

FUNDAÇÃO DO INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS

**RELATÓRIO 1**

Caracterização genética de populações locais de grandes bagres e Characiformes migradores do rio Madeira, na região da Cachoeira de Teotônio

Equipe:

Claudio de Oliveira (UNESP – Botucatu/SP)

– Coordenador e Responsável técnico (peixes Characiformes)

Jacqueline da Silva Batista (INPA – Manaus/AM)

– Responsável técnico (peixes Siluriformes)

Kyara Formiga de Aquino (INPA – Manaus/AM)

José Antônio Alves Gomes (INPA – Manaus/AM)

Período: Fevereiro a maio de 2011

BOTUCATU

JUNHO/2011

## RESUMO DO RELATÓRIO

O futuro das populações selvagens depende grandemente da variabilidade genética das populações naturais. Neste contexto o estudo dessa variabilidade é fundamental para o desenvolvimento de projetos de manejo sustentável das populações. A região controle do DNA mitocondrial é hoje um dos marcadores moleculares mais eficaz e utilizado em estudos populacionais, tendo sido utilizado para identificar diferenças significativas mesmo entre populações separadas por pequenas distâncias geográficas. Assim, a presente proposta emprega este marcador para estudar populações locais de seis espécies de peixes migradores de importância comercial do rio Madeira, na área de influência da hidrelétrica de Santo Antônio. Sendo três espécies de peixes da ordem Siluriformes, conhecidos como grandes bagres (dourada, piramutaba e babão), e três espécies pertencentes à ordem Characiformes (piava, branquinha e piranha) Como um dos objetivos é verificar a existência de *homing* entre as espécies de bagres foram também amostradas outras populações locais de bagres na bacia Amazônica. Todos os dados foram analisados com as mais modernas ferramentas estatísticas, procurando responder a questão sobre a existência de isolamento entre as populações locais do rio Madeira, acima e abaixo da cachoeira de Teotônio, e se existe comportamento de *homing* entre as espécies de grandes bagres que ocorrem no rio Madeira.

Palavras-Chave: Diversidade genética, conservação, rio Madeira, Santo Antonio, *Brachyplatystoma*, DNA mitocondrial, peixes migradores.

## 1 INTRODUÇÃO

Dada à distribuição geográfica, abrangendo o território político de mais de que cinco países amazônicos, algumas espécies de grandes bagres incluindo a dourada (*Brachyplatystoma rousseauxii*), a piramutaba (*B. vaillantii*) e o babão (*B. platynemum*), ultrapassam essas barreiras e são capturadas, ao longo do sistema Estuário-Solimões-Amazonas (EAS). Desta forma, estas espécies estão entre as mais importantes para a pesca comercial na Amazônia brasileira, colombiana, peruana, boliviana e venezuelana com milhares de famílias na região dependendo direta e/ou indiretamente da atividade pesqueira sobre estes bagres (Bayley, 1981; Barthem e Goulding, 1997; Ruffino et al., 2000; Barthem e Goulding, 2007), o que é também verificado para os peixes de escamas.

Algumas espécies de grandes bagres realizam grandes migrações, com áreas geograficamente distintas de criação, alimentação e reprodução. Os adultos migram para as cabeceiras dos afluentes do rio Solimões/Amazonas para reproduzir, incluindo o rio Madeira. Após a desova, larvas e juvenis são carregados pela corrente, concentrando-se na região do estuário amazônico (área de criação). Após 2 a 4 anos neste ambiente, incluindo a Amazônia Central (área de alimentação dos adultos e pré-adultos), os indivíduos iniciam uma migração de mais de 4500 km para voltar às cabeceiras e desovar, completando o ciclo de vida. Durante esta migração, dá-se o pico da captura, desde Belém no Brasil, até Pucallpa no Peru, incluindo localidades na Colômbia, Bolívia e Guianas. Realizando uma das mais longas migrações conhecidas para peixes de água doce do mundo (Barthem e Goulding, 1997).

A intensificação do uso de recursos aquáticos tem produzido um grande impacto sobre as comunidades de peixes. Dentre as ações antrópicas mais impactantes destacam-se a construção de barragens, a sobrepesca, o mau uso do solo na agricultura, o descarte de esgoto sem tratamento prévio nos rios e igarapés, a construção de hidrovias e a introdução de espécies exóticas. A construção de represas afeta diretamente a rota migratória dos peixes podendo levar a fragmentação das populações (Esguícero e Arcifa, in press).

Diante do decréscimo dos desembarques pesqueiros, um aumento na conscientização geral sobre a necessidade de conservação da diversidade biológica tem surgido (Arias *et al.*, 1995; Avise e Hamrick, 1996). O futuro das populações selvagens depende grandemente da variação genética das populações naturais (Ryman, 1991). O estudo dessa variação é fundamental para o desenvolvimento de projetos de manejo sustentável.

A variabilidade genética dentro e entre populações é um parâmetro fundamental na biologia evolutiva e da conservação. Altos níveis de variação genética podem aumentar o potencial das populações em responder à seleção, acentuar a adaptação dentro de um habitat particular e também ampliar os limites de colonização e distribuição, possibilitando a sobrevivência em uma grande variedade de ambientes (Carvalho, 1993; Kalinowski, 2004). Além disso, as pesquisas em genética de populações podem elucidar várias questões relativas à estruturação de populações selvagens ou cultivadas de diversas espécies, tais como origem, sucesso reprodutivo, taxas de divergências genéticas, migração, tamanhos da população, seleção natural e eventos históricos (Sunnucks, 2000).

As espécies não são geneticamente homogêneas, mas estruturadas em grupos de indivíduos geneticamente mais semelhantes, estando o grau de isolamento diretamente relacionado à dispersão de indivíduos entre estes grupos (Balloux e Lugon-Moulin, 2002; Laikre *et al.*, 2005). Mecanismos que promovem o isolamento das populações incluem separação geográfica, capacidade de dispersão restrita dos indivíduos e comportamento de *homing* ou filopatria (retorno ao local de nascimento para reprodução). Uma troca limitada de indivíduos reprodutores entre os grupos resulta em uma diferenciação genética entre eles. O padrão de distribuição da variação genética dentro e entre populações é referido como “estrutura genética populacional” de uma espécie (Laikre *et al.*, 2005), a identificação desta estrutura e diversos outros parâmetros é possível mediante a utilização de técnicas morfológicas (Esguícero e Arcifa, *in press*) e moleculares (Thuesen *et al.*, 2008).

Um dos fragmentos de DNA mais utilizados em estudos populacionais é a região controle. Este fragmento é a região não codificadora do genoma

mitocondrial, possuindo em torno de 1100 pares de bases (pb) em peixes e localiza-se entre as regiões codificadoras de dois RNAs transportadores (RNAt), o RNAt da prolina e o RNAt da fenilalanina. Estima-se que a sua taxa de evolução está entre 2 a 5 vezes maior comparada aos demais genes mitocondriais codificadores de proteínas (Aquadro e Greenberg, 1983). Esse marcador vem sendo amplamente utilizado com o propósito de estimar a variabilidade e estrutura genética em populações naturais de diferentes espécies de peixes, principalmente de importância comercial. A maior parte desses estudos visa à caracterização genética da espécie alvo ao longo de um raio de distribuição geográfica e têm uma ampla abrangência taxonômica, incluindo o pacu - *Mylesinus paraschomburgkii* (Porto, 1999), as curimatãs - *Prochilodus lineatus* (Sivasundar et al., 2001) e *Prochilodus nigricans* (Machado, 2009), o tambaqui - *Colossoma macropomum* (Santos et al., 2007), o jaraqui-escama-grossa - *Semaprochilodus insignis* (Batalha, 2009), o peixe lápis - *Nannostomus eques* (Terêncio, 2009), o acará disco - *Symphysodon* spp. (Farias e Hrbek, 2008), a pescada - *Plagioscion squamosissimus* (Galetti, 2009), o sarapó - *Hypopygus lepturus* (Schmitt, 2005), a piramutaba - *Brachyplatystoma vaillantii* (Formiga-Aquino, 2004), - as piraíbas - *Brachyplatystoma filamentosum* e piraíba negra - *B. capapretum* (Huergo, 2009), a dourada - *Brachyplatystoma rousseauxii* (Batista e Alves-Gomes, 2006) entre outros.

A hipótese de migração para a dourada (*B. rousseauxii*), foi pioneiramente abordada e verificada, sob o ponto de vista genético a partir de 911 pb da região controle do DNA mitocondrial de indivíduos coletados em três localidades no eixo Estuário-Amazonas-Solimões (EAS): Belém (referenciando a área de criação), Manaus (a área de alimentação) e Tabatinga, no alto Solimões (proximidades da área de reprodução). Dois resultados valem à pena serem mencionados: 1) Não foi encontrada segregação geográfica entre os haplótipos encontrados nos três locais. Este resultado corrobora, a princípio, a hipótese que postula um único estoque na Amazônia que migra desde o estuário amazônico até as cabeceiras para desovar (Barthem e Goulding, 1997); 2) a variabilidade genética diminui no sentido Leste – Oeste (do estuário para as cabeceiras). Este cenário sugere que

a menor variabilidade genética encontrada em Tabatinga/Letícia pode ser o resultado da migração seletiva de populações para afluentes específicos do rio Solimões (Batista, 2001; Batista e Alves-Gomes, 2006).

A referida hipótese também foi testada para a piramutaba (*B. vaillantii*) a partir de 942 pb da região controle de indivíduos coletados em cinco pontos ao longo do eixo estuário-Amazonas-Solimões (Belém, Santarém, Manaus, Tefé e Tabatinga). Foram observados altos níveis de variabilidade genética e que essa espécie compõem uma única população nesse eixo. Diferentemente da dourada, não foi encontrada diferenças significativas na variabilidade genética no sentido Leste - Oeste (Formiga-Aquino, 2004).

Diferenciação populacional foi encontrada para o jaraqui (*Semaprochilodus insignis*), entre exemplares das bacias Amazônica e do Orinoco, utilizando a região controle (DNAMt). Todavia, essa espécie compreende um único estoque na região amazônica ao analisar exemplares oriundos de 10 localidades (Batalha, 2009).

Os estudos citados acima sugerem um comportamento equivalente, quando considerada a área da bacia amazônica, entre os bagres e os peixes de escama, e que precisa ser melhor verificado utilizando outras espécies. Nesse sentido, os estudos de peixes do rio Madeira serão úteis não só para avaliar se as barragens nesse rio causarão diminuição da variabilidade genética e de fluxo gênico, mas também para melhor esclarecer os padrões de estruturação populacional de três espécies de peixes lisos (Siluriformes) e de escama (Characiformes). Estas informações serão úteis no sentido de direcionar estratégias de manejo e conservação para as populações naturais das espécies estudadas, bem como fornecer subsídios para manejo de populações artificiais visando aquicultura com fins de conservação (repovoamento).

## 2 OBJETIVOS

**Específicos:** Testar a hipótese de existência de diferenças populacionais acima e abaixo da cachoeira de Teotônio, para peixes migradores de importância econômica, sendo três espécies de Siluriformes (grandes bagres) e três espécies de Characiformes (peixes de escama). Testar a hipótese de ocorrência de *homing* entre as espécies de Siluriformes.

### Operacionais:

- 1 Coletar pelo menos 30 exemplares de cada espécie em pontos abaixo e acima da futura barragem de Santo Antônio (populações locais).
- 2 Coletar pelo menos 30 exemplares de cada uma das três espécies de bagres em cinco outros pontos da bacia Amazônica, com o objetivo de testar a ocorrência de *homing* entre os bagres.
- 3 Estimar as frequências gênicas das populações locais, pela análise de pelo menos 30 sequências da região controle do DNAmT de cada população/espécie.
- 4 Comparar geneticamente as populações locais abaixo e acima da futura barragem de Santo Antônio, procurando verificar se existe algum isolamento entre elas atualmente.
- 5 Propor atividades que possam manter a variabilidade genética e o tamanho das populações locais em níveis similares aos que ocorriam antes da construção da barragem.

## 3 MATERIAL E MÉTODOS

As análises genéticas das espécies investigadas no presente estudo foram desenvolvidas no Laboratório Temático de Biologia Molecular (LTBM), Coordenação de Biodiversidade (CBIO), Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA) em Manaus – AM e no Laboratório de Biologia e Genética de

Peixes, Departamento de Morfologia, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista (UNESP), *campus* de Botucatu.

### **Coleta das amostras, extração e quantificação do DNA**

Foram coletadas amostras de tecido de três espécies de grandes bagres (Siluriformes): *Brachyplatystoma rousseauxii* (*dourada*), *Brachyplatystoma vaillantii* (*piramutaba*) e *Brachyplatystoma platynemum* (*babão*), e de três espécies de peixes de escamas (Characiformes): *Moenkhausia colletti* (*piava*), *Potamorhina latior* (*branquinha*) e *Pygocentrus nattereri* (*piranha*), para as análises genéticas. As espécies escolhidas são representativas das espécies de couro (bagres) e escamas (demais peixes) que utilizam o rio Madeira como habitat de ocupação e reprodução e também são migradores de média a longa distância, podendo transpor a cachoeira de Teotônio em suas rotas migratórias. Foram amostrados sítios acima e abaixo da área de construção da barragem da hidrelétrica de Santo Antônio – cachoeira de Teotônio. Para o estudo da existência ou não de *homing* entre os bagres foram também obtidas amostras em outros pontos de coleta na bacia Amazônica, a saber: Belém (PA), Manaus (AM), Tabatinga (AM), Rio Branco (AC) e Lábrea (AM) no Rio Purus, Cruzeiro do Sul (AC) e Eirunepé (AM) no rio Juruá, Vila Bitencourt (AM) no rio Japurá e Ipiranga (AM) no rio Içá .

As amostras foram coletadas por pesquisadores ou obtidas diretamente de pescadores artesanais e o tecido muscular foi preservado em etanol 95% e mantido refrigerado até a chegada ao laboratório, onde são mantidos em freezer comum.

### **Extração, amplificação e sequenciamento de DNA**

O DNA total foi extraído a partir de amostras de tecidos preservados em etanol 95%, segundo Sambrook et al. (1989) ou outro método alternativo como o uso de kits comerciais (Qiagen). O DNA total foi preservado em água ultrapura e quantificado por espectrofotometria para ajustamento de concentração.



Na reação de amplificação da região controle do DNA mitocondrial das espécies de bagres migradores foram utilizados o primer *forward* CytbP-L (5' CAC CTG AAT CGG AGG CAT GCC CGT 3') e o primer reverso DLR1 (5' - GGA TAC TTG CAT GTA TAA ATT GG -3') (Batista, 2010). Para o estudo de Characiformes foram utilizados os primers F-TTF (5'- GCC TAA GAG CAT CGG TCT TGT AA -3') e F-12R (5'- GTC AGG ACC ATG CCT TTG TG -3') (Sivasundar et al., 2001). Foram obtidos fragmentos em torno de 1000 pb, contendo toda a região controle. A amplificação do fragmento foi realizada em 25 uL de volume final, com os seguintes reagentes e respectivas concentrações finais: Tampão 1X, 0,2 mM de DNTp (Sinapse), 0,2 µM de cada primer (IDT), 0,04 U/µL da enzima Taq DNA polimerase (*Promega*) e de 0,4 a 4,0 ng/uL do DNA genômico. A reação foi realizada em termociclador (*Mastercycle thermocycler Eppendorf*), programado para realizar 30 ciclos. O tamanho e a qualidade do produto amplificado foi verificada em gel de agarose 1 % com marcador molecular de peso conhecido de 1kb. O produto de PCR foi purificado com o kit comercial GFX (GE Healthcare) de acordo com protocolo estabelecido pelo fabricante, ou com o sistema enzimático EXOSAP e usados como substrato para o sequenciamento de DNA.

O sequenciamento nucleotídico seguiu o protocolo acompanhante do kit de sequenciamento *Big Dye terminator* v3.1 (Perkin Elmer, Applied Biosystems). Duas reações de sequenciamento foram realizadas com o produto de PCR purificado de cada indivíduo pertencente às seis espécies de peixes, sendo cada uma no sentido 5'- 3' das fitas L e H. Uma utilizando o primer forward e a outra reação com o primer reverso utilizado previamente na reação de amplificação. A reação foi realizada em um volume final de 10 uL, utilizando entre 100 a 150 ng do produto de PCR purificado, o pre-mix do kit de sequenciamento (4 uL) e um dos *primers* (F ou R). Após a reação em termociclador (em 30 ciclos, sendo cada um 95 °C, por 15 s, 50 °C por 30 s e 60 °C por 1 min e 20 s) o produto da reação foi submetido a uma precipitação com Isopropanol para a eliminação de primers, dNTPs e ddNTPs não incorporados durante a reação de sequenciamento. A eletroinjeção e leitura dos fragmentos foram realizadas em analisador automático de DNA ABI PRISM® 3130 automated *Genetic Analyzer* (Perkin Elmer, Applied

Biosystems) nas condições de injeção e corrida recomendadas pelo fabricante. A sequência de DNA final foi resultante da compilação das duas sequências obtidas.

### **Análise das seqüências da Região Controle**

As seqüências nucleotídicas foram conferidas, editadas e compiladas com auxílio dos programas CHROMAS 2.13 (Technelysium Pty Ltd) e BIOEDIT 7.0.5 (Hall, 1999) e alinhadas com o programa CLUSTAL W 1.4 (Thompson et al., 1994) implementado no programa BIOEDIT 7.0.5 (Hall, 1999). Para cada espécie foi construída uma matriz final contendo em torno de 1000 pb (pares de bases) de cada indivíduo amostrado. Foram estimados os seguintes índices de diversidade molecular: número de haplótipos (H), número de haplótipos únicos (Hu, haplótipo que ocorre somente em um indivíduo), número total de mutações (ETA), número de sítios polimórficos (S), diversidade haplotípica (HD, probabilidade de cada duas seqüências serem diferentes em uma população), média das diferenças nucleotídicas par a par (K) e diversidade nucleotídica (Pi, indica o número médio de diferenças nucleotídicas por sítio entre duas seqüências de DNA).

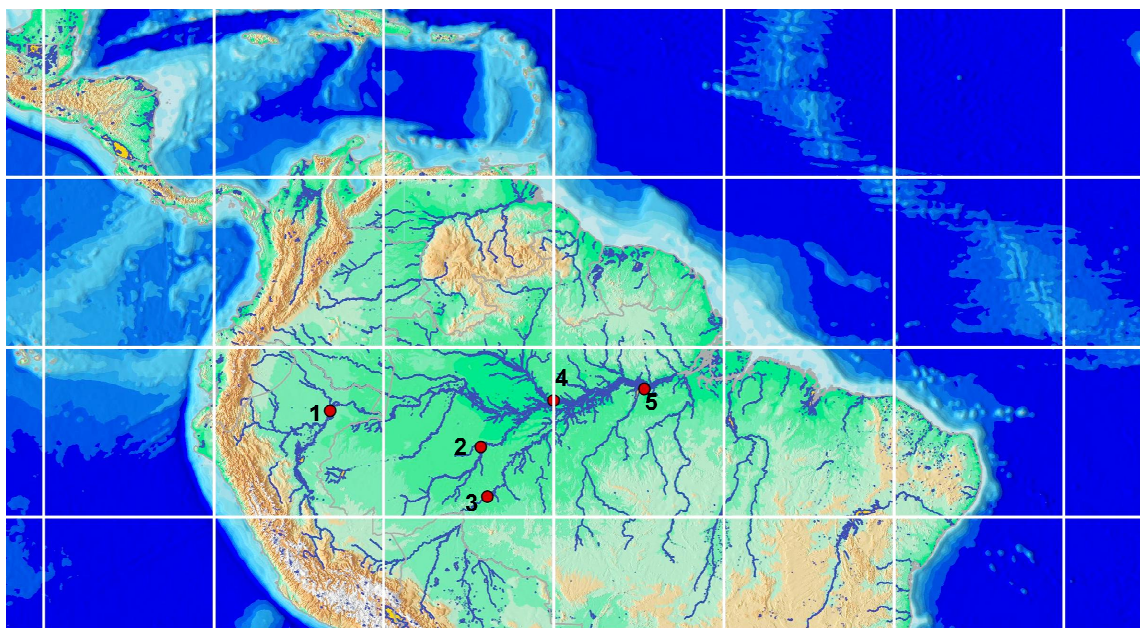
Para avaliar a existência de populações geneticamente diferenciadas para cada espécie e avaliar o grau de significância da variabilidade genética entre e dentro das localidades amostradas, foi utilizada a análise de variância molecular (AMOVA) (Excoffier et al., 1992), implementada no programa ARLEQUIN 3.11 (Excoffier et al., 2005).

Estimativas de fluxo gênico (taxas de migração), no que se refere ao número de migrantes por geração (Nm), foi estimada entre as populações de forma linear, a partir dos valores de FST, com o auxílio do programa ARLEQUIN 3.11 (Excoffier et al., 2005), onde  $Nm = Y = (1 - FST) / (2 FST)$ .

## 4 RESULTADOS PARCIAIS

### 4.1 - *Brachyplatystoma platynemum* (babão)

Foram obtidas, 131 amostras de *Brachyplatystoma platynemum*, de cinco localidades de coleta.



**Figura 1.** Localidades de coleta de *Brachyplatystoma platynemum*. (1) Iquitos, Perú (n=27), (2) Rio Purus, AM (n=19), (3) Rio Madeira, RO (n=48), (4) Manaus, AM (n=28), (5) Santarém, PA (n=9).

Até o momento foram analisadas 131 seqüências da região controle do mtDNA (D-loop), com um tamanho de 663 pb. As seqüências apresentam uma composição nucleotídica média de 21,7 % para citosina, 31% para timina, 31,8% para adenina e 15,5% de guanina. Um total de 501 sítios apresentou-se monomórfico, 160 foram polimórficos para um total de 177 mutações e só 55 sítios foram considerados importantes para análises de parcimônia.

A Tabela 1 mostra os resultados para os índices de polimorfismos. Todas as localidades apresentaram uma diversidade haplotípica alta, maior que 95%, sendo importante destacar que a localidade de Santarém apresentou uma diversidade de 100%, no entanto o número de indivíduos analisados até o momento é baixo. Para a localidade de Iquitos foram registrados 20 haplótipos, destes 17 correspondem a haplótipos únicos e 3 compartilhados; para a localidade de Manaus foram encontrados 26 haplótipos, 25 destes únicos e 1 compartilhado com a localidade de Iquitos; em no Rio Purus foram registrados 16 haplótipos 15 únicos e só um compartilhado. No caso do rio Madeira, a montante da cachoeira de Teotônio foram achados 7 haplótipos todos únicos para essa localidade, um importante número de indivíduos foi capturado na área mais próxima à cachoeira.

Nesta localidade foram achados 15 haplótipos de um total de 28 indivíduos; destes haplótipos, 14 correspondem a haplótipos únicos. Na região a jusante da cachoeira foram registrados 10 haplótipos dos quais 7 correspondem a haplótipos únicos.

**Tabela 01.** Polimorfismos de DNA para os indivíduos de *Brachyplatystoma platynemum* para as sete localidades amostradas.

Localidade	N	H	HU	S	ETA	HD	PI
Iquitos-Peru (IP)	27	20	17	63	66	0,952	0,01452
Manaus (M)	28	26	25	68	71	0,995	0,01568
Rio Purus (RP)	19	16	15	45	46	0,977	0,01207
Montante de Teotônio	8	7	7	28	29	0,964	0,01174
Teotônio	28	15	14	28	28	0,918	0,00676
Jusante de Teotônio	12	10	7	25	26	0,970	0,01293
Santarém (S)	9	9	9	30	30	1,000	0,01446

N= número amostral; H=número de haplótipos; HU= haplótipos únicos; S= sítios polimórficos; ETA= número de mutações; HD= diversidade haplotípica; PI= diversidade nucleotídica.

A análise de variância molecular mostra uma baixa variação genética entre as localidades amostradas com um valor para o índice de fixação  $F_{st} = 0,03$ , no entanto foi observada uma alta diversidade dentro dos grupos para cada localidade, com um percentagem de 96,94% de variação genética.

**Tabela 02.** Análise de Variância Molecular (AMOVA) para as localidades amostradas de *Brachyplatystoma platynemum* (7 localidades).

Fonte da variação	Grau de Liberdade	Soma dos quadrados	Componentes de variação	Porcentagem de variação
Entre populações	6	4,539	0,01522 Va	3,06
Dentro das populações	124	59,690	0,48137 Vb	96,94
Total	130	64,229	0,49659	
Índice de Fixação $F_{ST} = 0.03064$				

Os valores de  $F_{ST}$  nas comparações par a par, mostram uma leve estruturação entre algumas das localidades amostradas com valores para o  $F_{ST}$  no intervalo de 0,002 a 0,065. A localidade do Rio Madeira, especificamente a localidade da Cachoeira de Teotônio, mostrou uma baixa estruturação em comparação com as localidades do rio Purus, Santarém, Manaus e a Montante da Teotônio. Um aspecto importante é a leve estruturação verificada nas localidades da Cachoeira e a Jusante da mesma, no rio Madeira em comparação com as localidades a Montante. Entre a localidade de Iquitos e a localidade de Manaus há uma baixa estruturação, com valor de  $F_{ST}=0,025$ . A estruturação mostrada pelas comparações do  $F_{ST}$  foi corroborada pelas divergências par a par entre as localidades (Tabela 3).

**Tabela 03.** Valores de  $F_{ST}$  e media das distancias par a par entre as localidades. Acima da diagonal,  $F_{ST}$  entre 7 localidades; valores abaixo da diagonal, distancia corrigida par a par  $[P_{ixy} - (P_{ix} + P_{iy})/2]$ . \* valor significativo de  $P$ .

	Rio Purus	Santarém	Manaus	Montante	Cachoeira	Jusante	Iquitos
Rio Purus		0,012	0,008	0,029	0,053*	0,009	0,013
Santarém	0,011		0,002	0,017	0,045*	0,015	0,026
Manaus	0,008	0,002		0,018	0,043*	0,017*	0,025*
Montante	0,029	0,017	0,020*		0,061*	0,032*	0,042
Cachoeira	0,05*	0,041	0,043*	0,058*		0,028	0,065
Jusante	0,00	0,015	0,017*	0,033	0,026		
Iquitos	0,012	0,024	0,025*	0,042*	0,065*	-0,003	

Quando são excluídos das análises o grupo de indivíduos capturados na cachoeira de Teotônio o valor de  $F_{ST}$  é menor do que o obtido na análise inicial (Tabela 5). Além disso, as comparações par a par entre as localidades mostram baixa estruturação entre as localidades. As localidades do rio Madeira e Manaus apresentam um baixo valor de  $F_{ST} = 0,01$ , igualmente para as localidades de Iquitos e Manaus ( $F_{ST}=0,025$ ), sendo estes valores estatisticamente significativos (Tabela 6).

**Tabela 05.** Anova para as localidades amostradas de *Brachyplatystoma platynemum* excluindo a localidade da Cachoeira de Teotônio.

Fonte da variação	Grau de Liberdade	Soma dos quadrados	Componentes de variação	Porcentagem de variação
Entre populações	4	2,479	0,00652 Va	1,32
Dentro das populações	98	47,938	0,48917 Vb	98,68
Total	102	50,417	0,49569	
Índice de Fixação $F_{ST} = 0.01315$				

$F_{ST}$  específico para cada população RP 0,01345, Santarém 0,01537, Manaus 0,01165, Rio Madeira 0,01293, Iquitos 0,01392.

**Tabela 06.** Valores de  $F_{ST}$  e média das distâncias par a par entre as localidades, sem incluir a localidade da Cachoeira de Teotônio. Acima da diagonal,  $F_{ST}$  entre localidades; valores abaixo da diagonal, distância corrigida par a par  $[P_{ix} - (P_{ix} + P_{iy})/2]$ ;  $P$  valores entre parênteses.

	Rio Purus	Santarém	Manaus	Rio Madeira	Iquitos-Perú
Rio Purus		0,012 (0,19)	0,008 (0,09)	0,009 (0,15)	0,013 (0,10)
Santarém	0,011 (0,19)		0,002 (0,42)	0,008 (0,28)	0,026 (0,08)
Manaus	0,008 (0,09)	0,002 (0,10)		0,010 (0,00)*	0,025 (0,00)*
Rio Madeira	0,009 (0,15)	0,007 (0,29)	0,010 (0,00)*		0,006 (0,18)
Iquitos-Perú	0,012 (0,11)	0,024 (0,09)	0,025 (0,00)*	0,006 (0,18)	

## Análises realizadas unicamente para o rio Madeira

**Tabela 07.** Análise de Variância Molecular (AMOVA) de *Brachyplatystoma platynemum* para as localidades do rio Madeira.

Fonte da variação	Grau de Liberdade	Soma dos quadrados	Componentes de variação	Porcentagem de variação
Entre populações	2	1,344	0,01423 Va	2,94
Dentro das populações	46	21,615	0,46989 Vb	97,06
Total	48	22,959	0,48413	

Índice de Fixação  $F_{ST} = 0.02940$

Os valores para o índice de fixação  $F_{ST}$  específicos para cada localidade foram de: Montante da Cachoeira  $F_{ST} = 0,03080$ , Jusante da Cachoeira  $F_{ST} = 0,02917$  e na Cachoeira de Teotônio  $F_{ST} = 0,02888$ . Nas comparações par a par mostram que os valores para o  $F_{ST}$  são baixos, no entanto entre as localidades da Jusante e a Cachoeira o valor de  $p$  para o  $F_{ST}$  foi estatisticamente significativo.

**Tabela 08.** Valores de  $F_{ST}$  e media das distancias par a par entre as localidades do rio Madeira. Acima da diagonal,  $F_{ST}$  entre localidades; valores abaixo da diagonal, distancia corrigida par a par [ $P_{ixy} - (P_{ix} + P_{iy})/2$ ];  $P$  valores entre parênteses.

	Montante da cachoeira	Cachoeira	Jusante da Cachoeira
Montante da cachoeira		0,038 (0,07)	0,010 (0,32)
Cachoeira	0,035(0,022)		0,028 (0,02)*
Jusante da Cachoeira	0,010(0,400)	0,026 (0,040)	

#### 4.2 - *Brachyplatystoma vaillantii* (piramutaba)

Considerando que estamos em uma fase inicial do cronograma de trabalho, o número de seqüências disponíveis até o momento não permite que um quadro definitivo seja estabelecido, mas é possível verificar algumas tendências frente aos resultados preliminares. As tabelas 9, 10, 11 e 12 resumem os principais parâmetros da variabilidade e análise da estrutura genética para a piramutaba (*B. vaillantii*).

Até o momento foi seqüenciada a Região Controle (RC) do DNA mitocondrial (DNAm<sub>t</sub>) de 90 amostras de *Brachyplatystoma vaillantii*, de seis localidades de coleta, sendo três localidades situadas na calha principal do eixo estuário/Amazonas/ Solimões (EAS), (Tabatinga, Manaus e Belém) e três tributários do rio Solimões/Amazonas (rios Japurá, Içá e Madeira). As amostras do rio Madeira foram coletadas na Cachoeira de Santo Antônio. O número amostral variou entre 10 a 20 entre as localidades. O fragmento RC do DNAm<sub>t</sub> totalizou 942 pb após alinhamento.

Para todas as localidades amostradas a piramutaba apresentou diversidade haplotípica alta, de 100%. Em Tabatinga foi encontrado o maior número de haplótipos e de haplótipos únicos (H e HU igual a 20) (Tabela 09). Entre os três afluentes amostrados, o rio Içá apresentou o menor número de haplótipos únicos e o rio Japurá o maior (HU=10). O número total de mutações variou entre 39 (rios Içá e Madeira) e 67 (Belém).

**Tabela 09:** Parâmetros de diversidade genética para a piramutaba (*Brachyplatystoma vaillantii*) amostradas em três localidades da calha principal do eixo principal estuário-Amazonas-Solimões (Belém, Manaus e Tabatinga) e três afluentes do rio solimões, sendo dois da margem esquerda (rios Japurá e Içá) e um da margem direita (rio Madeira).

Localidade	N	H	HU	ETA	K	S	HD	Pi
Tabatinga	20	20	20	49	12,29	54	1,00	0,0140
Rio Japurá	10	10	10	47	16,00	53	1,00	0,0187
Rio Içá	10	10	08	39	13,26	44	1,00	0,0154
Manaus	20	20	17	53	12,99	61	1,00	0,0151
Rio Madeira	10	10	09	39	13,22	49	1,00	0,0173
Belém	20	20	17	67	14,54	54	1,00	0,0147

N: número de indivíduos sequenciados; H: número de haplótipos; HU: haplótipos únicos; ETA: número total de mutações; K: média de diferenças nucleotídicas para a par; S: número de sítios polimórficos; HD: diversidade haplotípica; Pi: Diversidade nucleotídica par a par.

A análise de variância molecular mostra uma baixa variação genética entre as localidades amostradas com um valor para o índice de fixação  $F_{st} = 0,037$ , no entanto foi observada uma alta diversidade dentro dos grupos para cada localidade, com um porcentagem de 96,24% de variação genética.



**Tabela 10.** Análise de Variância Molecular (AMOVA) de *Brachyplatystoma vaillantii* entre as seis localidades amostradas (Belém, Manaus, Tabatinga, rios Içá, Japurá e Madeira).

Fonte da variação	Grau de Liberdade	Soma dos quadrados	Componentes de variação	Porcentagem de variação
Entre as localidades	5	59,42	0,2952 Va	3,76
Dentro das localidades	84	634,55	7,55417 Vb	96,24
Total	89	693,967	7,8493	
Índice de Fixação $F_{ST} = 0.037$				

**Tabela 11.** Valores de  $F_{ST}$  par a par estimado para a piramutaba entre as seis localidades amostradas.

	Tabatinga	rio Japurá	rio Içá	Manaus	rio Madeira
rio Japurá	0,077				
rio Içá	<b>-0,025</b>	0,039			
Manaus	0,080	0,036	0,034		
rio Madeira	<b>0,110</b>	-0,012	0,071	0,015	
Belém	0,034	0,038	0,010	-0,001	0,037

Os valores de  $F_{ST}$  nas comparações par a par, mostram uma leve estruturação entre algumas das localidades amostradas com valores variando entre -0,025 (rio Içá e Tabatinga) a 0,110 (rio Madeira e Tabatinga) (Tabela 11). Porém nenhum dos valores foi significativo após a correção de Bonferroni (Rice, 1989).

A ausência de estrutura genética significativa é corroborada com as estimativas de fluxo gênico a partir dos valores de  $Nm$  (número de migrantes por geração, em que o  $N$  é o tamanho efetivo da população de fêmeas e  $m$  é a taxa de mutação/sítio por geração) que variou entre 4,07 (entre Tabatinga e rio Madeira) a 50,09 (entre Belém e rio Içá) (Tabela 12).

**Tabela 12.** Número de Migrantes por geração ( $Nm$ ) para a piramutaba estimados a partir dos valores de  $F_{ST}$  par a par entre as seis localidades amostradas

	Tabatinga	rio Japurá	rio Içá	Manaus	rio Madeira
rio Japurá	6,02				
rio Içá	inf	12,28			
Manaus	5,73	13,57	14,37		
rio Madeira	<b>4,07</b>	inf	6,52	33,06	
Belém	14,42	12,54	<b>50,09</b>	inf	13,08

Inf = valores altos de  $Nm$  que não poderem ser estimados pelo programa ARLEQUIN 3.11

### 4.3 – *Brachyplatystoma rousseauxii* (dourada)

O número de seqüências disponíveis até o momento para a dourada também não permite que um quadro definitivo seja estabelecido. Algumas tendências frente aos resultados preliminares é possível de verificar. As tabelas 13, 14, 15 e 16 resumizam os principais parâmetros da variabilidade e análise da estrutura genética obtida para a dourada (*B. rousseauxii*) até o momento.

Até o momento foi seqüenciada a Região Controle (RC) do DNAm de 138 amostras de *Brachyplatystoma rousseauxii* coletadas em oito localidades, sendo três localidades situadas na calha principal do eixo (EAS), (Tabatinga, Manaus e Belém), dois tributários da margem direita (rios Japurá e Içá) e três situados na margem esquerda do rio Solimões/Amazonas (rios Juruá, Purus e Madeira). As amostras do rio Madeira foram coletadas na Cachoeira de Santo Antônio. O número amostral variou entre 07 (rio Juruá) a 17 (Belém) entre as localidades. O fragmento RC do DNAm totalizou 911 pb.

A dourada apresentou diversidade haplotípica alta, acima de 88%. Em Belém foi encontrado o maior número de haplótipos (H=15) e de haplótipos únicos (HU=10) (Tabela 13). Entre os cinco afluentes amostrados, o rio Içá (H=10) apresentou o maior número de haplótipos o rio Juruá o menor (HU=7). O número total de mutações variou entre 23 (Tabatinga) e 36 (Manaus).

**Tabela 13:** Parâmetros de diversidade genética para a dourada (*Brachyplatystoma rousseauxii*) amostradas em três localidades da calha principal do eixo principal estuário-Amazonas-Solimões (Belém, Manaus e Tabatinga) e cinco afluentes do rio solimões/Amazonas.

Localidade	N	H	HU	ETA	K	S	HD	Pi
Belém	17	15	10	34	8,94	33	0,98	0,0089
Manaus	15	10	05	36	8,14	34	0,91	0,0081
Tabatinga	15	9	03	23	6,54	22	0,88	0,0064
Rio Japurá	10	9	07	32	9,57	31	0,98	0,0095
Rio Içá	10	10	08	35	10,15	34	1,00	0,0101
Rio Madeira	10	7	03	24	9,08	24	0,93	0,0090
Rio Purus	9	9	06	30	8,72	29	1,00	0,0086
Rio Juruá	7	7	04	28	10,33	27	1,00	0,0102

N: número de indivíduos sequenciados; H: número de haplótipos; HU: haplótipos únicos; ETA: número total de mutações; K: média de diferenças nucleotídicas para a par; S: número de sítios polimórficos; HD: diversidade haplotípica; Pi: Diversidade nucleotídica par a par.

A análise de variância molecular mostra uma baixa variação genética entre as localidades amostradas com um valor para o índice de fixação  $F_{st}= 0,029$ . Foi observada uma alta diversidade dentro das localidades amostradas, com um porcentagem de 99,10% de variação genética (Tabela 14).

**Tabela 14:** Análise de Variância Molecular (AMOVA) de *Brachyplatystoma rousseauxii* entre asoitos localidades amostradas (Belém, Manaus, Tabatinga, rios Içá, Japurá, Madeira, Purus e Juruá).

Fonte da variação	Grau de Liberdade	Soma dos quadrados	Componentes de variação	Porcentagem de variação
Entre as localidades	7	40,94	0,1302 Va	2,90
Dentro das localidades	85	369,98	4,3527 Vb	97,24
Total	92	693,967	7,8493	

Índice de Fixação  $F_{ST} = 0,029$

**Tabela 15:** Valores de  $F_{ST}$  par a par estimado para a dourada entre as oito localidades amostradas

	Belém	Manaus	Tabatinga	Rio Içá	Rio Japurá	Rio Madeira	Rio Purus
Manaus	0,090						
Tabatinga	0,097	-0,019					
Rio Içá	0,045	-0,018	-0,016				
Rio Japurá	-0,040	0,072	0,090	0,042			
Rio Madeira	0,063	0,023	0,019	-0,031	0,068		
Rio Purus	0,056	-0,049	-0,046	<b>-0,056</b>	0,033	-0,019	
Rio Juruá	<b>0,110</b>	0,007	0,005	0,011	0,083	-0,016	-0,020

Os valores de  $F_{ST}$  estimados ente cada par de localidade, mostram uma leve estruturação entre algumas das localidades amostradas com valores variando entre -0,056 (rios Içá e Purus) a 0,110 (rio Juruá e Belém) (Tabela 15). Porém nenhum dos valores foi significativo após a correção de Bonferroni ( $P > 0,0018$ ) (Rice, 1989).

A ausência de estrutura genética significativa é corroborada com as estimativas de fluxo gênico a partir dos valores de  $Nm$  (número de migrantes por geração) que variou entre 4,05 (entre Belém e rio Juruá) a 102,86 (entre Tabatinga e rio Juruá) (Tabela 16).

**Tabela 16.** Número de Migrantes por geração ( $Nm$ ) para a dourada estimados a partir dos valores de  $F_{ST}$  par a par entre as oito localidades amostradas

	Belém	Manaus	Tabatinga	Rio Içá	Rio Japurá	Rio Madeira	Rio Purus
Manaus	5,08						
Tabatinga	4,63	inf					
Rio Içá	10,70	inf	inf				
Rio Japurá	inf	6,48	5,05	11,38			
Rio Madeira	7,40	21,22	25,40	inf	6,90		
Rio Purus	8,46	inf	inf	inf	14,72	inf	
Rio Juruá	<b>4,05</b>	74,52	<b>102,86</b>	43,79	5,55	inf	inf

Inf = valores altos de  $Nm$  que não poderem ser estimados pelo programa ARLEQUIN 3.11

## 5 CONCLUSÕES PARCIAIS

As análises preliminares de *Brachyplatystoma platynemum* (N= 131), *B. vaillantii* (N=90) e *B. rousseauxii* (N=138) mostraram uma elevada diversidade haplotípica (maior que 88%) (Tabelas 1, 9 e 13), indicando que o marcador genético escolhido, a região controle do DNA mitocondrial, é um bom marcador para estudos populacionais e que, apesar da intensa pesca sobre estas espécies, a variabilidade genética ainda se mantém elevada, reduzindo os riscos de extinção por endogamia.

Dois pontos principais estão sendo alvo de análise no presente estudo. A primeira questão é se existe estruturação entre as populações locais das três espécies ao longo da bacia Amazônica. Os resultados das análises de variância molecular (Tabela 2, 10 e 14) mostram uma baixa variação genética entre as localidades, com um índice de fixação (*F<sub>st</sub>*) entre 0,029 (dourada) a 0,037 (piramutaba). Já a análise dos valores de *F<sub>st</sub>* nas comparações par a par mostraram uma leve estruturação entre algumas localidades, porém, especificamente a localidade da Cachoeira de Teotônio mostrou baixa estruturação em comparação com as demais localidades (Tabela 3, 11 e 15).

Para *B. platynemum* verificou-se um efeito diferenciado quando as amostras capturadas exatamente na Cachoeira de Teotônio (Tabela 3) foram removidas das análises (Tabela 5). Neste último caso as diferenças observadas nos valores de *F<sub>st</sub>* foram menores, ainda que em alguns casos estatisticamente significativos. Ainda que não haja uma explicação para esse fato pode ter havido amostragem aleatória de indivíduos estreitamente aparentados o que pode ter levado a esse efeito inesperado.

Quando comparados a dados da literatura observa-se que os valores de variabilidade genética e de *F<sub>ST</sub>* obtidos para as três espécies são muito semelhantes aos obtidos por Batista e Alves-Gomes (2006), que não identificaram nenhuma estruturação genética entre as amostras de *B. rousseauxii* coletadas no eixo Amazonas-Solimões e por Formiga-Aquino (2004) que também não encontrou diferenças entre amostras de *B. vaillantii* no eixo Estuário-Amazonas-Solimões. Por outro lado, esses resultados são diferentes dos obtidos por Pereira et al. (2009) para outra espécie de grande bagre migrador, *Pseudoplatystoma corruscans*, da bacia do Prata, para a qual as análises de variância molecular mostraram valores moderados de *F<sub>st</sub>* (variando de 0,034 a 0,163) e significativos.

As populações podem ser diferenciadas, sob o ponto de vista genético, quando o número de indivíduos migrantes (*N<sub>m</sub>*), um estimador de fluxo gênico, assumir valores menores de que um, ao passo que as mesmas podem ser

consideradas como uma única unidade populacional panmítica quando a estimativa de  $Nm$  assumir valores maiores de que quatro (Kimura e Maruyama, 1971). Até o momento foram observados valores de  $Nm$  maiores de que quatro em todas as comparações par a par (Tabelas 12 e 16).

Desta maneira, a partir dos resultados preliminares obtidos até o momento, *B. platynemum*, *B. vaillantii* e *B. rousseauxii* mostram tendências a formar uma única população panmítica na área da bacia Amazônica estudada. Um número amostral maior é necessário para melhor confirmar esse resultado.

Um segundo ponto que está sendo investigado diz respeito a cachoeira de Teotônio servir ou não como barreira ao fluxo gênico na bacia do rio Madeira. Os valores de *Fst* calculados para as amostras de *B. platynemum* obtidas das localidades a montante, na cachoeira e a jusante (Tabela 8) são baixos, não indicando nenhuma estruturação. Os valores estatisticamente significativos entre as localidades a jusante e da cachoeira podem também ser relacionados a captura aleatória de indivíduos estreitamente relacionados na coleta da cachoeira. Assim sendo, a cachoeira pode não ser uma barreira efetiva na separação das populações locais de *B. platynemum*, como evidenciado pela ausência de estruturação genética.

## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aljanabi, S.M., Martinez, I. (1997). Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. *Nucleic Acid. Res.* 25(22): 4692-4693.
- Appleyard, S. A., Ward, R..D., Grewe, P. M. (2002). Genetic stock structure of bigeye tuna in the Indian Ocean using mitochondrial DNA and microsatellites. *J. Fish Biol.* 60: 767-770.
- Arias, J., Sanchez, L., Martinez, P. (1995). Low stocking incidence in brown trout populations from northwestern Spain monitored by LDH-5\* diagnostic marker. *J. Fish Biol.* 47: 170-176.
- Aurelle, D.; Cattaneo-Berrebi, G.; Berrebi, P. (2002). Natural and secondary contact in brown trout (*Salmo trutta*, L.) in the French western Pyrennes assessed by allozymes and microsatellites. *Heredity* 89: 171-183.
- Avise, J.C., Hamrick, J.L. (1996). Conservation genetics. Case histories from nature. Chapman & Hall, New York, 512 p.
- Balloux, F. & Lugon-Moulin, N. (2002). The estimation of population differentiation with microsatellite markers. *Mol. Ecol.* 11: 155-165.
- Barbosa. A.C.D.R., Galzerani, F., Corrêa. T.C., Galetti Jr., P.M., Hatanaka, T. (2008). Description of novel microsatellite loci in the Neotropical fish *Prochilodus argenteus* and cross-amplification in *P. costatus* and *P. lineatus*. *Genet. Mol. Biol.* 31, 1 (suppl): 357-360.
- Bassan, B.J.; Caetano- Anolles, G.; Gresshoff, P.M. (1991). Fast and sensitive silver staining of DNA polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.* 196: 80- 83.
- Batista, J.S., Farias, I.P., Formiga-Aquino, K., Sousa. A.C.B., Alves-Gomes, J. (in press). 10.1007/s12686-009-9117-5. Beachan, T.D., Wood C.C. (1999). Application of the

- microsatellite DNA variation to estimation of stock composition and escapment of Nass river sockeye salmon (*Oncorhynchus nerka*). *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 56: 297-310.
- Beheregaray L.B., Möller, L.M., Schwartz, T.S., Chao, N.L., Caccone, A. (2004a). Microsatellite markers for the cardinal tetra *Paracheirodon axelrodi*, a commercially important fish from central Amazonia. *Mol. Ecol. Notes* 4: 330–332.
- Beheregaray L.B., Schwartz, T.S., Möller, L.M., Call, D., Chao, N.L., Caccone, A. (2004b). A set of microsatellite DNA markers for the one-lined pencilfish *Nannostomus unifasciatus*, an Amazonian flooded forest fish. *Mol. Ecol. Notes* 4: 333-335.
- Calcagnotto, D., DeSalle, R. (2009). Population genetic structuring in pacu (*Piaractus mesopotamicus*) across the Paraná-Paraguay basin: evidence from microsatellites. *Neotrop. Ichthyol.* 7(4):607-616.
- Calcagnotto, D., Russello, M., DeSalle, R. (2001). Isolation and characterization of microsatellite loci in *Piaractus mesopotamicus* and their applicability in other Serrasalminae fish. *Mol. Ecol.* 10:245-247.
- Carvalho, G.R. (1993). Evolutionary aspects of fish distribution: genetic variability and adaptation. *J. Fish Biol.* 43, 53-73.
- Desvignes, J. F., Laroche, J., Durand, J. D., Bouvet, Y. (2001). Genetic variability in reared stocks of common carp (*Cyprinus carpio* L.) based on allozymes and microsatellites. *Aquaculture* 194: 291-301.
- DeWoody, J.A., Avise, J.C. (2000). Microsatellite variation in marine, freshwater and anadromous fishes compared with other animals. *J. Fish Biol.* 56: 461-473.
- Esguícero, L.H., Arcifa, M. S. (in press). Fragmentation of a Neotropical migratory fish population by a century-old dam. *Hydrobiologia*. DOI 10.1007/s10750-009-0008-2.
- Excoffier, L., Smouse, P., Quattro, J. (1992). Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: Application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics*, 131: 479-491.
- Excoffier, L., Laval, A., Schneider, S. (2005). Arlequin ver. 3.1: An integrated software package for populations genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online* v.1: p. 47-50.
- Goudet, J. (2002). Fstat A Program to Estimate and Test Gene Diversities and Fixation Indices (Version 2.9.3.2). URL: <http://www2.unil.ch/izea/software/fstat.html>
- Hansen, M.M., Ruzzamante, D.E, Nielsen, E.E., Mensberg, K. D. (2000) Microsatellite and mitochondrial DNA polymorphism reveals life-history dependent interbreeding between hatchery and wild brown trout (*Salmo trutta* L.). *Mol. Ecol.* 9: 583-594.
- Jackson, T. R.; Ferguson, M. M.; Danzmann, R.G.; Fishback, A. G.; Ihssen, P. E.; O'Connell, Crease, T. J. (1998). Identification of two QTL influencing upper temperature tolerance in three rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) half-sib families. *Heredity* 80: 143-151.
- Kalinowski, S.T. (2004). Counting alleles with rarefaction: private alleles and hierarchical sampling designs. *Conserv. Genetics* 5: 539-543.
- Kimura, M.; Maruyama, T. 1971. Pattern of neutral polymorphism in a geographically structured population. *Genet. Res.*, 1: 9

- Koskinen, M. T.; Nilsson, J.; Veselov, J.; Potutkin, A. G.; Ranta, E.; Primmer, C. R. (2002). Microsatellite data resolve phylogeographic patterns in European grayling, *Thymallus thymallus*, Salmonidae. *Heredity* 88: 391-401.
- Laikre, L.; Palm, S. & Ryman, N. (2005). Genetic population structure of fishes: implications for coastal zone management. *Ambio* 34(2): 111-119.
- Mezerra, M.; Largiàder, C.R. 2001. Comparative analysis of introgression at three marker classes: a case study in a stocked population of brown trout. *J. Fish. Biol.* 59: 298-305.
- Morelli, K.A.; Reveldaves, E.; Oliveira, C.; Foresti, F. (2007). Isolation and Characterization of eight microsatellite loci in *Leporinus macrocephalus* (Characiformes : Anostomidae) and cross – species amplification. *Mol. Ecol. Notes* 7: 32-34.
- Oliveira, C.; Foresti, F. & Hilsdorf, A.W.S. (2009). Genetics of neotropical fish: from chromosomes to populations. *Fish Physiol. Biochem.* 35: 81-100.
- O'Reilly, P.T., Canino, M.F., Bailey, K.M., Bentzen, P. (2000). Isolation of twenty low stutter di- and tetranucleotide microsatellites for population analyses of walleye pollock and other gadoids. *J. Fish Biol.* 56: 1074-1086
- Pereira, L.H.G., Foresti, F., Oliveira, C. (2009). Genetic structure of the migratory catfish *Pseudoplatystoma corruscans* (Siluriformes: Pimelodidae) suggests homing behavior. *Ecol. Freshwater Fish* 18: 215–225.
- Perez-Enriquez, R., Takagi, M., Taniguchi, N. (1999). Genetic variability and pedigree tracing of hatchery-reared stock of red sea bream (*Pagrus major*) used for stock enhancement, based on microsatellite DNA markers. *Aquaculture* 173: 413-423.
- Poteaux, C., Bonhomme, F., Berrebi, P. (1999) Microsatellite polymorphism and genetic impact of restocking in mediterranean brown trout (*Salmo trutta* L.). *Heredity* 82: 645-653.
- Pritchard, J. K., Stephens, M., and Donnelly, P. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155: 945-959.
- Revaldaves, E., Pereira, L.H.G., Foresti, F., Oliveira, C. (2005). Isolation and characterization of microsatellite loci in *Pseudoplatystoma corruscans* (Siluriformes: Pimelodidae) and cross-species amplification. *Mol. Ecol. Notes*. 5: 463-465.
- Rice, W.R. 1989. Analyzing tables of statistical tests. *Evolution*, 43: 223-225.
- Rodrigues, F.C., Farias, I.P., Batista, J.B., Alves-Gomes, J. (2009). Isolation and characterization of microsatellites loci for “piramutaba” (*Brachyplatystoma vaillantii*, Siluriformes: Pimelodidae), one of the commercially most important migratory catfishes in the Amazon Basin. *Conservation Genet. Resour.* 1:365–368.
- Rousset, F. (2007). GENEPOP'007: a complete re-implementation of the GENEPOP software for Windows and Linux. *Mol. Ecol. Res.* 8:103-106.
- Ryman, N. (1991). Conservation genetic considerations in fishery management. *J. Fish Biol.* 39: 211-224.
- Sivasundar, A., Bermingham, E., Ortí, G. (2001). Population structure and biogeography of migratory freshwater fishes (*Prochilodus*: Characiformes) in major South American rivers. *Mol. Ecol.* 10: 407–417.
- Sunnucks, P. (2000). Efficient genetic markers for population biology. *Tree* 15: 199-203.

- Taylor, M. I., Verheyen, E. (2001). Microsatellite data reveals weak population substructure in *Copadichrois* sp. 'virginialis kajose', a demersal cichlid from Lake Malawi, Africa. *J. Fish Biol.* 59: 593-604.
- Thuesen, P.A., Pusey, B.J., Peck, D.R., Pearson, R., Congdon, B.C. (2008). Genetic differentiation over small spatial scales in the absence of physical barriers in an Australian rainforest stream fish. *J. Fish. Biol.* 72: 1174-1187.
- Was, A., Wenne, R. (2002). Genetic differentiation in hatchery and wild sea trout (*Salmo trutta*) in the Southern Baltic at microsatellite loci. *Aquaculture* 204: 493-506.
- Waters, J. M., Epifanio, J. M., Gunter, T., Brown, B. L. (2000). Homing behaviour facilitates subtle genetic differentiation among river populations of *Alosa sapidissima*: microsatellites and mtDNA. *J. Fish Biol.* 56: 622-636
- Wright, J. M., Bentzen, P. (1995). Microsatellites: genetic markers for the future. In: *Molecular genetics in fisheries* (Carvalho, G. R., Pitcher, T.J., eds). Chapman & Hall. TJ Press (Padstow) Ltd, Padstow, Cornwall, Great Britain.
- Yazbeck G.M., Kalapothakis E. (2007). Isolation and characterization of microsatellite DNA in the piracema fish *Prochilodus lineatus* (Characiformes). *Genet. Mol. Res.* 6 (4): 1026-1034

Dr. Claudio de Oliveira

Dra. Jacqueline da Silva Batista