição dos grupos                     |         | Fonte de variação                          | Variação (%) | Índices de fixação | p valor      |
|----------|---|---------|--|--------------|--------------------|--------------|
|          | Grupo 1                                 | Grupo 2 |  |              |                    |              |
| 1        | Todas as localidades                    | -       | Entre as localidades                       | 27,37        | $\Phi_{st}$ 0,273  | <b>0,000</b> |
|          |   |         | Dentro das localidades                     | 72,63        | -                  | -            |
| 2        | Bo+Mc+Hu+PV                             | Gu+Ca   | Entre as sub-bacias                        | 38,43        | $\Phi_{ct}$ 0,384  | 0,066        |
|          |   |         | Entre as localidades/dentro das sub-bacias | 1,81         | $\Phi_{sc}$ 0,027  | 0,175        |
|          |   |         | Dentro das sub-bacias                      | 59,89        | $\Phi_{st}$ 0,401  | <b>0,000</b> |
| 3        | Localidades da sub-bacia do rio Madeira | -       | Entre as localidades                       | 1,50         | $\Phi_{st}$ 0,014  | 0,243        |
|          |   |         | Dentro das localidades                     | 98,50        | -                  | -            |
| 4        | Localidades da sub-bacia Mamoré/Guaporé | -       | Entre as localidades                       | 8,33         | $\Phi_{st}$ 0,083  | 0,086        |
|          |   |         | Dentro das localidades                     | 91,67        | -                  | -            |

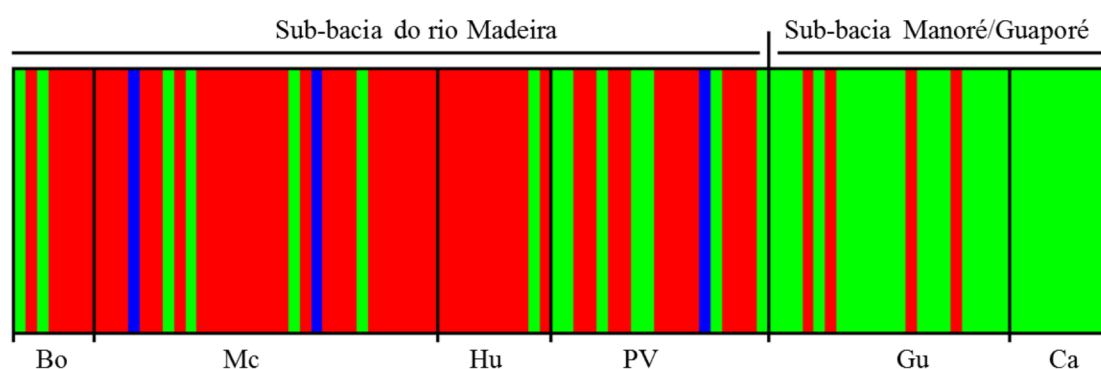
**Tabela 4.** Comparações par-a-par dos valores de  $Nm$  (valores acima da diagonal) e  $\Phi_{ST}$  (valores abaixo da diagonal) estimados entre os espécimes de *Pseudoplatystoma punctifer* amostrados nas seis localidades, com base no gene COI do DNAm.

| Localidades   | Borba        | Manicoré     | Humaitá      | Porto Velho  | Guajará-Mirim | Cautário |
|---------------|--------------|--------------|--------------|--------------|---------------|----------|
| Borba         | -            | inf          | inf          | inf          | 0,835         | 0,602    |
| Manicoré      | -0,005       | -            | inf          | 12,253       | 0,602         | 0,428    |
| Humaitá       | -0,008       | -0,013       | -            | 9,672        | 0,415         | 0,329    |
| Porto Velho   | -0,050       | 0,039        | 0,049        | -            | 1,781         | 1,111    |
| Guajará-Mirim | <b>0,374</b> | <b>0,453</b> | <b>0,546</b> | <b>0,219</b> | -             | 5,505    |
| Cautário      | <b>0,453</b> | <b>0,538</b> | <b>0,602</b> | <b>0,310</b> | 0,083         | -        |

**Inf:** Refere-se a taxas de fluxo gênico que tendem ao infinito. Valores em **negrito** de  $\Phi_{ST}$  indicam valores significativos ( $P < 0,003$ ).

O teste de Mantel de correlação entre distância genética e geográfica (valores de  $\Phi_{ST}$  e unidade de comprimento, Km) foi significativo ( $r = 0,722$ ,  $P = 0,01$ ), indicando que há isolamento por distância para *P. punctifer* entre as sub-bacias do rio Madeira e do Mamoré/Guaporé.

O número de grupos biológicos, estimado pelo método bayesiano do programa BAPS, indicaram a existência de três grupos ( $\log ML = -105,7187$ ; probabilidades para o número de clusters = 1,0) (Figura 6).



**Figura 6.** Análise Bayesiana de estrutura populacional de *Pseudoplatystoma punctifer*. Dados obtidos de 96 sequências nucleotídicas do gene COI do DNAm. Correspondendo a sub-bacia do rio Madeira (Bo, Borba; Mc, Manicoré; Hu, Humaitá; e PV, Porto Velho) e a sub-bacia do Mamoré/Guaporé (Gu, Guajará-Mirim e Ca, rio Cautário).

## Diversidade genética de *P. punctifer* com microssatélites

Foram genotipadas 99 amostras de *P. punctifer* procedentes de seis localidades, representando as sub-bacias hidrográficas, do rio Madeira e do Mamoré/Guaporé. Para a genotipagem foi utilizado um conjunto de 10 locos microssatélites. A matriz de alelos foi analisada no programa MICRO-CHECKER. As localidades foram analisadas conjuntamente para cada um dos locos. Não foi evidenciada a ocorrência de *stutters*, *large dropout* e alelos nulos. Foram observados um total de 104 alelos, variando de 2-22 alelos, para os locos Ppu8 e Ppu4, respectivamente (média 10,4 alelos por loco). Em tamanho, os alelos variaram de 174 a 354 pb (pares de bases). A heterozigosidade esperada ( $H_E$ ) variou de 0,088 (loco Ppu8) a 0,928 (loco Ppu4), com uma média de 0,623 por loco. A heterozigosidade observada ( $H_O$ ) variou de 0,072 (loco Ppu8) a 0,866 (loco Ppu4), com uma média de 0,521 por loco. O loco Ppu4 apresentou o menor valor para o coeficiente de endogamia  $F_{IS}$  (0,068) (Tabela 5).

**Tabela 5.** Índices de diversidade genética para os 99 espécimes de *Pseudoplatystoma punctifer*, amostrados em seis localidades ao longo das sub-bacias do rio Madeira e do Mamoré/Guaporé, calculados com base em 10 locos microssatélites. Na, número de alelos por loco;  $H_E$ , heterozigosidade esperada;  $H_O$ , heterozigosidade observada;  $F_{IS}$ , coeficiente de endogamia.

| Loco         | Na        | Tamanho (bp)    | $H_E$        | $H_O$        | $F_{IS}$     |
|--------------|-----------|-----------------|--------------|--------------|--------------|
| Ppu1         | 17        | 174-222         | 0,807        | 0,742        | 0,081        |
| Ppu2         | 13        | 240-268         | 0,881        | 0,812        | 0,078        |
| Ppu4         | <b>22</b> | 258-302         | <b>0,928</b> | <b>0,866</b> | <b>0,068</b> |
| Ppu5         | 10        | 210-242         | 0,508        | 0,371        | 0,271        |
| Ppu7         | 05        | 200-208         | 0,683        | 0,625        | 0,086        |
| Ppu8         | <b>02</b> | 280-282         | <b>0,088</b> | <b>0,072</b> | 0,189        |
| Ppu11        | 05        | 312-322         | 0,254        | 0,226        | 0,111        |
| Ppu12        | 07        | 239-259         | 0,627        | 0,489        | 0,221        |
| Ppu13        | 08        | 215-229         | 0,754        | 0,541        | 0,283        |
| Ppu14        | 15        | 284- <b>354</b> | 0,698        | 0,468        | <b>0,330</b> |
| <b>Total</b> | 104       | 174-354         | 0,623        | 0,521        | 0,164        |



Dentre os 104 alelos observados, foram detectados 27 alelos exclusivos distribuídos em todas as seis localidades amostradas (Tabela 6). O alelo 348 (Ppu14) presente nas amostras de *P. punctifer* do rio Cautário foi o mais frequente (0,167). As amostras da sub-bacia do Mamoré/Guaporé apresentaram maior número de alelos exclusivos, com as amostras de Guajará-Mirim tendo 9 alelos exclusivos. As amostras de Borba e Humaitá (sub-bacia do rio Madeira) o menor número de alelos exclusivos (1) (Tabela 6).

Considerando separadamente cada loco para cada localidade, foram estimados: o número de alelos (A), a riqueza alélica ( $A_r$ ), a heterozigosidade observada ( $H_o$ ) e esperada ( $H_e$ ), a probabilidade (P) para o teste de equilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE) e o coeficiente de endogamia ( $F_{IS}$ ) por loco em cada uma das seis localidades estudadas (Tabela 7). O número de alelos variou de 1 a (loco Ppu8, nos espécimes de Borba e rio Cautário) 19 alelos por loco (loco Ppu4, nos espécimes de Guajará-Mirim). A riqueza alélica variou de 1,495 (loco Ppu8) a 9,117 (loco Ppu4); as maiores heterozigosidades observada ( $H_o$ ) e esperada ( $H_e$ ) foram de 0,955 e 0,926 respectivamente, para os espécimes de Guajará-Mirim. Os valores de  $F_{IS}$  variaram entre -0.750 (loco Ppu12) a 1,000 (loco Ppu8) para os espécimes coletados em Humaitá.

Desvio do equilíbrio de Hardy-Weinberg foi observado, após a correção de Bonferroni ( $P = 0,005$ ) (Rice, 1989), para as amostras de *P. punctifer* de Guajará-Mirim (locos Ppu2 e Ppu5) (Tabela 7), este resultado pode ser explicado pela presença de alelos nulos. As análises do MICRO-CHECKER realizada para cada localidade e cada loco indicaram a ocorrência de alelos nulos em 2 locos de uma da localidade (Ppu2 e Ppu5 em Guajará-Mirim). Não foi observado desequilíbrio de ligação entre as 270 comparações de pares de locos, depois da correção Bonferroni ( $P = 0,00111$ ).

**Tabela 6.** Alelos exclusivos observados em 10 locos microsatélites de *Pseudoplatystoma punctifer* em seis localidades amostradas. O número dos alelos e sua frequência relativa (entre parênteses) são listados para cada loco, localidade e sub-bacia analisada.

|              | Sub-bacia do rio Madeira |                            |             |                            |               | Sub-bacia Mamoré/Guaporé |       | Total |
|--------------|--------------------------|----------------------------|-------------|----------------------------|---------------|--------------------------|-------|-------|
|              | Borba                    | Manicoré                   | Humaitá     | Porto Velho                | Guajará-Mirim | Cautário                 | Total |       |
| Ppu1         | -                        | 220 (0,067)                | 186 (0,056) | 176 (0,025)<br>210 (0,025) | 208 (0,043)   | -                        | 6     |       |
| Ppu2         | -                        | 240 (0,033)                | -           | 268 (0,025)                | -             | -                        | 2     |       |
| Ppu4         | -                        | -                          | -           | 222 (0,025)                | 300 (0,045)   | 302 (0,056)              | 2     |       |
| Ppu5         | -                        | 212 (0,052)<br>214 (0,017) | -           | -                          | 232 (0,022)   | -                        | 3     |       |
| Ppu7         | -                        | -                          | -           | -                          | -             | -                        | 0     |       |
| Ppu8         | -                        | -                          | -           | -                          | -             | -                        | 0     |       |
| Ppu11        | -                        | -                          | -           | -                          | 312 (0,022)   | -                        | 1     |       |
| Ppu12        | -                        | -                          | -           | -                          | 239 (0,045)   | -                        | 1     |       |
| Ppu13        | 215 (0,071)              | -                          | -           | 217(0,025)                 | -             | -                        | 2     |       |
| Ppu14        | -                        | 284 (0,036)                | -           | -                          | 322 (0,022)   | 296 (0,056)              | 10    |       |
|              |                          |                            |             |                            | 326 (0,022)   | 298 (0,056)              |       |       |
|              |                          |                            |             |                            | 330 (0,022)   | 324 (0,056)              |       |       |
|              |                          |                            |             |                            | 334 (0,022)   | 348 (0,167)              |       |       |
|              |                          |                            |             |                            |               | 354 (0,056)              |       |       |
| <b>Total</b> | 1                        | 5                          | 1           | 5                          | 9             | 6                        | 27    |       |
| <b>Total</b> | 12                       |                            |             |                            |               |                          | 15    |       |

**Tabela 7.** Índices de diversidade genética obtidos para os 10 locos microssatélites de *Pseudoplatystoma punctifer* considerados, separadamente, os grupos de espécimes por localidade de coleta.

|                      |                 | Ppu1   | Ppu2         | Ppu4   | Ppu5         | Ppu7   | Ppu8   | Ppu11  | Ppu12  | Ppu13 | Ppu14  |
|----------------------|-----------------|--------|--------------|--------|--------------|--------|--------|--------|--------|-------|--------|
| Borba<br>N=7         | A               | 6      | 7            | 9      | 3            | 3      | 1      | 3      | 4      | 4     | 3      |
|                      | Ar              | 6,000  | 6,286        | 8,121  | 2,714        | 2,989  | Mono   | 3,000  | 3,571  | 3,714 | 2,857  |
|                      | H <sub>O</sub>  | 0,833  | 1,000        | 0,857  | 0,286        | 0,429  | -      | 0,333  | 0,429  | 0,571 | 0,571  |
|                      | H <sub>E</sub>  | 0,792  | 0,765        | 0,847  | 0,255        | 0,520  | -      | 0,292  | 0,367  | 0,582 | 0,500  |
|                      | F <sub>IS</sub> | 0,038  | -0,235       | 0,065  | -0,043       | 0,250  | -      | -0,053 | -0,091 | 0,094 | -0,067 |
|                      | HWE             | 0,826  | 0,359        | 0,736  | 1,000        | 0,167  | -      | 1,000  | 1,000  | 1,000 | 0,346  |
| Manicoré<br>N=30     | A               | 10     | 12           | 17     | 6            | 5      | 2      | 3      | 6      | 6     | 5      |
|                      | Ar              | 5,742  | 6,762        | 8,638  | 2,911        | 3,276  | 1,363  | 1,955  | 3,899  | 4,530 | 3,200  |
|                      | H <sub>O</sub>  | 0,800  | 0,833        | 0,933  | 0,310        | 0,552  | 0,067  | 0,233  | 0,500  | 0,607 | 0,357  |
|                      | H <sub>E</sub>  | 0,787  | 0,864        | 0,919  | 0,334        | 0,636  | 0,064  | 0,209  | 0,664  | 0,703 | 0,459  |
|                      | F <sub>IS</sub> | 0,001  | 0,053        | 0,002  | 0,089        | 0,149  | -0,018 | -0,097 | 0,263  | 0,155 | 0,238  |
|                      | HWE             | 0,491  | 0,785        | 0,599  | 0,352        | 0,412  | 1,000  | 1,000  | 0,151  | 0,019 | 0,135  |
| Humaitá<br>N=10      | A               | 6      | 7            | 9      | 3            | 5      | 2      | 2      | 2      | 4     | 4      |
|                      | Ar              | 4,994  | 5,891        | 7,038  | 2,200        | 4,235  | 1,853  | 1,667  | 2,000  | 3,544 | 3,568  |
|                      | H <sub>O</sub>  | 0,889  | 0,889        | 0,700  | 0,200        | 0,667  | 0,000  | 0,111  | 0,875  | 0,333 | 0,444  |
|                      | H <sub>E</sub>  | 0,753  | 0,802        | 0,845  | 0,185        | 0,679  | 0,180  | 0,105  | 0,492  | 0,512 | 0,599  |
|                      | F <sub>IS</sub> | -0,123 | -0,049       | 0,222  | -0,029       | 0,077  | 1,000  | 0,000  | -0,750 | 0,400 | 0,312  |
|                      | HWE             | 1,000  | 0,886        | 0,092  | 1,000        | 0,882  | 0,054  | 1,000  | 0,139  | 0,104 | 0,147  |
| Porto Velho<br>N=20  | A               | 11     | 11           | 14     | 5            | 5      | 2      | 4      | 3      | 6     | 4      |
|                      | Ar              | 5,274  | 6,951        | 8,175  | 3,166        | 3,801  | 1,668  | 2,591  | 2,643  | 4,430 | 3,110  |
|                      | H <sub>O</sub>  | 0,750  | 0,800        | 0,842  | 0,526        | 0,600  | 0,150  | 0,350  | 0,300  | 0,550 | 0,450  |
|                      | H <sub>E</sub>  | 0,731  | 0,856        | 0,899  | 0,561        | 0,645  | 0,139  | 0,468  | 0,454  | 0,684 | 0,521  |
|                      | F <sub>IS</sub> | 0,000  | 0,091        | 0,090  | 0,089        | 0,095  | -0,056 | 0,275  | 0,361  | 0,220 | 0,162  |
|                      | HWE             | 0,686  | 0,346        | 0,246  | 0,113        | 0,578  | 1,000  | 0,472  | 0,056  | 0,163 | 0,247  |
| Gujará-Mirim<br>N=23 | A               | 11     | 9            | 19     | 7            | 5      | 2      | 3      | 5      | 4     | 8      |
|                      | Ar              | 5,324  | 6,435        | 9,117  | 4,318        | 4,295  | 1,495  | 1,867  | 3,004  | 3,570 | 4,075  |
|                      | H <sub>O</sub>  | 0,652  | 0,714        | 0,955  | 0,435        | 0,682  | 0,095  | 0,174  | 0,455  | 0,522 | 0,522  |
|                      | H <sub>E</sub>  | 0,738  | 0,849        | 0,926  | 0,644        | 0,715  | 0,091  | 0,162  | 0,500  | 0,681 | 0,600  |
|                      | F <sub>IS</sub> | 0,138  | 0,183        | -0,008 | 0,344        | 0,069  | -0,026 | -0,054 | 0,114  | 0,255 | 0,152  |
|                      | HWE             | 0,065  | <b>0,000</b> | 0,317  | <b>0,000</b> | 0,319  | 1,000  | 1,000  | 0,034  | 0,059 | 0,299  |
| Cautário<br>N=9      | A               | 6      | 8            | 9      | 4            | 4      | 1      | 2      | 4      | 3     | 8      |
|                      | Ar              | 4,990  | 6,230        | 6,877  | 3,569        | 3,661  | Mono   | 1,667  | 3,637  | 2,990 | 6,211  |
|                      | H <sub>O</sub>  | 0,556  | 0,778        | 0,667  | 0,333        | 0,889  | -      | 0,111  | 0,667  | 0,556 | 0,667  |
|                      | H <sub>E</sub>  | 0,741  | 0,772        | 0,790  | 0,636        | 0,673  | -      | 0,105  | 0,611  | 0,593 | 0,747  |
|                      | F <sub>IS</sub> | 0,304  | 0,051        | 0,213  | 0,520        | -0,267 | -      | 0,000  | -0,032 | 0,121 | 0,165  |
|                      | HWE             | 0,097  | 0,340        | 0,054  | 0,007        | 0,580  | -      | 1,000  | 0,830  | 0,642 | 0,132  |

Número de espécimes analisados em cada localidade (N); Número de alelos (A); Riqueza alélica (Ar); Heterozigosidade observada (H<sub>O</sub>); Heterozigosidade esperada (H<sub>E</sub>); Coeficiente de endogamia (F<sub>IS</sub>); Probabilidade do teste de Equilíbrio de Hardy Weinberg (HWE), com valor de P = 0,05 (ajuste de correção de Bonferroni P = 0,005).

## **Estrutura Genética de populações de *P. punctifer* para microssatélites**

As análises da AMOVA dos microssatélites seguiram os mesmos agrupamentos usados para as análises que foram feitas para o COI (Tabela 8).

O resultado da análise 1, considerando todas as localidades em um único grupo hierárquico, revelou variação genética significativa ( $F_{ST} = 0,073$ ,  $P = 0,000$ ) entre as localidades estudadas, no entanto 92,63 % da variabilidade genética foi encontrada dentro das localidades (Tabela 8).

O  $F_{ST}$  foi significativo ( $F_{ST} = 0,093$ ,  $P = 0,000$ ) na segunda análise da AMOVA (Análise 2, Tabela 8), considerando dois níveis hierárquicos (localidades da sub-bacia do rio Madeira e da sub-bacia do Mamoré/Guaporé) observando-se 4,70 % de variação genética entre sub-bacias, indicando que existe diferenciação genética.

A análises 3 da AMOVA para a sub-bacia do rio Madeira também foi significativa ( $F_{ST} = 0,058$   $P = 0,000$ ) indicando estruturação genética entre as localidades, com 5,89 % da variação genética entre das localidades (Tabela 8). Na análise 4 da AMOVA para a sub-bacia do Mamoré/Guaporé, não foi observada estruturação genética significativa entre as localidades.

Agrupando as localidades em duas macrorregiões, sub-bacia do rio Madeira e sub-bacia do Mamoré/Guaporé, a análise de variância molecular mostrou que 6,77 % da variação genética esta entre sub-bacias hidrográficas e 93,23% dentro das sub-bacias hidrográficas, com o índice de fixação ( $F_{ST}$ ) de 0,067 ( $P = 0,000$ ) com o número de migrantes entre sub-bacias de  $Nm = 6,883$ .

O número de migrantes ( $Nm$ ) calculados no ARLEQUIN par-a-par entre as localidades de acordo com Slatkin, (1985), variaram entre 2,275 a 36,562 (Tabela 9).

**Tabela 8.** Análise da variância molecular (AMOVA) (análise 1 a 4) para *Pseudoplatystoma punctifer* (surubim) com base em 10 locos microsatélites. Análise 1, As seis localidades foram agrupadas e analisadas em um nível hierárquico; Análise 2, analisadas em dois níveis hierárquicos, localidades da sub-bacia do rio Madeira e da sub-bacia do Mamoré/Guaporé; Análise 3, localidades da sub-bacia do rio Madeira (Bo, Borba; Mc, Manicoré; Hu, Humaitá; PV, Porto Velho); Análise 4, para localidades da sub-bacia do Mamoré/Guaporé (Gu, Guajará-Mirim; Ca, rio Cautário).

| Análise | Partição dos grupos                     |         | Fonte de variação                          | Variação (%) |                       | Índices de fixação | p valor |
|---------|---|---------|--|--------------|-----------------------|--------------------|---------|
|         | Grupo 1                                 | Grupo 2 |  |              |                       |                    |         |
| 1       | Todas as localidades                    | -       | Entre as localidades                       | 7,37         | F <sub>ST</sub> 0,073 | <b>0,000</b>       |         |
|         |   |         | Dentro das localidades                     | 92,63        | -                     | -                  |         |
| 2       | Bo+Mc+Hu+PV                             | Gu+Ca   | Entre as sub-bacias                        | 4,70         | F <sub>CT</sub> 0,047 | 0,136              |         |
|         |   |         | Entre as localidades/dentro das sub-bacias | 4,61         | F <sub>SC</sub> 0,048 | <b>0,000</b>       |         |
|         |   |         | Dentro das sub-bacias                      | 90,69        | F <sub>ST</sub> 0,093 | <b>0,000</b>       |         |
| 3       | Localidades da sub-bacia do rio Madeira | -       | Entre as localidades                       | 5,89         | F <sub>ST</sub> 0,058 | <b>0,000</b>       |         |
|         |   |         | Dentro das localidades                     | 94,11        | -                     | -                  |         |
| 4       | Localidades da sub-bacia Mamoré/Guaporé | -       | Entre as localidades                       | 1,39         | F <sub>ST</sub> 0,013 | 0,107              |         |
|         |   |         | Dentro das localidades                     | 98,61        | -                     | -                  |         |

**Tabela 9.** Comparações par-a-par dos valores de  $Nm$  (valores acima da diagonal) e  $F_{ST}$  (valores abaixo da diagonal) estimados entre os espécimes de *Pseudoplatystoma punctifer* amostrados nas seis localidades, com base em 10 locos microssatélites.

|               | Borba        | Manicoré     | Humaitá      | Porto Velho  | Guajará-Mirim | Cautário |
|---------------|--------------|--------------|--------------|--------------|---------------|----------|
| Borba         | –            | 7,884        | 5,041        | 7,408        | 3,455         | 2,880    |
| Manicoré      | <b>0,059</b> | –            | 5,600        | 32,118       | 6,148         | 5,298    |
| Humaitá       | <b>0,090</b> | <b>0,081</b> | –            | 3,323        | 2,695         | 2,275    |
| Porto Velho   | <b>0,063</b> | 0,015        | <b>0,130</b> | –            | 9,335         | 9,943    |
| Guajará-Mirim | <b>0,126</b> | <b>0,075</b> | <b>0,156</b> | <b>0,050</b> | –             | 36,562   |
| Cautário      | <b>0,147</b> | <b>0,086</b> | <b>0,180</b> | <b>0,047</b> | 0,013         | –        |

Valores em negrito de  $F_{ST}$  indicam valores significativos ( $P < 0,003$ ).

Apenas duas estimativas de  $F_{ST}$  não foram significativas (Tabela 9), entre Manicoré e Porto Velho, localidades que estão na sub-bacia do rio Madeira à jusante das cachoeiras e entre Guajará-Mirim e Cautário que estão na sub-bacia do Mamoré/Guaporé à montante das cachoeiras.

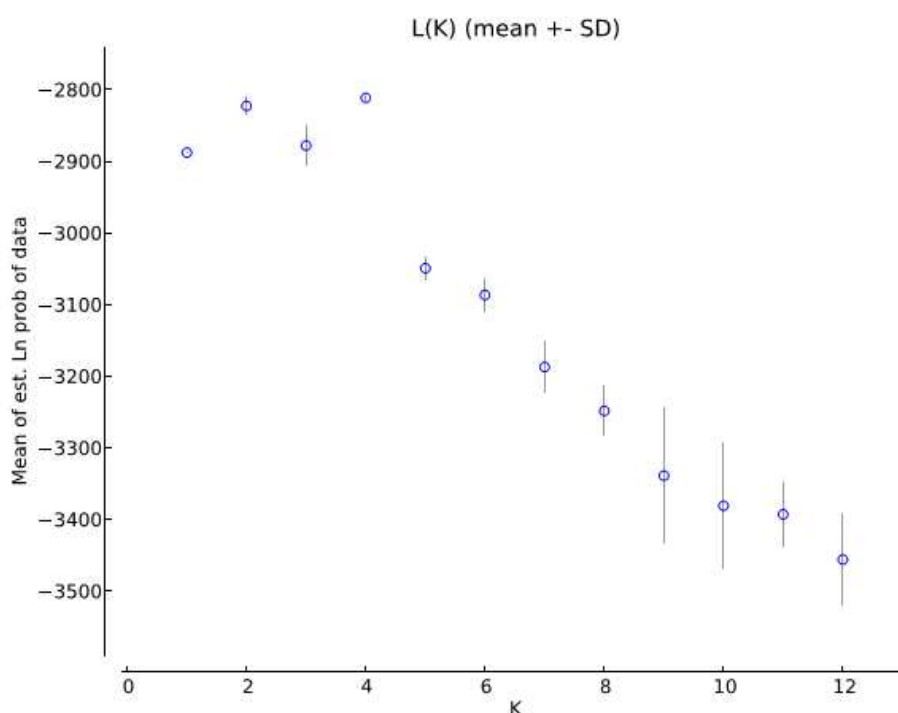
Para os microssatélites o teste de Mantel também foi significativo, indicando que existe associação entre as distâncias genética ( $F_{ST}$ ) e distância geográfica (km) ( $r = 0,509$ ,  $P = 0,04$ ).

O número de migrantes por geração ( $Nm$ ) também foi estimado usando-se o POP-GEN 1.32 de acordo com Yeh e Boyle, (1997). Foi estimado o fluxo gênico entre as seis localidades ( $Nm = 1,995$ ), entre as localidades da sub-bacia do rio Madeira ( $Nm = 2,443$ ), entre as localidades da sub-bacia do Mamoré/Guaporé ( $Nm = 9,442$ ) e entre sub-bacias ( $Nm = 6,022$ ) que foi semelhantes ao obtidos no programa ARLEQUIN.

O número efetivo de migrantes estimado com o programa IMA2, entre as sub-bacias, indica que o fluxo gênico da sub-bacia do Mamoré/Guaporé para a sub-bacia do rio Madeira ( $Nm = 7,88$ ) e maior, quando comparado com o fluxo gênico da sub-bacia do rio Madeira para a sub-bacia do Mamoré/Guaporé ( $Nm = 1,96$ ).

Em complemento às análises que foram usadas para verificar estruturação genética, foi realizada análise Bayesiana nos programa STRUCTURE 2.3.4, uma análise envolvendo os 10 locos microssatélites e outra com nove locos, removendo o loco Ppu8 que foi monomórfico para os espécimes das localidades de Borba e do rio Cautário (Tabela 7).

Os resultados do programa STRUCTURE das estimativas das probabilidades  $L(K)$  tanto com nove e 10 locos indicaram  $K = 4$ , no entanto, os valores médios da probabilidade  $L(K)$  com nove locos para  $K = 2$  (-2785,56) e  $K = 4$  (-2782,53) e com 10 locos para  $K = 2$  (-2822,58) e  $K=4$  (-2811,28), não tiveram diferenças significativas (Figura 7).



**Figura 7.** Resultados do STRUCTURE HARVESTER, indicando  $K= 4$ , como a maior probabilidade para os dados do presente estudo, resultado para 10 locos. Na vertical temos a média da estimativa da distribuição das probabilidades dos dados e na horizontal número de clusters testados ( $K$ ) e o desvio padrão ( $SD$ ) da probabilidade média.

## DISCUSSÃO

### *Diferenciação genética e fluxo gênico para *Pseudoplatystoma punctifer**

Com base nas análises do gene COI e dos microssatélites não podemos rejeitar totalmente a hipótese de panmixia para *Pseudoplatystoma punctifer* entre as duas sub-bacias. O fluxo gênico, apesar de restrito, foi observado entre as localidades e entre as sub-bacias. Foi evidenciado que os espécimes de *P. punctifer* das sub-bacias do rio Madeira e do Mamoré/Guaporé apresentam uma diferenciação genética forte e intermediária (de acordo com a escala de Wright, 1978) para o gene COI e microssatélites, respectivamente.

As estimativas da diferenciação genética obtidas com o gene COI do DNAm foram superiores às obtidas com dados dos microssatélites na área de estudo. Esta discrepância pode ser explicada por: (1) diferentes taxas mutacionais do DNA nuclear de herança biparental (microssatélites) e DNAm de herança uniparental (COI); (2) por dispersão diferencial entre machos e fêmeas, com a possibilidade das fêmeas serem mais sedentárias que os machos, comportamento que já foi observado para fêmeas de outra espécie do gênero (Godinho *et al.*, 2007).

A análise Bayesiana do programa STRUCTURE para os microssatélites não foi precisa em determinar o número exato de populações. Os resultados indicaram a probabilidade de existirem duas ou quatro populações, o que pode estar relacionado ao nível intermediário de diferenciação genética (Wright, 1978) altamente significativa. O que foi observado entre as localidades da sub-bacia do rio Madeira (AMOVA  $F_{ST} = 0,058$ ;  $P = 0,000$ ) (análise 3, Tabela 8) e entre sub-bacias e que será discutido posteriormente. A maior parte das comparações das estimativas de  $F_{ST}$  par-a-par entre as localidades da sub-bacia do rio Madeira, indicaram níveis intermediários de



diferenciação genética, apenas a comparação entre Porto Velho e Manicoré não foi significativa (Tabela 9).

Esse padrão da distribuição da diversidade genética é semelhante ao que já foi observado para *Pseudoplatystoma corruscans* e *P. reticulatum* na bacia do Paraná Paraguai, o que pode indicar que as migrações de *P. punctifer* ocorram em uma escala local, e não ao longo de toda a bacia Amazônica, como havia sido proposto por Barthem e Goulding (1997).

A diferenciação genética observada entre as localidades da sub-bacia do rio Madeira, que estão à jusante das cachoeiras, pode estar relacionada com possíveis populações não amostradas da bacia Amazônica, com o isolamento por distância observado no teste de Mantel (SSR e COI) e com as amostras que foram coletadas em Humaitá, no lago de Carapanatuba. De acordo com Barthem e Goulding (1997) os surubins usam extensivamente lagos de várzea como área de criação, e podem ficar presos nos lagos no período da vazante dos rios até o próximo pulso de inundação.

Dentre os ambientes ocupados pelos bagres do gênero *Pseudoplatystoma*, na bacia Amazônica os lagos tem papel importante. Neles os surubins não entram em competição por recurso com os grandes bagres do gênero *Brachyplatystoma*, que usam como área de criação o estuário Amazônico, e preferencialmente os canais principais dos rios como área de forrageamento. Em uma recente *check list* no lago Cuniã com 18 mil hectares (ha), em uma importante área protegida na margem esquerda do rio Madeira, foi confirmada a presença de bagres do gênero *Pseudoplatystoma* e ausência de bagres do gênero *Brachyplatystoma* (Queiroz *et al.*, 2013). Portanto, nos lagos Amazônico observava-se notável riqueza de espécies de peixes, sendo que a maioria delas faz parte da dieta do *P. punctifer* (Luca, 2010).

A análise da variância molecular (AMOVA) entre as populações de *P. punctifer*, das duas sub-bacias também indicou diferenciação genética intermediária altamente significativa ( $F_{ST} = 0,067$  %,  $P = 0,000$ ).

O resultado da AMOVA obtido no presente estudo entre as sub-bacias foi semelhante ao encontrado entre as populações de *P. corruscans* ( $F_{ST} = 6,41$ %,  $P = 0,0001$ ) da bacia do Paraná-Paraguai (Pereira *et al.*, 2009), embora a variação genética entre as populações tenham sido relativamente baixas nesses estudos, os valores de  $P$  foram altamente significativos, ao indicarem diferenciação genética.

Usando sete marcadores moleculares microssatélites, a estimativa da AMOVA foi superior para *P. reticulatum*, indicado alta estruturação genética entre as populações do rio Paraguai e do rio Jauru, com 22 % de variação genética entre duas populações ( $F_{ST} = 0,229$ ,  $P < 0,0001$ ) e um restrito fluxo gênico entre as mesmas ( $Nm = 0,8417$ ) (Abreu *et al.*, 2009).

Dos 27 alelos exclusivos encontrados para *P. punctifer*, 15 alelos caracterizam a população da sub-bacia do Mamoré/Guaporé e 12 alelos caracterizam a população da sub-bacia do rio Madeira, sendo que todas as localidades apresentaram pelo menos um alelo exclusivo. O elevado número de alelos exclusivos observados para os espécimes de *P. punctifer* entre as sub-bacias do rio Madeira e do Mamoré/Guaporé, podem estar diretamente relacionados com o nível de diferenciação genética e com o fluxo gênico restrito observado entre as sub-bacias. Os alelos exclusivos mostram-se como uma estimativa indireta do fluxo gênico ( $Nm$ ) (Slatkin 1985). O tempo que, um novo alelo permanece exclusivo para uma população, depende apenas sobre as taxas de migração, de modo que a proporção de alelos que são exclusivos diminui com o aumento da taxa de migração. Se o fluxo gênico for alto, os alelos exclusivos serão incomuns (Allendorf e Luikart, 2007).

Os resultados obtidos, pelas estimativas de fluxo gênico nas análises dos microssatélites entre sub-bacias (ARLEQUIM,  $Nm = 6,883$  e POP-GEN,  $Nm = 6,022$ ) e entre as seis localidades (Tabela 9), indicam que ocorre fluxo gênico restrito entre as populações de *P. punctifer* das sub-bacias do rio Madeira e do Mamoré/Guaporé. Com dados de microssatélites o fluxo gênico restrito também foi observado para *P. corruscans* entre todas as localidades ( $Nm = 2,65$ ) e entre grupos geograficamente mais próximos ( $Nm = 4,08$  e  $Nm = 3,65$ ).

O número de migrantes por geração de *P. punctifer* obtidos com os dados do gene COI, foram extremamente baixos entre sub-bacias ( $Nm = 0,643$ ). Quando o  $Nm$  foi estimado par-a-par entre as localidades da sub-bacia do rio Madeira e do Mamoré/Guaporé, foi observado um baixo índice de fêmeas migrantes por geração, entre Humaitá e Cautário ( $Nm = 0,329$ ) e entre Borba e Guajará-Mirim ( $Nm = 0,835$ ). Apenas as estimativas entre localidades de Porto Velho e Guajará-Mirim ( $Nm = 1,781$ ) e Porto Velho e Cautário ( $Nm = 1,111$ ) foram ligeiramente maiores. Esses valores podem ser explicados pelas distâncias geográficas entre essas localidades, visto que o teste de Mantel foi significativo. O que, indicou haver correlação entre as distâncias genéticas e geográficas, e, portanto a distância geográfica também é um importante fator para limitar o fluxo gênico entre as localidades e entre sub-bacias, indicando que as migrações de *P. punctifer* ocorrem em uma escala local.

O fluxo gênico bidirecional, mas não simétrico entre as sub-bacias, com um maior número efetivo de migrantes da sub-bacia do Mamoré/Guaporé para sub-bacia do rio Madeira, observado com o COI ( $Nm = 34,37$ ) e com os microssatélites ( $Nm = 7,88$ ), explica-se pelo o fluxo gênico passivo, ou seja, o transporte de ovos, larvas e indivíduos juvenis pela correnteza, da sub-bacia do Mamoré/Guaporé para a sub-bacia do rio Madeira. As planícies alagadas (várzeas) da sub-bacia do rio Madeira, com a quantidade

de sedimentos em suspensão e a heterogeneidade de ambientes, com grande quantidade de material alóctone produzido pela floresta ao longo rio, constituem um ambiente favorável, para criadouros naturais de muitas espécies de peixes (Paiva, 1982; Lowe-McConnel, 1987).

Já o fluxo gênico restrito observado com o COI ( $Nm = 0,55$ ) e com os microssatélites ( $Nm = 1,96$ ) da sub-bacia do rio Madeira para a sub-bacia do Mamoré/Guaporé (subindo o rio) explica-se pela dificuldade dos espécimes de *P. punctifer* transporem as cachoeiras e com possíveis migrações dos machos (considerado os resultados dos microssatélites).

Fluxo gênico restrito e a diferenciação genética ( $F_{ST} = 0,135$   $P = 0,004$ ) já haviam sido reportados para *Pseudoplatystoma punctifer* (surubim), entre dois rios da drenagem Boliviana (rios: Beni e Ichilo) (Coronel *et al.*, 2004). Vale destacar que foram identificadas duas linhagens maternas correspondentes a populações de cada rio (rios: Beni e Ichilo), foram usados três marcadores mitocondriais (NADH dehydrogenase subunidade 2 (ND2), Cyt-b e D-loop) com a técnica de PCR-RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) (Coronel *et al.*, 2004).

A diferenciação genética de linhagem materna, também foi encontrada no presente estudo, com 39,14 % da variação genética entre as sub-bacias hidrográficas ( $\Phi_{ST} = 0,391$ ,  $P = 0,000$ ). Todas as estimativas dos índices de  $\Phi_{ST}$  par-a-par, comparadas entre as localidades da sub-bacia do rio Madeira com relação às localidades da sub-bacia do Mamoré/Guaporé foram altamente significativos e também indicaram uma grande diferenciação genética (Tabela 4).

A diferenciação genética populacional tem sido comum para as espécies do gênero *Pseudoplatystoma* estudadas até o presente (Coronel *et al.*, 2004; Abreu *et al.*, 2009; Pereira *et al.*, 2009; Carvalho *et al.*, 2012).

## ***Evidências genéticas do sedentarismo das fêmeas e da migração dos machos de *Pseudoplatystoma punctifer****

Alguns fatores podem estar influenciando a diferenciação genética entre as populações de *Pseudoplatystoma punctifer* da sub-bacia do rio Madeira e da sub-bacia do Mamoré/Guaporé. Considerando que as espécies de *Pseudoplatystoma* apresentem um comportamento semelhante, nossos resultados indicam que grande parte da diferenciação genética ( $\Phi_{ST} = 39,14\%$ ) como fluxo gênico restrito ( $Nm = 0,643$ ), observado pela análise do DNAmt entre as populações das duas sub-bacias, pode ser explicado pelo sedentarismo das fêmeas de *P. punctifer*.

Acreditamos que as fêmeas de *P. punctifer* apresentem o mesmo padrão de migrações e desovas que foi proposto para *P. corruscans* (Godinho *et al.*, 2007), no entanto, com base nos resultados obtidos no presente trabalho, foi descartada a possibilidade de haver o comportamento de *homing*, o que foi considerado para explicar a diferenciação genética de *P. corruscans* e *P. reticulatum* da bacia do Paraná-Paraguai (Abreu *et al.*, 2009; Pereira *et al.*, 2009).

Apesar de ter sido evidenciada estruturação genética entre as populações de *P. punctifer* das duas sub-bacias com os microssatélites, a mesma foi relativamente menor ( $F_{ST} = 6,77\%$ ,  $P = 0,000$ ). As maiores taxas de fluxo gênico e o nível de compartilhamento de alelos observados com os microssatélites no presente trabalho podem estar sendo estabelecidos pelas migrações dos machos de *P. punctifer* ( $Nm = 1,96$  migração realizada da sub-bacia do rio Madeira para a sub-bacia do Mamoré/Guaporé, subindo o rio, transpondo as cachoeiras), visto que o fluxo gênico foi restrito com base no marcador de herança materna (COI).

Neste sentido, propomos um modelo para as migrações dos machos de *P. punctifer* o qual está baseada no valor adaptativo dos machos (capacidade de produzir

descendentes) (Futuyma, 2009), que migram entre as sub-bacias (subindo ou descendo o rio, transpondo as cachoeiras) em busca de fecundar o maior número possível de óvulos de diferentes fêmeas, em diferentes sítios de desova (na mesma ou em diferentes estações reprodutivas), assegurando a produção de um maior número de descendentes, tal que, uma quantidade significativa deles sobreviva até o estágio reprodutivo.

O mesmo padrão genético com alta diferenciação genética com marcadores mitocondriais de herança materna, e um baixo nível de diferenciação genética observados para marcadores codominantes (isoenzimas), já haviam sido relatado na literatura para *P. fasciatum* (atual *P. punctifer*) (Coronel *et al.*, 2004). O que, pode reforçar o comportamento sedentário das fêmeas, e da migração dos machos baseado no valor adaptativo de *P. punctifer* (proposto no presente trabalho). Esse comportamento não foi considerado por Coronel *et al.*, (2004).

Usando dados do DNAm foi observado elevada diferenciação genética entre as populações do tubarão branco (*Carcharodon carcharias*), da região costeira da Austrália e da África do Sul; no entanto, com dados microssatélites foi observada ausência de diferenciação genética (Pardini *et al.*, 2001). De acordo com os autores o fluxo gênico é mediado pelos machos, sendo suficiente para homogeneizar as frequências alélicas dos microssatélites. O que provavelmente possa está acontecendo com os machos de *P. punctifer*, entre as sub-bacias do rio Madeira e do Mamoré/Guaporé.

Além das evidências genéticas observadas no presente trabalho, evidências ecológicas podem corroborar a dispersão diferencial entre machos e fêmeas de *P. punctifer*.

Uma maior proporção sexual de fêmeas, chegando 17 fêmeas para 1 macho, entre os meses de outubro a março, e 3 fêmeas para 1 macho de abril a outubro,

observado para *P. punctifer* na sub-bacia do Rio Teles Pires (Luca, 2010), podem reforçar a proposta de sedentarismo das fêmeas e indicar que os machos apresentam um padrão migratório diferente, ou seja, que os machos migram mais.

De acordo com Dudley e Simpfendorfer, (2006) fêmeas de peixes que apresentam o comportamento sedentário podem ser mais suscetíveis à pressão de pesca, o que pode explicar uma maior proporção de fêmeas de *P. punctifer* capturadas no estudo da sub-bacia do Rio Teles Pires (Luca, 2010).

As repetidas visitas das fêmeas maduras (que não foram residentes) no mesmo sítio de desova e no mesmo período reprodutivo sugerem que as mesmas desovaram mais de uma vez (Godinho *et al.*, 2007). Além disso, os ovários de surubins pós-desova são característicos de espécies de peixes que apresentam desovas múltiplas (Lamas e Godinho 1996; Rinchard e Kestemont, 1996; Godinho *et al.*, 1997; Msiska e Costa-Pierce, 1999). Sendo que fazem uma pré-desova no final de setembro a dezembro e uma pós-desova de janeiro a março (Godinho *et al.*, 2007).

A média linear da área de vida das fêmeas de *P. corruscans* é de 87 km ( $87 \pm 70$  km; média  $\pm$  SD) variando no máximo de 1 a 210 km, sendo a menor área de vida já descrita até agora para espécies de peixes da América do Sul (Godinho *et al.*, 2007). As correlações significativas entre as distâncias genéticas e geográficas, observadas para *P. punctifer* com os microssatélites e com o COI, no presente trabalho, calculadas através do teste de Mantel, podem ser explicadas pelo sedentarismo e pela limitada área de vida das fêmeas e consequentemente pelo isolamento por distância. Vale destacar que a menor distância geográfica entre as localidades amostradas no presente trabalho, entre as duas sub-bacias foi de 404 km, entre Porto Velho (sub-bacia do rio Madeira) e Guajará-Mirim (sub-bacia do Mamoré/Guaporé).

A área de vida limitada das fêmeas de surubins, com os sítios de desova espaçados ao longo das calhas principais dos rios, tributários e lagos, indicam uma diminuição da competição intraespecífica e que os recursos alimentares estavam disponíveis em uma pequena área (Godinho *et al.*, 2007). No entanto, a diminuição da competição intraespecífica pelos recursos alimentares, pode ser mais relacionada à região de savanas da sub-bacia do Mamoré/Guaporé. De acordo com Lowe-McConnell (1964), os peixes de rios de savana apresentam uma baixa atividade alimentar, e no período de seca a atividade alimentar praticamente cessa. Isso indica que regiões de savana têm uma menor capacidade de suporte e abrigam uma menor densidade populacional de *P. punctifer*.

Por outro lado, a sub-bacia do rio Madeira com o constante aporte de materiais provenientes da floresta não pode provocar situações tão extremas (Lowe-McConnell, 1964), visto que, os recursos são mais abundantes e podem ser compartilhados sem que ocorram interações competitivas. *P. punctifer* é um macro predador generalista, pois não apresenta seletividade sobre as presas incluindo diversas famílias de peixes e outros grupos alimentares como: crustáceos, ofídios, gastrópodes e insetos (Luca, 2010), o que indica que a segregação ao longo dos recursos alimentares é mais importante que a segregação espacial e temporal (Roos, 1986).

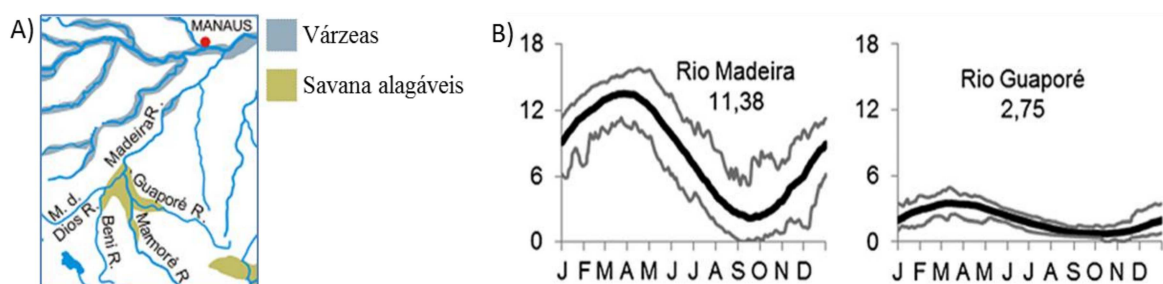
Essas diferentes condições ambientais e o regime hídrico das sub-bacias do rio Madeira e do Mamoré/Guaporé podem também estar contribuindo para a estruturação genética das populações de *P. punctifer* entre as sub-bacias, que provavelmente estão adaptadas as diferentes condições ambientais, dessas sub-bacias.

De acordo com o sistema de classificação de áreas úmidas da América do Sul baseadas em parâmetros hidrológicos e botânicos, a região da sub-bacia do Mamoré/Guaporé é classificada como savanas periodicamente inundáveis, com pulso de



inundação de baixa amplitude (Junk *et al.*, 2013). Já a região da sub-bacia do rio Madeira à jusante das corredeiras, é classificada como várzea (com florestas inundáveis), com pulso de inundação de alta amplitude (Junk *et al.*, 2013) (Figura 8).

A precipitação pluviométrica é um fator marcante na variação do regime hídrico, afeta diretamente a reprodução de *P. punctifer*, visto que a desova coincide com os meses em que a precipitação pluviométrica foi maior (Luca, 2010). Os ciclos anuais de precipitação e a heterogeneidade dos habitats têm sido identificados como fatores fundamentais na diferenciação genética das populações aquáticas na bacia Amazônica (Hubert *et al.*, 2007; Junk *et al.*, 2013).



**Figura 8.** A) Distribuição das zonas úmidas, na sub-bacia do Mamoré/Guaporé e na bacia Amazônica (rio Madeira) (modificado de Junk, 2007). B) Curvas de inundação dos rios Madeira e Guaporé; as curvas representam a variação do nível de água (em metros), durante o ciclo anual entre 1970 e 2010; a curva em negrito representa a média diária do nível da água e as curvas acima e abaixo, os valores máximos e mínimos diários para este período (para efeitos comparativos, o valor mínimo absoluto de todas as curvas foi definido como zero); os números abaixo dos nomes dos rios indicam os valores médios da amplitude do pulso de inundação (em metros).

### ***Cachoeiras e corredeiras do rio Madeira - barreiras ao fluxo gênico?***

As cachoeiras e corredeiras do rio Madeira têm sido consideradas barreiras biogeográficas para explicar as diferenças genéticas encontradas entre as populações do peixe agulha (*Potamorrhaphis eigenmanni*) (Lovejoy e Collette, 2001), do boto rosa (*Inia geoffrensis*) (Banguera-Hinestroza *et al.*, 2002) e da tartaruga da Amazônia

(*Podocnemis expansa*) (Pearse *et al.*, 2006), entre a bacia Amazônica e a sub-bacia do Mamoré/Guaporé.

Foi proposto por Goulding (1979) que as cachoeiras e corredeiras do rio Madeira não representam uma barreira para as espécies de *Pseudoplatystoma*, no entanto, não foi feita uma identificação precisa de quais espécies foram mais abundantes no período do estudo e não tiveram como estimar se os peixes estavam migrando rio acima ou rio abaixo.

Foi observado para *P. tigrinum*, com dados de COI, uma alta taxa de migração e a ausência de estruturação genética entre as bacias Amazônica (12 localidades), sub-bacia do Orinoco (duas localidades) e sub-bacia do Mamoré/Guaporé (uma localidade) (Machado *et al.*, 2013), o que indica que esta espécie apresenta um comportamento diferente de *P. punctifer* e que realiza migrações mais intensas entre as corredeiras e cachoeiras do rio Madeira e ao longo de toda a bacia Amazônica, o que pode justificar o proposto por Goulding (1979).

Além dos fatores ecológicos e ambientais já apresentados, que podem estar influenciando a diferenciação genética observada para *P. punctifer*, as cachoeiras e corredeiras do rio Madeira, também apresentam um nível de barreira biogeográfica para a migração desta espécie, porém, não interrompem totalmente o fluxo gênico.

As cachoeiras da foz do rio Beni e lagos, ao longo do rio Ichilo, também podem estar influenciando a diferenciação genética de linhagem materna observada para *P. punctifer*, embora não tenham sido considerados por Coronel *et al.* (2004).

### ***Variabilidade genética e demografia de Pseudoplatystoma punctifer***

Quando comparados os índices de diversidade genética, obtidos neste trabalho para *Pseudoplatystoma punctifer*, com os resultados obtidos em estudo prévio (Ortiz,

2010) algumas estimativas são menores (presente trabalho:  $nH=11$ , Ortiz:  $nH=23$ ; presente trabalho:  $S=11$ , Ortiz:  $S=19$ ). Apenas os índices de diversidade haplotípica e nucleotídica foram ligeiramente maiores (presente trabalho:  $Hd=0,600$ , Ortiz:  $Hd=0,5691$ ; presente trabalho:  $\pi = 0,001570$ , Ortiz:  $\pi = 0,00119$ ). O maior número de haplótipos e de sítios variáveis observados por Ortiz (2010) justifica-se pelo maior número de localidades amostradas (21 localidades da bacia Amazônica), pelo total de sequências do COI analisadas (143) e o total de nucleotídeos (652). Enquanto neste trabalho foram amostradas seis localidades, um total de 96 sequências e 536 pb incluindo os dados de Ortiz (2010) usando amostras de três localidades (5 amostras de Porto Velho, 3 amostras de Manicoré e 6 amostras de Guajará-Mirim).

Os valores de diversidade haplotípica e em especial a diversidade nucleotídica do gene COI para *P. punctifer* no presente trabalho foram menores (Tabela 2), quando comparados com os valores obtidos para outras espécies do mesmo gênero, para o fragmento mitocondrial região controle. Por exemplo, para *P. corruscans* ( $n = 22$ ) ( $Hd = 0,814$ ;  $\pi = 0,007$ ) e para *P. reticulatum* ( $n = 7$ ) ( $h = 0,952$ ;  $\pi = 0,007$ ) (Bignotto *et al.*, 2009), que ocorrem na bacia do Paraná-Paraguai. Esta diferença é consistente com o esperado, aumento de três a cinco vezes na taxa de substituição da região controle (não codificante), em comparação com locos do genoma mitocondrial que codificam proteínas (Meyer, 1993; Avise, 2000; Sivasundar *et al.*, 2001).

Locos mitocondriais que codificam proteínas no gênero *Pseudoplatystoma* apresentaram uma baixa taxa de evolução molecular (0,25 % por milhão de ano, no gene Citocromo b, Torrico *et al.*, 2009) em comparação com outras espécies de peixe (0,54 % por milhão de ano, para os genes ATPase 6 e 8, Sivasundar *et al.*, 2001; 0,52 % por milhão de ano para os genes ND2 e COI, Turner *et al.*, 2004). As diferenças nas

taxas de mutação aparentemente exerceram influência nos níveis de variabilidade genética do gene COI para *P. punctifer*.

Baixos índices de variabilidade genética também foram observados para o gene COI, em quatro espécies de Characiformes (*Semaprochilodus kneri*, *Prochilodus mariae*, *P. rubrotaeniatus*, *P. magadalense*) coletadas em 13 localidades, ao longo das bacias do Orinoco, do Magdalena e na bacia amazônica (nas drenagens do Essequibo e da Venezuela). Um total de 301 pb do gene COI foram sequenciados para 123 espécimes, nos quais foi observado variação genética apenas para uma espécie (*P. rubrotaeniatus*) de uma localidade, com a diversidade haplotípica de 0,264 (Turner *et al.*, 2004).

Os testes de neutralidade,  $D$  de Tajima e  $F_s$  de Fu, não foram significativos para localidades separadas e por sub-bacia hidrográfica ( $P > 0,05$ ), indicando que o polimorfismo genético está de acordo com o modelo neutro de mutações. No entanto, o teste  $F_s$  de Fu foi significativo para a estimativa no banco de dados total, indicando uma expansão populacional recente. Este resultado também corrobora a estruturação observada entre as duas sub-bacias. Os resultados confirmam o observado por Ortiz (2010) para os testes de  $F_s$  de Fu e  $D$  de Tajima ( $F_u = 2,25969$ ;  $D = 19,55$ ).

De acordo com Grant e Bowen (1998), uma combinação de valores de diversidade haplotípica maiores que 0,5 com valores de diversidade nucleotídica menores que 0,01 (observado neste trabalho) indicam uma recente redução populacional seguida por uma rápida expansão demográfica. Esta é evidenciada também pela genealogia observada na rede de haplótipos (Figura 5), com dois haplótipos (H1 e H2) amplamente distribuídos.

A expansão populacional contemporânea vem sendo observada na maioria dos estudos envolvendo as espécies de peixes amazônicos, incluindo espécies de

pimelodídeos: *Brachyplatystoma rousseauxii* (Batista, 2010), *B. vaillantii* (Formiga-Aquino, 2004; Rodrigues, 2009), *B. filamentosum* (Huergo, 2009) e *B. platynemum* (Orrego, 2012). Em alguns casos a expansão populacional é observada de forma dinâmica, com eventos de contração e re-expansão como foi observado para *Colossoma macropomum* no rio Guaporé e outros rios da drenagem Boliviana (Farias *et al.*, 2010).

Existem evidências que estes eventos de expansão demográfica começaram por volta de 350 mil anos atrás e que uma segunda fase teve início há 125 mil anos. Este tempo corresponde, aproximadamente, às grandes mudanças climáticas e alterações do nível do mar ocorridas no Pleistoceno; no entanto, a generalidade deste padrão em vertebrados aquáticos ainda precisa ser avaliada (Farias *et al.*, 2010), uma vez que a influência das flutuações climáticas do Pleistoceno, na demografia e na variabilidade genética entre populações de peixe foi pouco explorada (Hubert *et al.*, 2007).

Os 10 locos microssatélites utilizados para caracterizar a diversidade genética do *P. punctifer* mostraram-se altamente polimórficos. As heterozigosidades esperadas ( $H_E = 0,064$  a  $0,926$ ), entre as localidades, foram semelhantes às heterozigosidades esperadas para outras espécies do gênero *Pseudoplatystoma* (*P. reticulatum*:  $H_E = 0,055$  a  $0,861$ , Abreu *et al.*, 2009; *P. corruscans*:  $H_E = 0,310$  a  $0,942$ , Pereira *et al.*, 2009) e para outras espécies de peixes de água doce (valor médio observado para 13 espécies:  $H_E = 0,46$ , DeWoody e Avise, 2000).

Os índices de riqueza alélica foram relativamente superiores para *P. punctifer* nas sub-bacias do rio Madeira (8,8) e do Mamoré/Guaporé (8,3), quando comparados com os índices observados para *P. corruscans* nas bacias do São Francisco (5,6) e do Paraná-Paraguai (7,6) (Carvalho *et al.*, 2012).

Entre os 104 alelos encontrados para *P. punctifer* 27 foram exclusivos (Tabela 6). Para 51 espécimes de *P. reticulatum*, coletados em dois pontos na bacia do Paraná-

Paraguai, foram observados 26 alelos exclusivos de um total de 51 alelos. Para 223 espécimes de *P. corruscans*, coletados em seis tributários da bacia do Paraná-Paraguai, foram observados 30 alelos exclusivos de um total de 107 alelos. Com base nesses resultados, observa-se que o número total de alelos aumenta em função do tamanho da amostra, com isso, aumenta também a chance de se detectar alelos exclusivos. É o caso das espécies de *Pseudoplatystoma* estudadas até presente.

### ***Conservação e Manejo do Pseudoplatystoma punctifer***

A conservação pode ser vista como uma tentativa de proteger a diversidade genética produzida pela evolução ao longo dos 3,5 bilhões de anos passados, quando surgiu a vida em nosso Planeta (Eisner *et al.*, 1995). A diversidade genética é uma das três formas de biodiversidade reconhecidas pela IUCN (*International Union for Conservation of Nature*) como merecendo a conservação, juntamente com a diversidade de espécies e de ecossistemas (McNeely *et al.*, 1990).

As populações de uma mesma espécie podem ser substancialmente diferentes, em termos de diversidade genética, a ponto de ser justificável o seu manejo de forma independente. Neste sentido, é necessário conhecer a distribuição da variação genética dentro e entre populações naturais (Spruell *et al.*, 2003). Sem essa informação, não é possível avaliar a eficácia ou a pertinência das medidas de conservação.

As análises de genética de populações são importantes para a biologia da conservação, identificam unidades de manejo, o que reflete a importância evolutiva das linhagens dentro das espécies. Com esta informação pode-se propor medidas de conservação no nível intraespecífico e elaborar programas efetivos para a conservação de espécies em risco (Avice e Hamrick, 1996).

A construção de hidrelétricas, o desmatamento, a poluição das águas e a exploração pesqueira, são reconhecidas como os principais fatores responsáveis pela

degradação dos ecossistemas e extinção das espécies na Amazônia (Frankham *et al.*, 2004; Castello *et al.*, 2013), esse fatores podem estar ameaçando as espécies de *Pseudoplatystoma* (Carolsfeld *et al.*, 2003).

Das 18 espécies mais exploradas pela pesca na Amazônia, uma está sendo considerada em perigo (pirarucu, *Arapaima gigas*) (Castello *et al.*, 2013) e cinco (tambaqui, *Colossoma macropomum*; dourada, *Brachyplatystoma rousseauxii*; piraíba, *Brachyplatystoma filamentosum*; surubim, *Pseudoplatystoma punctifer*; caparari, *Pseudoplatystoma tigrinum*) foram consideradas em estado de sobre exploração pelo menos em uma região da bacia Amazônica (Veríssimo 1895; Barthem e Goulding, 2007; Castello *et al.*, 2013).

Dados da pesca nos rios Guaporé e Mamoré indicaram que o surubim e o caparari foram às espécies mais exploradas em 1977 e tornaram-se menos abundantes nos anos seguintes (Goulding, 1979). As análises genéticas de PCR-RFLP de três marcadores mitocondriais evidenciaram que as populações de surubins (*P. punctifer*) dos rios Beni e Ichilo passaram por um declínio populacional recente (Coronel *et al.*, (2004).

Apesar de ter sido evidenciado uma diferenciação genética intermediária para *P. punctifer* entre as localidades da sub-bacia do rio Madeira, os espécimes dessas localidades estão mais relacionados, por fazerem parte do mesmo ambiente ecológico. Nesse sentido, nossos resultados indicaram a ocorrência de dois estoques pesqueiros para *P. punctifer*, um na sub-bacia do rio Madeira e a outra na sub-bacia do Mamoré/Guaporé (bacia Amazônica). Estes estoques merecem gestão separada ou prioridade para conservação, por apresentarem linhagens maternas distintas e ocuparem ambientes ecológicos característicos de cada drenagem.

As barragens das hidrelétricas de Jirau e de Santo Antônio no rio Madeira (onde estavam localizadas as cachoeiras), tendem a reforçar ainda mais o nível de diferenciação genética das populações de *P. punctifer*. Podem interromper totalmente o fluxo gênico entre as duas sub-bacias. Note-se que até o momento ainda não foi avaliado a eficiência do sistema de transposição instalado nas áreas das hidroelétricas.

Fortes impactos são causados na biota terrestre e aquática, com a construção de hidrelétricas, em consequência das alterações no pulso de inundação, da perda de habitats, da mudança dos parâmetros físicos e químicos da água (Vannote *et al.*, 1980; Junk *et al.*, 1989) e o bloqueio das rotas de migração de diversas espécies de peixes (Barthem e Goulding, 1997; MacAllister *et al.*, 2001).

Pelo fato do rio Madeira ainda ser um rio “relativamente novo” e não ter a sua calha definida, com a abertura das comportas, a turbulência das águas está acelerando a erosão das margens à jusante e a sedimentação do leito à montante dos reservatórios (Carpio, 2008).

Um levantamento feito pelo Data Cidades com base nos boletins oficiais de monitoramento do Ministério do Meio Ambiente da Bolívia indica que, só em agosto de 2013, foram detectados 1.687 focos de incêndio, nos municípios de Beni e Pando (Amazônia Boliviana). O fogo tem origem na prática de corte e queima da mata derrubada, principalmente para a expansão de zonas agrícolas. O mesmo acontece nos estados brasileiros vizinhos a Rondônia e Mato Grosso (Santini, 2013; Fonseca, 2013).

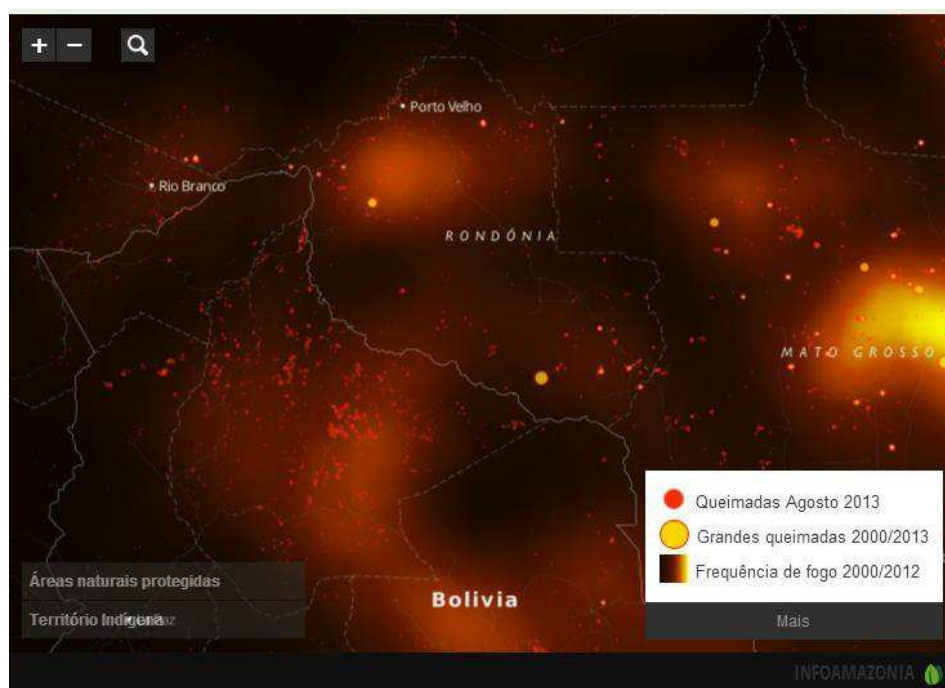
Na região afetada pelas queimadas estão áreas úmidas importantes para o ciclo hidrológico não só dos rios da Bolívia, mas também dos que atravessam a Amazônia Brasileira (Santini, 2013).

Apesar de já existir o Programa Amazônia sem Fogo firmado desde 2012, entre os governos da Itália, do Brasil e da Bolívia, maiores esforços precisam ser



estabelecidos para que os desmatamentos e queimadas sejam diminuídos na região da Bolívia, visto que ainda estão em uma crescente.

Nos dados disponibilizados no site da NASA (*National Aeronautics and Space Administration*) é possível visualizar a incidência de fogo não só na Bolívia, mas também no Centro-Oeste do Brasil (Figura 9), um crescente de chamas que contorna os limites da fronteira agrícola (Santini, 2013).



**Figura 9.** Frequência das grandes queimadas e focos de incêndios recentes na América do Sul.  
Fonte: NASA FIRMS.

O desmatamento e as queimadas locais podem ter efeitos profundos em escalas regionais. Por exemplo, o desmatamento de cerca de 50 % nas regiões das bacias do Tocantins e Araguaia aumentou em 25 % a descarga anual das águas e alterou o pulso de inundação nos rios (Costa, 2004; Coe *et al.*, 2009).

O desmatamento reduz a abundância e diversidade das comunidades de plantas altamente produtivas, que sustentam populações de animais abundantes (por exemplo, populações de peixes) (Melack e Forsberg, 2001) e altera as condições morfológicas e

biogeoquímicas dos ecossistemas de água doce, através da erosão do solo e aumento da exportação de sedimentos terrestres no curso de Água (Neill *et al.*, 2001).

Considerando os fatores antropogênicos expostos, a conservação de *P. punctifer*, assim como, de toda a biota aquática e terrestre na área de estudo (região das hidroelétricas e sub-bacia do Mamoré/Guaporé) é uma questão complexa.

Apesar da complexidade para conservação de *P. punctifer* nas sub-bacias estudadas, sugerem-se algumas medidas que podem auxiliar a conservação e manejo, tais como: (1) Monitoramento de estatística pesqueira na sub-bacia do rio Madeira e na sub-bacia do Mamoré/Guaporé e nos rios das drenagens Boliviana, diferenciado para espécies de *P. punctifer* e *P. tigrinum*, que são consideradas pela estatística pesqueira apenas como surubim, *Pseudoplatystoma spp.*; (2) as possíveis medidas de manejo para *P. punctifer* entre as sub-bacias devem ser feitas de forma diferenciada, por se tratarem de estoques pesqueiros distintos; (3) avaliação e monitoramento dos sistemas de transposição das hidroelétricas de Jirau e Santo Antônio, a fim de possibilitar que o fluxo gênico observado no presente trabalho, continue sendo estabelecido. Destaca-se a necessidade de preservação dos diferentes habitats na Amazônia para garantir a diversidade genética das diferentes espécies.

Considerando importância econômica e ecológica de *Pseudoplatystoma punctifer* na Amazônia, os resultados do presente trabalho são de grande importância para o manejo e conservação desta espécie e possibilitam que os mesmos sejam feitos, de forma adequada.

#### 4. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos para *Pseudoplatystoma punctifer*, com os microssatélites e sequências do gene COI do DNA mitocondrial, permitiram chegar às seguintes conclusões:

1) Dois estoques pesqueiros foram evidenciados: um correspondendo à sub-bacia do Mamoré/Guaporé, representado pelo rio Cautário e pelo rio Mamoré na localidade de Guajará-Mirim; outro na sub-bacia do rio Madeira representada pelas localidades de Porto Velho, Humaitá, Manicoré e Borba.

2) Para fins de conservação as unidades de manejo do surubim (*P. punctifer*) da sub-bacia do rio Madeira e da sub-bacia do Mamoré/Guaporé, devem ser geridas de forma independentes, tendo em vista o grau de diferenças genéticas entre os estoques, e pelas diferentes condições ambientais e de regime hídrico a que estão adaptadas.

3) Os marcadores moleculares microssatélites e COI foram congruentes em detectar diferenciação genética de *P. punctifer* entre a sub-bacia do rio Madeira e da sub-bacia do Mamoré/Guaporé, no entanto, as estimativas com o COI foram superiores.

4) As corredeiras e cachoeiras do rio Madeira funcionam como barreiras biogeográficas que restringem a migração desta espécie, porém, não interrompem totalmente o fluxo gênico.

5) O alto nível de estruturação genética e o limitado fluxo gênico obtidos com o gene COI, devem estar mais relacionados com os fatores ecológicos desta espécie, como: a

limitada área de vida e ao sedentarismo das fêmeas; as diferenças nas condições ambientais às quais a espécie está adaptada; e em uma escala geográfica, com as cachoeiras do rio Madeira.

6) Propomos um modelo de migração dos machos de *P. punctifer* entre as sub-bacias com base no nível de compartilhamento de alelos e nos maiores níveis de fluxo gênico observados na análise de microssatélites.

## 5. REFERÊNCIAS

- Abreu, M. M.; Pereira, L. H. G.; Vila, V. B.; Foresti, F.; Oliveira, C. Genetic variability of two populations of *Pseudoplatystoma reticulatum* from the Upper Paraguay River Basin. *Genetics and Molecular Biology*. 2009. n. 32, p. 868-873.
- Allendorf, F.W.; Luikart, G. 2007. *Genetics and the Conservation of Populations*, Blackwell Publishing
- Amado, M. V.; Farias, I. P.; Hrbek, T. 2011. A Molecular Perspective on Systematics, Taxonomy and Classification Amazonian Discus Fishes of the Genus *Symphysodon*. *International Journal of Evolutionary Biology*, Article ID 360654, 16 pages.
- Ardura, A., Pola, I. G., Ginuinoi., Gomes, V., Garcia-Vazquez, E. Application of barcoding to Amazonian commercial fish labeling. *Food Research International*. 2010a. n. 43, p.1549-1552.
- Ardura, A., Linde, A. R., Moreira, J. C., Garcia-Vazquez, E. DNA barcoding for conservation and management of Amazonian commercial fish. *Biological Conservation*. 2010b. v. 143, n.1438-1443
- Arslan, M., Dabrowski, K., Portella M. C. Growth, fat content and fatty acid profile of South American catfish, surubim (*Pseudoplatystoma fasciatum*) juveniles fed live, commercial and formulated diets. *J. Appl. Ichthyol.*, 2009. n. 25, p. 73-78.
- Avise, J.C.; Hamrick, J.L. *Conservation genetics. Case histories from nature*. Chapman & Hall, New York, 1996. p. 512.
- Avise, J. C. *Molecular Markers. Natural History, and Evolution*. Chapman and Hall, New York, NY. 1994.
- Avise, J. C. *Phylogeography: The history and formation of species*. Harvard University Press, Londres. 2000.
- Balloux, F.; Lugon-Moulin, N. The estimation of population differentiation with microsatellite markers. *Molecular Ecology*. 2002. n.11, p.155-165.
- Banguera-Hinestroza, E.; Cárdenas, H.; Ruiz-García, M.; Marmontel, M.; Gaitán, E., Vázquez, R.; García-Vallejo, F.; Molecular identification of evolutionarily significant units in the Amazon River dolphin *Inia sp.* (Cetacea: Iniidae). *Journal of Heredity*. 2002. n. 93, p. 312–322.
- Barthem, R. B.; Goulding, M. *An unexpected ecosystem: the Amazon revealed by the fisheries*. Gráfica Biblos, Lima. Botanical Garden Press. Missouri. 2007. p. 241.
- Barthem, R.; Goulding, M. *The Catfish Connection: Ecology Immigration and Conservation of Amazonas Predators*, first ed. Columbia University Press, New York. 1997.
- Batista, J. S.; Farias, I. P.; Formiga-Aquino, K.; Sousa, A. C. B; Alves-Gomes, J. A. DNA microsatellite markers for dourada (*Brachyplatystoma rousseauxii*,

Siluriformes: Pimelodidae), a migratory catfish of utmost importance for fisheries in the Amazon: development, characterization and inter-specific amplification. *Conservation Genet Resour.* 2010. n. 2, p. 5–10.

- Batista, J. S. Caracterização genética da dourada - *Brachyplatystoma rousseauxii*, Castelnau, 1855 (Siluriformes-Pimelodidae) na Amazônia por meio de marcadores moleculares mitocondriais e microssatélites: subsídios para conservação e manejo/ Jacqueline da Silva Batista. Manaus. 2010. Tese de Doutorado. INPA. Manaus.
- Batista, J. S. Alves-Gomez, J.A. Phylogeography of *Brachyplatystoma rousseauxii* (Siluriformes - Pimelodidae) in the Amazon Basin offers preliminary evidence for the first case of “homing” for an Amazonian migratory catfish. *Genetic and Molecular Research.* 2006. n.5, v.4, p. 723-740.
- Banks, M. A.; Blouin, M. S.; Baldwin, B. A.; Rashbrook, V. K.; Fitzgerald, H. A.; Blankenship, S. M. Hedgecock, D. Isolation and inheritance of novel microsatellites in chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). *Journal of Heredity.* 1999. n. 90, p. 281-288.
- Beaumont, A.; Hoare, K. *Biotechnology and Genetics in Fisheries and Aquaculture.* 2003. Wiley-Blackwell; 1 edition.
- Bignotto, T. S.; Prioli, A. J.; Prioli, S. M.; Maniglia, T. C.; Boni, T. A.; Lucio, L. C.; Gomes, V. N.; Prioli, R. A.; Oliveira, A.; Juliojunior, H. F.; Prioli, L. M. Genetic divergence between *Pseudoplatystoma corruscans* and *Pseudoplatystoma reticulatum* (Siluriformes: Pimelodidae) in the Parana River Basin. *Brazilian Journal of Biology.* 2009. n. 69, v. 2, p. 681-689.
- Briggs, J.C. The biogeography of otophysan fishes (Ostariophysi: Otophysi): a new appraisal. *Journal of Biogeography.* 2005. n. 32, p. 287-294.
- Buitrago-Suárez U.A.; Burr B.M. Taxonomy of the catfish genus *Pseudoplatystoma* Bleeker (Siluriformes: Pimelodidae) with recognition of eight species. *Zootaxa.* 2007. n. 1512, p. 1-38
- Callen, D.F.; Thompson, A.D.; Shen, Y.; Phillipis, H.A.; Richards, R.I.; Mulley, J.C.; Sutherland. G.R. Incidence and origin of null’ alleles in the (AC)<sub>n</sub> microsatellite markers. *Am J Hum Genet.*, 1993. n. 52, p. 922-927.
- Carolsfeld, J., Harvey, B., Ross, C., Baer, A. *Migratory Fishes of South America: Biology, Fisheries and Conservation Status.* 2003. World Fisheries Trust/World Bank/ IDRC, Victoria.
- Carvalho, D. C.; Oliveira, D. A. A.; Beheregaray, L. B.; Torres, R. A. Hidden genetic diversity and distinct evolutionarily significant units in an commercially important Neotropical apex predator, the catfish *Pseudoplatystoma corruscans*. *Conservation Genetics.* 2012. n. 6, v. 13, p. 1671-1675.
- Carolsfeld, J.; Harvey, B.; Ross, C.; Baer, A. *Migratory Fishes of South America: Biology, Fisheries and Conservation Status.* World Fisheries Trust/World Bank/ IDRC, Victoria. 2003.

- Carpio, J. M. *Hidrologia e Sedimentos*. In: SWITKES, Glenn (org.). Águas turvas: alertas sobre as consequências de barrar o maior afluente do Amazonas. São Paulo, Internacional Rivers. 2008.
- Castello, L.; McGrath, D. G.; Hess, L. L.; Coe, M. T.; Lefebvre, P. A.; Petry, P.; Macedo, M. N.; Reno, V. F.; Arantes, C. C. The vulnerability of Amazon freshwater ecosystems. *Conservation Letters*. 2013. 1–13
- Castelnau, F. L. Poissons. (1855). In: Animaux Nouveaux or Rares Recueillis Pendant l'Expédition dans les Parties Centrales de l'Amérique du Sud de Rio de Janeiro a Lima, et de Lima au Para; Exécutée par ordre du Gouvernement Français Pendant les Années 1843 a 1847. Part 7, Zoology 2, i–xii + 1–112, 50 pls.
- Carvalho-Costa, L.F., Piorski, N.M., Willis, S.C., Galetti JR. P.M., Ortí, G. Molecular systematics of the neotropical shovelnose catfish genus *Pseudoplatystoma* Bleeker 1862 based on nuclear and mtDNA markers. *Mol. Phylogenetics and Evolution*. 2011. v. 59, n.1, p. 177-194.
- Corander, J.; Tang, J. Bayesian analysis of population structure based on linked molecular information. *Math Biosci.*, 2007. n. 205, p. 19-31.
- Coe, M. T.; Costa, M. H.; Soares-Filho, B. S. The influence of historical and potential future deforestation on the stream flow of the Amazon river-land surface processes and atmospheric feedbacks. *J. Hydrol.*, 2009. n. 369 165-174.
- Corander, J.; Marttinen, P.; Sirén, J.; Tang, J. Enhanced Bayesian modelling in BAPS software for learning genetic structures of populations. *BMC Bioinformatics*. 2008. n. 9:p.539.
- Cooke, G. M.; Chao, N. L.; Beheregaray, L. B. Divergent natural selection with gene flow along major environmental gradients in Amazonia: insights from genome scans, population genetics and Phylogeography of the characin fish *Tripottheus albus*. *Molecular Ecology*. 2012. n. 21, p. 2410-2427.
- Coronel, J. S.; Maes, G. E.; Claus, S.; Van Damme, P. A.; Volckaert, F. A. M. Differential population history in the migratory catfishes *Brachyplatystoma flavicans* and *Pseudoplatystoma fasciatum* (Pimelodidae) from the Bolivian Amazon assessed with nuclear and mitochondrial DNA markers. *Journal of Fish Biology*. 2004. n. 65, p. 859-868.
- Crandall, K. A.; Bininda-Emonds, O. R. P.; Mace, G.; Wayne, R. K. Considering evolutionary processes in conservation biology. *Trends in Ecology & Evolution*. 2000. n. 15, p. 290-295.
- Costa, M. H. Large-scale hydrological impacts of tropical forest conversion. in M. Bonell, L.A. Bruijnzeel, editors. *Forests, water and people in the humid tropics*. Cambridge University Press, Cambridge. 2004. p. 590-597.
- DeWoody, J. A.; Avise, J. C. Microsatellite variation in marine, freshwater and anadromous fishes compared with other animals. *Journal of Fish Biology*. 2000. n. 56, p. 461-473.

- DeWoody, J. A.; Schupp, J.; Kenefic, L.; Busc, J.; Murfitt, L.; Keim, P. Universal method for producing ROX-labeled size standards suitable for automated genotyping. *BioTechniques*. 2004. n. 37, p. 348-352.
- Drummond, A.J.; Rambaut, A. BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC Evolutionary Biology*. 2007. n. 7, 214.
- Dudley, S. F. J.; Simpfendorfer, C. A. Population status of 14 shark species caught in the protective gillnets off KwaZulu-Natal beaches, South Africa, 1978–2003. *Marine and Freshwater Research*. 2006. n. 57, p. 225–240.
- Earl, D.A.. Structure Harvester v 0.3, 2009. From website: [http://users.soe.ucsc.edu/~dearl/software/struct\\_harvest/](http://users.soe.ucsc.edu/~dearl/software/struct_harvest/).
- Eigenmann, C.H. & Eigenmann, R.S. Preliminary notes on South American Nematognathi II. Proceedings of the California Academy of Sciences. 1889 n 2, p. 28–56.
- Eisner, T.; Lubchenco, J.; Wilson, E. O.; Wilcove, D. S.; Bean, M. J. Building a Scientifically Sound Policy for Protecting Endangered Species. *Science*. 1995. n. 269, p.1231-1232.
- Excoffier, L.; Laval, G.; Schneider, S. ARLEQUIN ver 3.1: *An integrated software package for population genetics data analysis*. Computational and Molecular Population Genetics Laboratory. University of Berne, Switzerland. 2005.
- Excoffier, L.; Smouse, P. E.; Quattro, J. M. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics*. 1992. n. 131, p. 479-491.
- Falush, D.; Stephens, M.; Pritchard, J. K. Inference of Population Structure Using Multilocus Genotype Data: Linked Loci and Correlated Allele Frequencies. *Genetics*. 2003. n. 164, p. 1567-1587.
- Farias, I. P.; Hrbek, T. Patterns of diversification in the discus fishes (Symphysodonspp. Cichlidae) of the Amazon basin. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 2008. vol. 49, no. 1, p. 32–43.
- Farias, I. P.; Torrico, J. P.; García-Dávila, C.; Santos, M. C. F.; Hrbek, T.; Renno, J.F. Are rapids a barrier for floodplain fishes of the Amazon basin? A demographic study of the keystone floodplain species *Colossoma macropomum* (Teleostei: Characiformes). *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 2010. n. 56, p. 1129-1135.
- Ferraris, C.J. Checklist of catfishes, recent and fossil (Osteichthyes, Siluriformes), and catalogue of siluriform primary types. *Zootaxa*. 2007. n. 1418, p. 1-628.
- Formiga-Aquino, K. Variabilidade genética da piramutaba - *Brachyplatystoma vaillantii* (Velenciennes, 1840) (Siluriformes - Pimelodidae) no sistema Estuário-Amazonas-Solimões. 2004. Mestrado, CPBA, INPA/UA, Manaus, p. 73.



- Fonseca, V. 2013. Previsão de fogo para a Amazônia. DataCidades <http://www.oeco.org.br/noticias/27267-previsao-de-fogo-para-a-amazonia>
- Frankham, R.; Ballou, J. D.; Briscoe, D. A. *A Primer of Conservation Genetics* - Cambridge University Press. 2004.
- Frankham, R. Challenges and opportunities of genetic approaches to biological conservation. *Biology Conservation*. 2010. n. 143, p. 1919-1927.
- Fraser, D.J.; Bernatchez, L. Adaptive evolutionary conservation: towards a unified concept for defining conservation units. *Molecular Ecology*. 2001. n. 10, p. 2741-2752.
- Fu, Y. X. Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics*. 1997. n. 147:915–925
- Funk, W. C.; Mckay, J. K.; Paul, A. H.; Allendorf, F. W. Harnessing genomics for delineating conservation units. *Trends in Ecology & Evolution*. 2012. n.9, p. 489-496.
- Futuyma, D. J. *Biologia Evolutiva*. 3ª edição. Editora FUNPEC-2009. p 830.
- Gaggiotti, O. E.; Lange, O.; Rassmann, K.; Gliddon, C. A comparison of two indirect methods for estimating average levels of gene flow using microsatellite data. *Molecular Ecology*. 1999. v.8, p, 1513-1520.
- Godinho, A. L.; Kynard, B.; Godinho, H. P. Migration and spawning of female surubim (*Pseudoplatystoma coruscans*, Pimelodidae) in the São Francisco river, Brazil. *Environmental Biology of Fishes*. 2007. n. 80, p. 421-433.
- Godinho, H. P.; Godinho, A. L.; Miranda, M. T. O.; Santos, J. E. Fisheries and biology of the surubim *Pseudoplatystoma coruscans* in the São Francisco River at Pirapora, MG, Brazil. In: Miranda MTO (ed) Surubim. IBAMA, Brasília, Brazil. 1997. p 27–42 (in Portuguese)
- Goudet, J. *FSTAT, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices (version 2.9.3.2)*. 2002. Available from <http://www.unil.ch/izea/software/fstat.html>.
- Goulding, M. *Ecologia de Pesca do Rio Madeira*. 1979. INPA, Manaus, Brazil.
- Goulding, M.; Barthem, R.; Ferreira, E.J. *The Smithsonian atlas of the Amazon*. Washington, DC: Smithsonian Institution. 2003. p. 255.
- Grant, W. S.; Bowen, B. W. Shallow population histories in deep evolutionary lineages of marine fishes: insights from sardines and anchovies and lessons for conservation. *Journal of Heredity*. 1998. n. 89, p. 415-426.
- Hall, T. A. BIOEDIT: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*. 1999. n. 41, p. 95-98.

- Hanski, I.A.; Gilpin, M.E. *Metapopulation Biology: Ecology, Genetics, and Evolution*, Academic Press. 1997.
- Hausdorf, B., Wilkens, H., Strecker, U. Population genetic patterns revealed by microsatellite data challenge the mitochondrial DNA based taxonomy of *Astyanax* in Mexico (Characidae, Teleostei), *Mol. Phylogenet. Evol.*, 2011. doi:10.1016/j.ympev.2011.03.009, on line.
- Hrbek, T.; Farias, I. P.; Crossa, M.; Sampaio, I.; Porto, J. I. R.; Meyer, A. Population Genetic Analysis of *Arapaima gigas*, one of the Largest Freshwater Fishes of the Amazon Basin: Implication for its Conservation. 2005. *Animal Conservation*. n. 8, p. 297-308.
- Hrbek, T., Crossa, M., Farias, I. P. Conservation Strategies for *Arapaima gigas* (Schinz, 1822) and the Amazonian várzea ecosystem. 2007. *Brazilian Journal of Biology*. n. 67, p. 909-917.
- Hey, J. Isolation with migration models for more than two populations. *Molecular Biology and Evolution*. 2010. n. 27, p. 905-920.
- Hubert, N.; Duponchelle, F.; Nuñez-Rivera, J. R.; Bonhomme, F.; Renno, J. N. Isolation by distance and Pleistocene expansion of the lowland populations of the white piranha *Serrasalmus rhombeus*. *Molecular Ecology*. 2007. n. 16, 2488-2503.
- Huergo, G.M. Estimativa da diversidade genética da piraíba (*Brachyplatystoma filamentosum* Lichtenstein, 1919) e da piraíba negra (*B. capapretum* Lundberg & Akama, 2005), na Amazônia brasileira, inferidas através de DNA mitocondrial: subsídio para manejo e conservação. Tese de Doutorado, BADPI, INPA, Manaus, 2009. 114 pp.
- Isaac, V. J.; Barthem, R. B. Os recursos pesqueiros da Amazônia brasileira. *Boletim Museu Paraense Emílio Goeldi, Série Antropologia*. 1995. n. 11, v. 2, p. 295-339.
- Ivanova, N. V.; Zemlak, T. S.; Robert, H. H.; Hebert, P. D. N. Universal primer cocktails for fish DNA barcoding. *Molecular Ecology Notes*. 2007, n. 7, p. 544-548.
- Jamielson, A. Genetic “tags” for marine fish stocks. In: Harden Jones, F.R., (Ed.), *Sea Fisheries Research*. Paul Elek Scientific Books Ltd. London. 1974. pp. 91-99.
- Junk, W. J; Bayley, P. B; Sparks, R. E. The Flood Pulse Concept in river Floodplain Systems. In: Doge, D.P.(Ed.). *Proc. Int. Large River Symp (Lars) – Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*. 1989. n. 106, p. 110-127.
- Junk, W.J. Freshwater fishes of South America: their biodiversity, fisheries, and habitats: a synthesis. *Aquatic Ecosystem Health & Management*. 2007. n. 10, p. 228-242.
- Junk, W. J. ; Piedade, M. T. F.; Lourival, R.; Wittmann, F.; Kandus, P.; Lacerda, L. D.; Bozelli, R. L.; Esteves, F. A.; Cunha, C. N.; Maltchik, L., Schöngart, J.; Schaeffer-Novelli, Y.; Agostinho, A. A. Brazilian wetlands: their definition, delineation, and classification for research, sustainable management, and

protection. *Aquatic Conservation: Marine And Freshwater Ecosystems*. 2013. Published online in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com). DOI: 10.1002/aqc.2386

- Jobb, G.; Haeseler, A.; Strimmer, K. TREEFINDER: a powerful graphical analysis environment for molecular phylogenetics. *BMC Evolutionary Biology*. 2004. n. 4, 1-9.
- Laikre, L.; Palm, S.; Ryman, N. Genetic population structure of fishes: implications for coastal zone management. *Ambio*. 2005. n. 34, v. 2, p. 111-119.
- Lamas, I. R.; Godinho, A. L. Reproduction in the piranha *Serrasalmus spilopleura*, a Neotropical fish with an unusual pattern of sexual maturity. *Environmental Biology of Fishes*. 1996. n. 45, p.161-168.
- Latrubesse, E. M.; Stevaux, J.C. Sinha, R. Tropical rivers. *Geomorphology*. 2005. n. 70, p. 187-206.
- Larkin, P.A. *The stock concept and management of Pacific salmon*. H. R. MacMillan Lectures in fisheries, Univ. British Columbia. 1972. Vancouver
- Lévêque, C.; Oberdorff, T.; Paugy, D.; Stiassny, M. L. J.; Tedesco, P. A. Global diversity of fish (Pisces) in freshwater. *Hydrobiologia*. 2008. n. 595, p. 545-567.
- Librado, P.; Rozas, J. DNASP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*. 2009. n. 25, p. 1451-1452.
- Lira, A. C. Estimativa da variabilidade genética da piraíba negra *Brachyplatystoma capapretum* (Siluriformes: Pimelodidae), por meio de marcadores mitocondriais e microssatélites. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, UFAM, Manaus, 2013.
- Lowe-McConnell, R. H. *Ecological studies in tropical fish communities*. Cambridge: Cambridge University Press, 1987. 382p
- Lowe-McConnell, R. H. The fishes of Rupununi savanna district of British Guiana, Pt1. Grouping of fish species and effects of the seasonal cycles on the fish. *Journal of the Linnean Society (Zoology)*. 1964. n. 45, p. 103.
- Lovejoy, N. R.; Collette, B. B. Phylogenetic relationships of New World needlefishes (Teleostei: Belonidae) and the biogeography of transitions between marine and freshwater habitats. *Copeia*. 2001. p. 324–338.
- Luca, A. S. Aspectos da reprodução e da alimentação de *Pseudoplatystoma punctifer* (Castelnau, 1855) (Siluriformes: Pimelodidae) na bacia do rio Teles Pires, Alta Floresta, Mato Grosso. 2010. Thesis Doctorate-Universidade Federal de São Carlos/Brazil.
- Lundberg, J.G.; Littmann, M.W. 2003. Family Pimelodidae (Long-whiskered catfishes). In: Reis, R., Kullander, S.O. e Ferraris, C.J. Jr. (Eds.). *Check List of the Freshwater Fishes of South and Central America*. Edipucrs, Porto Alegre, 432–455.

- Lundberg, J. G.; Sullivan, J. P.; Hardman, M. Phylogenetics of the South American Catfish Family Pimelodidae (Teleostei: Siluriformes) using Nuclear and Mitochondrial Gene Sequences. *Proceedings of the Academy of Natural Sciences of Philadelphia*. 2011.161(1):153-189.
- MacAllister, M. K.; Pikitch, E. K.; Babcock, E. A. Using demographic methods to construct Bayesian priors for the intrinsic rate of increase in the Schaefer model and implications for stock rebuilding. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*. 2001. n. 58, p. 1871-1890.
- MacArthur, R.H. & Wilson, E.O. *The theory of island biogeography*. Princeton, New Jersey: Princeton University Press. 1967. 203 p.
- Machado, A. S. C.; Formiga, K. M.; Lima, H. O.; Martínez, J. G.; Hrbek, T.; Batista, J. S. 2013. O DNA do caparari (*Pseudoplatystoma tigrinum*, Siluriformes: Pimelodidae) responde: Esse peixe forma uma única população nas bacias Amazônica, Boliviana e do Orinoco? In. 65<sup>a</sup> Reunião Anual da Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência – SBPC. Recife/Pernambuco.
- Machado, V.N. Análise da variabilidade genética da curimatã *Prochilodus nigricans* (Agassiz, 1829) na calha do rio Amazonas e seus principais tributários. 2009. Mestrado, UFAM, Manaus.
- Mantel, N. The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Research*. 1967. n. 27, p. 209-220.
- Marques, A. A. B. et al. Lista de Referência da Fauna Ameaçada de Extinção no Rio Grande do Sul. Decreto no 41.672, de 11 junho de 2002. Porto Alegre: FZB/MCT–PUCRS/PANGEA, 2002. 52p. (Publicações Avulsas FZB, 11)
- Market, C. L.; Moller, F. Multiple forms of enzymes: tissue, ontogenetic, and species specific patterns. *Proceedings of Natural Academic science*. 1959. v.45, p.753-763.
- McNeely, J. A.; Miller, K. R.; Reid, W. V.; Mittermeier, R. A.; Werner, T. B. Conserving the world's biological diversity. IUCN, World Resources Institute, Conservation International, WWF-US, and the World Bank, Washington, DC. 1990.
- Melack, J. M.; Forsberg, B. R. *Biogeochemistry of Amazon floodplain lakes and associated wetlands*. Pages 235-274 in M.E. McClain, R.L. Victoria, J.E. Richey, editors. The biogeochemistry of the Amazon basin. Oxford University Press, New York. 2001.
- Mérona, B.; Rankin-de-Mérona, J. Food resource partitioning in a fish community of the central Amazon floodplain. *Neotropical Ichthyology*. 2004. n. 2:75-84.
- Messing, J. New M13 vectors for cloning. *Methods in Enzymology*. 1983. n. 101, p. 20-78.
- Meyer, A. Evolution of mitochondrial DNA in fishes. *Biochemistry and molecular biology of fishes*. 1993. n. 2, p. 1-38.

- Msiska OV, Costa-Pierce BA Maturity and gonad changes of *Oreochromis (Nyasalapia) karongae* raised in fish ponds in Malawi. *Journal of Applied Ichthyology*. 1999. n. 15, p. 97-103.
- Moritz, C. Defining 'Evolutionarily Significant Units' for conservation. *Trends in Ecology & Evolution*. 1994. n. 9, v. 10, p.373-375.
- Neill, C.; Deegan, L.; Thomas, S.; Cerri, C. Deforestation for pasture alters nitrogen and phosphorus in small Amazonian streams. *Ecological Applications*. 2001. n. 11, p. 182.
- Nei, M. *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia University Press, New York, NY, USA. 1987. p. 512.
- Nunez, J., Dugue, R., Corcuyarana, N., Duponchelle, F., Renno, J. F., Raynaud, T., Hubert, N., Legendre, M. Induced breeding and larval rearing of Surubi, *Pseudoplatystoma fasciatum* (Linnaeus, 1766), from the Bolivian Amazon. *Aquaculture Research*. 2008. n. 39, p. 764-776.
- O'Connell, M.; Wright, J. M. Microsatellite DNA in fishes. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*. 1997. n. 7, p. 331-363.
- Olden, J. D.; Kennard, M. J.; Leprieur, F.; Tedesco, P. A.; Winemiller, K.O.; Garcia-Berthou, E. Conservation biogeography of freshwater fishes: recent progress and future challenges. *Diversity and Distributions*. 2010. n. 16, p. 496-513.
- Orrego, L. E. O. Análise filogeográfica de *Brachyplatystoma platynemum* (Siluriformes: Pimelodidae). Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas ênfase em Zoologia) 2012. Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista. Botucatu, SP.
- Ortiz, Mauro de Freitas. *Validação Do Dna Barcoding Como Identificador De Espécies: Um Estudo De Ampla Amostragem Com O Gênero Pseudoplatystoma (Siluriformes; Pimelodidae) Na Amazônia*. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas com ênfase em Genética, Conservação e Biologia Evolutiva) 2010. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia/Universidade Federal do Amazonas. Manaus, AM.
- Paithankar, K. R. Prasad, K. S. N. Precipitation of DNA by polyethylene glycol and ethanol. *Nucleic Acids Research*. 1991. v. 19, n. 6, p. 1346.
- Paiva, M. P. (1982). *Grandes represas do Brasil*. Brasília: Editerra Editorial.
- Palsbøll, P. J.; Bérubé, M.; Allendorf, F. W. Identification of management units using population genetic data. *Trends in Ecology and Evolution*. 2007. V. 22, N.1.
- Passos, K. B. Genética populacional do jaraqui de escama grossa (*Semaprochilodus insignis* - Prochilodontidae, Characiformes). 2009. Diversidade Biológica Universidade Federal do Amazonas, UFAM, Brasil.

- Pardini, A. T.; Jones, C. S.; Noble, L. R.; Kreiser, B.; Malcolm, H.; Bruce, B. D.; Stevens, J. D.; Cliff, G.; Scholl, M. C.; Francis, M.; Duffy, C. A. J.; Martin, A. P. Sex-biased dispersal of great white sharks. *Nature*. 2001. n. 412, p.139–140.
- Pearse, D.E.; Arndt, A. D.; Valenzuela, N.; Miller, B. A.; Cantarelli, V.; Sites, J. W. J. Estimating population structure under nonequilibrium conditions in a conservation context: continent-wide population genetics of the giant Amazon river turtle, *Podocnemis expansa* (Chelonia: Podocnemididae). *Molecular Ecology*. 2006. n. 15, p. 985-1006.
- Peakall, R.; Smouse, P. E. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes*. 2006. n. 6, p. 288-295.
- Pereira, L. H. G.; Foresti, F.; Oliveira, C. Genetic structure of the migratory catfish *Pseudoplatystoma corruscans* (Siluriformes: Pimelodidae) suggests homing behavior-Ecology. *Freshwater Fish*. 2009. n. 18, p. 215–225.
- Petrere, J.R. M.; Barthem, R. B.; Cordoba, E. A.; Gomez, B. C. Review of the large catfish fisheries in the upper Amazon and the stock depletion of piraiba (*Brachyplatystoma filamentosum* Lichtenstein). *Reviews in Fish Biology and Fisheries*. 2004. n. 14, p. 403-414.
- Petrere, J.R. M. A pesca de água doce no Brasil. *Ciênc. Hoje*. 1995. n.19, p. 28-33.
- Piggott, M. P.; Chao, N. L.; Beheregaray, L. B. Three fishes in one: cryptic species in an Amazonian floodplain forest specialist. *Biological Journal of the Linnean Society*. 2011. n. 102, p. 391–403.
- Platt, A. R.; Woodhall, R. W.; George, J. R. Improved DNA sequencing quality and efficiency using an optimized fast cycle sequencing protocol. *Biotechniques*. 2007. n. 43, p.58-62.
- Prakash, S.; Lewontin, R. C. A molecular approach to the study of genic heterozygosity in natural populations. III Direct evidence of coadaptation in gene arrangement of *Drosophyla*. *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)*. 1968. v.62, p.778-784.
- Pritchard, J. K.; Stephens, M.; Donnelly, P. Interference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*. 2000. n. 155, p. 945-959.
- Queiroz, L. J.; Torrente-Vilara, G.; Vieira, F. G.; Ohara, W. M.; Zuanon, J.; Doria, C. R. C. 2013. Fishes of Cuniã Lake, Madeira River Basin, Brazil. *Check List*. 2013. n. 9, v. 3, p. 540-548.
- Rahel, F. J. Biogeographic barriers, connectivity and homogenization of freshwater faunas: it's a small world after all. *Freshwater Biology*. 2007. n. 52, p. 696-710.
- Ramírez, G. H. Diferenciação genética de populações de Surubim (*Pseudoplatystoma fasciatum*) e de Caparari (*Pseudoplatystoma tigrinum*) nas bacias Magdalena, Orinoco e Amazonas. 2001. Tese de Doutorado. INPA/UFUA. Manaus. 114 p.

- Reis, R. E.; Kullander, S.O.; Ferraris, C. *Check List of The Freshwater Fishes of South And Central America (CLOFFSCA)*, EDIOUCRS. Porto Alegre. 2003. p. 729.
- Rice, W. R. Analyzing tables of statistical tests. *Evolution*. 1989. n. 43, p. 223-225.
- Rinchard, J.; Kestemont, P. Comparative study of reproductive biology in single-and multiple-spawner cyprinid fish. Morphological and histological. *Journal of Fish Biology*. 1996. n. 49, p. 883-894.
- Rodrigues, A. M. *A migração dos salmões. Texto de apoio a piscicultura*. 2002. Escola Superior Agraria. Instituto Politécnico de Castelo Branco. p.7
- Rodrigues, F. C. Estimativa da variabilidade genética da piramutaba (*Brachyplatystoma vaillantii*) por meio de marcadores moleculares microssatélites e D-loop de quarto localidades da Amazônia: diferenças entre calha e tributários. Dissertação de Mestrado, INPA, Manaus, 2009. p. 96.
- Romagosa E. Reproductive status in females of the Brazilian catfish, *Pseudoplatystoma fasciatum* reared in cages. *J. Appl. Ichthyol.*, 2010. n. 26, p. 806-811.
- Roos, S. T. Resource partitioning in fish assemblages: a review of field studies. *Copeia*. 1986. n. 2, p. 352-388.
- Ruffino, M. L. Gestão do uso dos recursos pesqueiros na Amazônia. 2005. Manaus IBAMA. 135p.
- Salzburger, W.; Ewing, G. B.; Von Haeseler, A. The performance of phylogenetic algorithms in estimating haplotype genealogies with migration. *Molecular Ecology*. 2011. n. 20, p. 1952-1963.
- Santos, G. M.; Efrem, J. G. F.; Zuanon, J. A. S. *Peixes comerciais de Manaus – Manaus: Ibama/AM, ProVarzea*. 2006. p. 144.
- Santos, M. C. F.. Caracterização genética das populações naturais de tambaqui *Colossoma macropomum*, na bacia amazônica através de marcadores mitocondriais e microssatélites. Tese de Doutorado. Universidade Federal do Amazonas. 2010. 156 pp.
- Santini, D. Queimadas voltam a afetar municípios da Amazônia Boliviana. DataCidades. 2013. <http://www.oeco.org.br/datacidades/27532-queimadas-voltam-a-afetar-municipios-da-amazonia-Boliviana>
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Springs Harbor Laboratory Press, Cold Springs Harbor, NY, USA. 1989. p. 1659.
- Saulo-Machado A.C.; Formiga K.M.; Ortiz M.F.; Sousa A.C.B; Alves-gomes J.A.; Batista J.S. Polymorphic microsatellite DNA markers for the Amazonian catfish *Pseudoplatystoma punctifer* (Siluriformes: Pimelodidae). *Conservation Genetics Resources*. 2011. v.3, n. 2, p.307-310.

- Schuelke, M. An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. *Nature Biotechnology*. 2000. n.18, p. 233-234.
- Silva, T. J. 2009. Marcadores moleculares para análise da variabilidade genética de populações do aruanã (*Osteoglossum bicirrhosum*). Tese de Doutorado – UFAM, Manaus, p. 91.
- Sivasundar, A.; Bermingham, E.; Ortí, G. Population structure and biogeography of migratory freshwater fishes (Prochilodus: Characiformes) in major South American rivers. *Molecular Ecology*. 2001. n. 10, p. 407-417.
- Slatkin, M. A Measure of Population Subdivision Based on Microsatellite Allele Frequencies. *Genetics*. 1995. n. 139, p. 457-462.
- Strayer, D. L.; Dudgeon, D. Freshwater biodiversity conservation: recent progress and future challenges. *Journal of the North American Benthological Society*. 2010. n. 29, v.1, p. 344-358.
- Sparre, P.; Venema, S.C. *Introducción a la evaluación de recursos pesqueros tropicales*. Parte 1. Manual FAO Fisheries Technical Paper. 1995. N1 306.1, Ver. 1. Rome, 376p.
- Spieth, P. T. Gene flow and genetic differentiation. *Genetics*. 1974. n. 78, p. 961-965.
- Spruell, P.; Hemmingsen, A. R.; Howell, P. J.; Kanda, N.; Allendorf, F. W. Conservation genetics of bull trout: Geographic distribution of variation at microsatellite loci. *Conservation Genetics*. 2003. n. 4, p. 17-19.
- Thompson, J. D.; Higgins, D. G.; Gibson, T. J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*. 1994. v. 22, p. 4673-4680.
- Tajima, F. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics*. 1989. n. 123, p. 585-595.
- Tautz, D. Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. *Nucleic Acids Research*. 1989. v.17, n.16, p. 6463-6471.
- Tautz, D.; Renz, M. Simple sequence are Ubiquitous repetitive components of eukaryotic genomes. *Nucleic Acid Research*. 1984. n. 12, p. 4127-4138.
- Templeton, A. *Genética de populações e teoria microevolutiva*. Tradução de: Population genetics and microevolutionary theory. Editora SBG. 2011.
- Templeton, A. R.; Crandall, K. A.; Sing, C. F. A cladistic analysis of phenotypic associations with haplotypes inferred from restriction endonuclease mapping and DNA sequence data. III. Cladogram estimation. *Genetics*. 1992. n. 132, p. 619-633.
- Terencio, M. L.; Schneider, C. H.; Porto, J. I. R. Molecular signature of the D-loop in the brown pencil fish *Nannostomus eques* (Characiformes, Lebiasinidae) reveals at



- least two evolutionary units in the Rio Negro basin, Brazil. *Journal of Fish Biology*. 2012. n. 81, p. 110-124.
- Torrente-Vilara, G.; Zuanon, J.; Leprieur, F.; Oberdorff, T.; Tedesco, P. A. Effects of natural rapids and waterfalls on fish assemblage structure in the Madeira River (Amazon Basin). *Ecology of Freshwater Fish*. (2011). v. 20, n. 4, p. 588–597.
- Torrico, J. P.; Hubert, N.; Desmarais, E.; Duponchelle, F.; Rodriguez, J. N.; Montoya-Burgos, J. I.; Davila, C. G.; Carvajal-Vallejos, F. M.; Grajales, A. A.; Bonhomme, F.; Renno, J. F. Molecular phylogeny of the genus *Pseudoplatystoma* (Bleeker, 1862): biogeographic and evolutionary implications. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 2009. v. 51, p. 588-594.
- Turner, T. F.; McPhee, M. V.; Campbell, P.; Winemiller, K. O. Phylogeography and intraspecific genetic variation of prochilodontid fishes endemic to rivers of northern South America. *Journal of Fish Biology*. 2004. n. 64, p. 186-201.
- Van Oosterhout, C.; Hutchinson, W. F.; Wills, D. P. M.; Shipley, P. Micro-Checker: Software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes*. 2004. n. 4, p. 535-538.
- Vannote, R. L.; Minshall, G. W.; Cummins, K. W.; Sedell, J. R.; Cushing, C. E. The river continuum concept. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*. 1980. n. 37, p. 130-137.
- Veríssimo, J. *A Pesca na Amazônia*. Livraria Clássica Alves e Companhia, Rio de Janeiro (1895).
- Ward, R. D.; Zemlak, T.S.; Innes, B. H.; Last, P. R.; Hebert, P. D. N. DNA barcoding Australia's fish species. *Philosophical Transactions of the Royal Society Biological*. 2005. n. 360, p. 1847-1857.
- Weber, J.L. Human DNA polymorphisms and methods of analysis. *Current Opinion in Biotechnology*. 1990. v. 1, n. 2, p.166-171.
- Weir, B. S.; Cockerham C. C. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution*. 1984. n. 38, p. 1358-1370.
- Welcome R.L. *River fisheries*. Roma: FAO, 1985. 330p. (FAO Fisheries Technical Papers, 262)
- Wright, S. *Evolution and the Genetics of Populations*. University of Chicago Press. 1978. Chicago
- Yeh, F. C.; Boyle, T. J. B. Population genetic analysis of co-dominant and dominant markers and quantitative traits. *Belgian Journal of Botany*. 1997. n. 129, p. 157.
- Zane, L.; Bargelloni, L.; Patarnello, T. Strategies for microsatellite isolation: a review. *Molecular Ecology*. 2002. v.11, n.1, p.1-16.

Zamparete, A.S. Caracterização de marcadores citogenéticos e genético moleculares em quatro populações de peixes da família Characidae – *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887). Jaboticabal. 1996. Dissertação (Mestrado) – FCAV/UNESP.

Zapata, C. La variabilidad genética de las poblaciones In: Genética em acuicultura. Espinosa, M. e Labarta, U. (Ed). Plan de formación de técnicos superiores em acuicultura. 1987. Ind. Graf. Espana, Madrid.