

FUNDAÇÃO DO INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS

RELATÓRIO 4

Caracterização genética de populações de grandes bagres migradores e Characiformes 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 Martins Formiga (INPA – Manaus/AM)

José Antônio Alves Gomes (INPA – Manaus/AM)

Período: Setembro a Outubro de 2011

BOTUCATU

DEZEMBRO/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. Neste relatório apresentamos os resultados finais das análises com babão (*Brachyplatystoma platynemum*).

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 aqüicultura 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 DNAm 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 outros pontos de coleta na bacia Amazônia, 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 $Nm = Y / (2 \cdot FST)$.

4 RESULTADOS FINAIS *Brachyplatystoma platynemum*

As amostras de *Brachyplatystoma platynemum* foram coletadas em sete localidades da Amazônia brasileira e peruana, que compreendem três pontos na calha principal do rio Amazonas (Iquitos, Manaus e Belém), além de dois tributários de sua margem direita (rio Madeira e o rio Purus) (Figura 1).

As amostras foram obtidas em colaboração com o Laboratório Temático de Biologia Molecular (LTBM) do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), dentro do projeto “PIRADA” (Genética, manejo e conservação dos grandes bagres migradores na Amazônia); a Universidade Estadual de Rondônia e a empresa Santo Antonio Energia S/A, este último, principalmente na coleta das amostras do rio Madeira, as quais foram obtidas em três pontos correspondentes à montante, jusante e cachoeira de Teotônio (Figura 1). Foram retiradas amostras de tecido muscular, nadadeira e barbilhão dos espécimes coletados, os quais foram preservados em etanol 96% para seu posterior processamento no laboratório de Biologia e Genética de Peixes da Universidade Estadual Paulista.

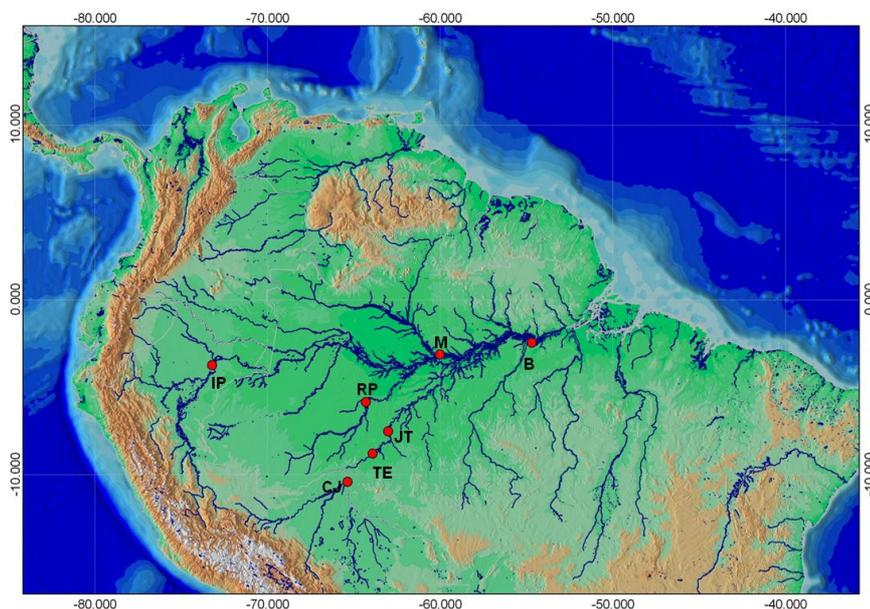


Figura 1 Localização dos pontos de coleta das amostras de *Brachyplatystoma platynemum*. IP=Iquitos, Perú; RP=Rio Purus, AM; CJ=Montante da cachoeira, Rio Madeira, AM; TE=Cachoeira de Teotônio, rio Madeira, AM; JT=Jusante da cachoeira, rio Madeira, AM; M=Manaus, AM; B=Belém, PA.

Tabela 1. Localidades de coleta de *Brachyplatystoma platynemum* na Amazônia brasileira e peruana. N = número de indivíduos amostrados, N_{RC} número de indivíduos sequenciados.

Localidade	Sigla	Bacia	N	N _{RC}
Iquitos	IP	Amazonas	30	27
Manaus	M	Amazonas	30	32
Rio Purus	RP	Purus	31	31
Montante da Cachoeira	CJ	Madeira	22	22
Cachoeira	TE	Madeira	40	35
Jusante a Cachoeira	JT	Madeira	34	34
Belém	B	Amazonas	23	35

Região Controle

Análise da diversidade molecular e genética de *Brachyplatystoma platynemum*

Foram obtidas sequências para 216 indivíduos de *Brachyplatystoma platynemum* para sete localidades de estudo. O tamanho do fragmento analisado foi de 663 pb, com uma composição nucleotídica média para o total de sequências analisadas de 31,7% para adenina, 21,8% para citosina, 15,5% para guanina e 31,0% para timina. O número médio de diferenças nucleotídicas par a par por sítio foi de $PI=0,01490\pm0,00025$.

Foi observado um total de 66 haplótipos registrando uma diversidade haplótípica total $Hd= 0,931\pm0,00010$ para os 216 indivíduos analisados. Em relação aos sítios, 618 foram invariáveis, 45 sítios foram polimórficos e 37 sítios foram informativos para parcimônia. Um total de 48 mutações foram registradas com valor médio para as transições de $25\pm3,266$ e para as transversões de $1\pm1,574$ entre as localidades

amostradas, não foi observada saturação entre as substituições nucleotídicas com a distancia genética.

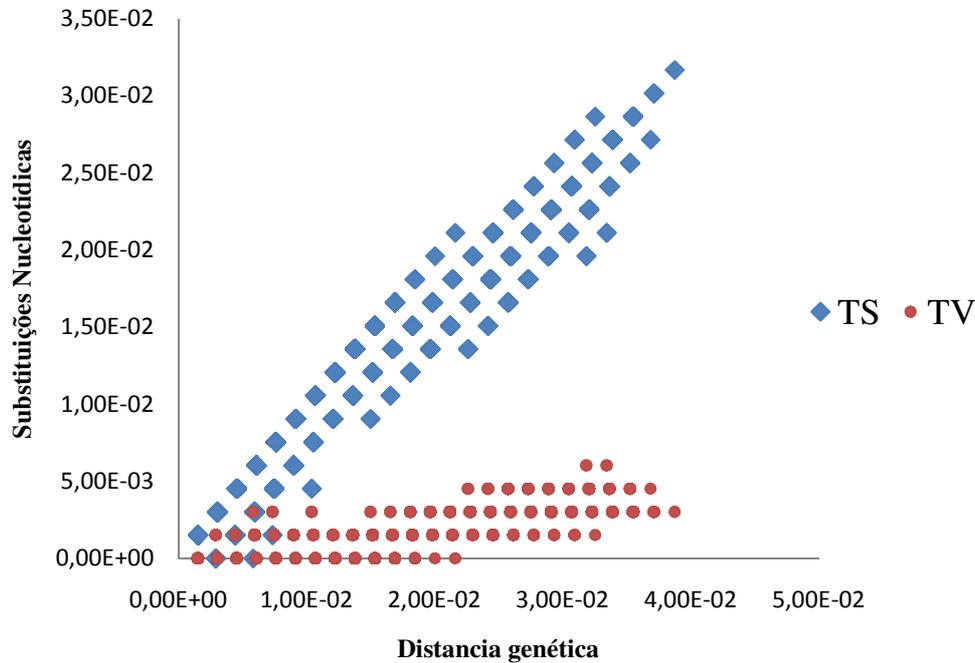


Figura 2. Grafico de substituições nucleotídicas versus a distancia genética para a região controle de *Brachyplatystoma platynemum*.

O número total de haplótipos entre as localidades variou de H=11 (Montante da Cachoeira, CJ) a H=18 (Iquitos, IP), com frequências absolutas para cada haplótipo de um a 21 (H51).

Do total de haplótipos registrados, 47 correspondem a haplótipos únicos distribuídos diferencialmente entre todas as localidades e 19 foram haplótipos compartilhados. Os valores de diversidade haplotípica variaram entre $H_d=0,6353$ a $H_d=0,9153$, registrada para a localidade de Manaus. O maior número de haplótipos únicos foi registrado na calha principal do sistema Amazonas-Solimões para a localidade de Iquitos ($H_U=13$, $N=27$), a qual também apresentou os maiores números de sítios polimórficos ($S=30$) e de total de mutações ($ETA=31$). Dos tributários amostrados, as localidades do rio Madeira apresentaram os menores valores de diversidade haplotípica ($H_d= 0,6353$) e de haplótipos únicos ($CJ=3$, $TE=4$, $JT=4$) representando em conjunto cerca de 22,92% dos haplótipos únicos observados. Para o rio Purus ($N=31$) foi registrado um número total de haplótipos

H=14, com um percentual de haplótipos únicos de 17,02% (HU=8). Para esta localidade a diversidade haplotípica foi de Hd=0,892, com 17 sítios polimórficos e número total de mutações de ETA=17.

Entre os haplótipos compartilhados, o haplótipo H5 foi registrado em indivíduos de todas as localidades da calha (B, RP, M e IP), além da localidade da Jusante do rio Madeira, com frequências relativas entre 0,081 para JT e 0,257 para B. O haplótipo H50, o qual apresentou a maior frequência, foi compartilhado unicamente entre as localidades do rio Madeira, apresentando frequências entre 0,273 para a Montante (CJ), 0,324 para a Jusante (JT) e 0,6 para a Cachoeira (TE).

Tabela 5. Polimorfismos de DNA da região controle (D-loop) para os indivíduos de *Brachyplatystoma platynemum* para as localidades amostradas. N= número amostral; H=número de haplótipos; HU= haplótipos únicos; S= sítios polimórficos; ETA= número de mutações; HD= diversidade haplotípica; PI= diversidade nucleotídica

População	N	H	HU	%HU	S	ETA	HD	PI	D de Tajima	Fs de Fu
Manaus (M)	32	16	5	10,63	20	21	0,9153	0,00748	0,7038	- 1,7858
Iquitos-Perú (IP)	27	18	13	27,66	30	31	0,8946	0,01003	0,3121	- 3,4701
Rio Purus (RP)	31	14	8	17,02	24	17	0,8925	0,00801	1,3132	- 0,1678
Montante da Cachoeira (CJ)	22	12	4	8,51	26	26	0,9004	0,00782	0,1137	- 0,5873
Cachoeira (TE)	35	11	4	8,51	22	22	0,6353	0,00482	- 1,4461	- 1,3388
Jusante da Cachoeira (JT)	34	12	3	6,38	27	28	0,8592	0,00846	0,0204	0,7353
Belém(B)	35	17	10	21,28	21	21	0,9059	0,00679	0,6249	- 1,8471

O teste D de Tajima para todas as populações amostradas indicou que as amostras das localidades estudadas estão em equilíbrio em relação ao DNA mitocondrial, o qual é corroborado pelos valores obtidos para o Fs de Fu indicando também que não há evidência de expansão populacional, pois os valores de *P* não foram significativos.

Estrutura populacional inferida pela análise de variância (AMOVA) para a região controle

A estrutura genética das populações de *Brachyplatystoma platynemum* foi analisada usando uma aproximação no programa Arlequin (AMOVA, Excoffier *et al.*, 1992), essencialmente similar a outras aproximações baseadas em análises de variância de frequências gênicas.

Inicialmente foi realizada uma análise entre as sete localidades, como um único grupo hierárquico, visando determinar os níveis de diferenciação genética entre todas as localidades amostradas. Os resultados obtidos indicam que existe uma diferenciação intermediária, segundo Wright (1978) com valor para $\Phi_{ST} = 0,09775$, com maior variabilidade genética dentro (90,23%) que entre as localidades (9,77%) (Tabela 6).

Tabela 6. Análise de variância para as sete localidades amostradas de *Brachyplatystoma platynemum*

Fonte da variação	Grau de Liberdade	Soma dos quadrados	Componentes de variação	Porcentagem de variação
Entre localidades	6	11.071	0,04615 Va	9,77
Dentro das localidades	209	89,035	0,42601 Vb	90,23
Total	215	100,106	0,47216	

Índice de Fixação $F_{ST} = 0,09775$

Dado que se têm amostras da calha do rio Amazonas e de dois afluentes da sua margem direita, foram feitas análises de variância realizando diferentes agrupamentos entre as localidades amostradas. O primeiro agrupamento foi realizado para dois grupos, o primeiro formado pelas localidades da calha e o segundo grupo pelos tributários que correspondem aos rios Purus Madeira. Os resultados obtidos para este agrupamento mostram uma mudança na porcentagem de variação em relação à análise anterior, indicando uma porcentagem de variação entre as localidades menor que 5,91% (Tabela 7).

Tabela 7. Análise de variância molecular para os dois grupos formados. Calha e tributários na área de estudo.

Fonte da variação	Grau de Liberdade	Soma dos quadrados	Componentes de variação	Porcentagem de variação
Entre localidades	1	4,401	0,02862 Va	5,91
Entre localidades dentro dos grupos	5	6,670	0,02968 Vb	6,13
Dentro das localidades	209	89,035	0,42601 Vc	87,96
Total	215	100,106	0,48431	

Índices de Fixação

$F_{SC}=0,06514$

$F_{ST}=0,12038$

$F_{CT}=0,05909$

Quando foi realizada a análise de forma independente para cada um dos dois tributários, os resultados mostraram um padrão diferente. A análise de variância entre o rio Purus e as localidades da calha indicam que a variação entre os grupos é de 0,37%, enquanto dentro dos grupos é de 98,04%. Em comparação, a análise entre o rio Madeira e as localidades da calha, mostram que, apesar de a maior parte da variação continuar representada dentro das localidades (85,32%), existe uma variação importante entre os grupos, correspondente à 12,65%, superior à encontrada entre o rio Purus e as demais localidades (Tabela 8).

Tabela 8. Análise de variância molecular para três grupos conformados as localidades amostradas no rio Madeira (CJ, TE e JT), as localidades da calha (IP, B, M) e o rio Purus (RP)

Fonte da variação	Grau de Liberdade	Soma dos quadrados	Componentes de variação	Porcentagem de variação
Entre localidades	1	6,534	0,06265 Va	12,65
Entre localidades dentro dos grupos	4	2,915	0,01005 Vb	2,03
Dentro das localidades	179	75,648	0,42262 Vc	85,32
Total	184	85,097	0,49532	

Índices de Fixação

$F_{SC}=0,02324$

$F_{ST}=0,14678$

$F_{CT}=0,12649$

Estes resultados mostram que existe uma diferença genética importante entre as localidades amostradas no rio Madeira e as demais localidades analisadas. Os resultados anteriores são corroborados pelas estimativas par a par para o F_{ST} , após correção de Bonferroni, onde os valores de P foram significativos entre as localidades do rio Madeira e as demais (Tabela 9).

Tabela 9. Valores de F_{ST} par a par entre as localidades. Valor significativo de $P<0,002$.

	Manaus	Iquitos	Rio Purus	Montante	Cachoeira	Jusante	Belém
Manaus		0,02742	0,01029	0,08410	0,22645	0,09372	0,00792
Iquitos			0,01982	0,10254	0,23924	0,09586	0,01416
Rio Purus				0,09970	0,23840	0,10215	0,02824
Montante					0,06665	-	0,09321
Cachoeira						0,00129	
Jusante							0,03366
Belém							

Tabela 10. Matriz do número de migrantes entre as localidades amostradas segundo Slatkin (1995) onde $M=N$ para dados haplóides.

	Manaus	Iquitos	Rio Purus	Montante	Cachoeira	Jusante	Belém
Manaus		17,7343	48,1055	5,4455	1,7080	4,8350	62.6338
Iquitos			24,7300	4,37593	1,5899	4,7157	34,8025
Rio Purus				4,5148	1,5973	4,3948	17,2054
Montante					7,0016	inf	4,8644
Cachoeira						14,3557	1,6794
Jusante							4,6585
Belém							

Os valores registrados para o número de migrantes variou de 1,6794 a 48,1055, apresentando também valores infinitos entre duas localidades (Tabela 10). Valores baixos de Nm foram registrados principalmente entre as localidades amostradas no rio Madeira e as localidades da calha do rio Amazonas. Os maiores valores foram registrados entre as localidades da calha, o que pode ser indicativo de maior fluxo gênico entre estas localidades (Tabela 10).

A rede para os 66 haplótipos registrados mostra a formação de dois grupos, um grupo formado pelas localidades amostradas no rio Madeira e outro grupo formado pelas localidades da calha e o rio Purus. Um aspecto importante corresponde à conexão, entre os dois grupos formados, por haplótipos únicos da localidade de Iquitos (H43, H49 e H45), sendo destacado por uma listra em vermelho e entre aspas o número de mutações registradas.

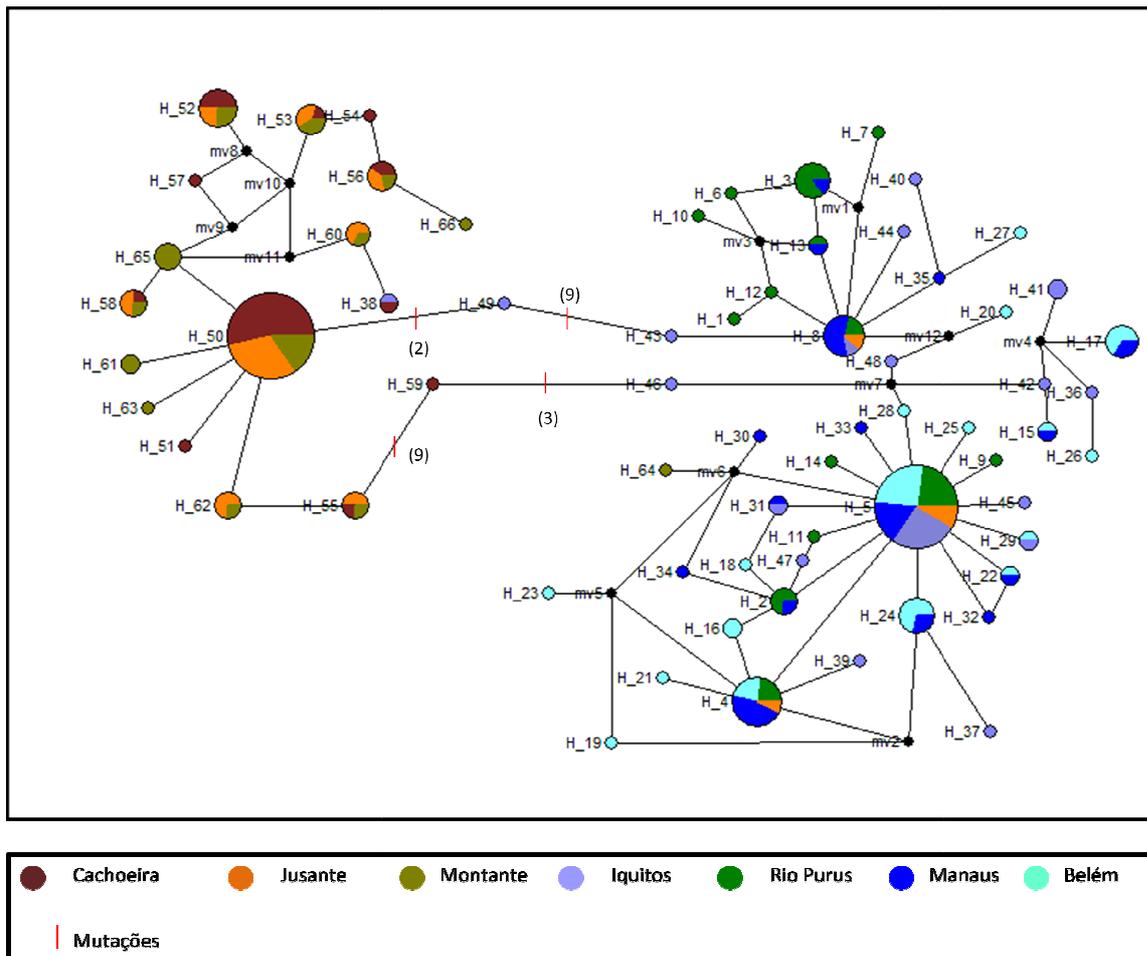


Figura 3. Rede de haplótipos para *Brachyplatystoma platynemum* obtida de seqüências parciais de DNA da região controle (D-loop). Os traços ligando os haplótipos representam uma única mutação, sendo as exceções assinaladas (|).

Os resultados obtidos para o teste de Mantel, mostram uma débil relação entre a distância geográfica e os valores para o índice de fixação ($R^2=0,0539$) com valor de $P=0,06$, não significativo, indicando que isolamento por distancia é improvável de ter gerado o padrão de estrutura observado. As análises de divergência indicam que os dois filogrupos (Calha e rio Maderia) divergiram aproximadamente 1,5 Ma. A caracterização da expansão populacional com a análise de distribuição Mismatch, mostra que os filogrupos apresentam uma distribuição multimodal, característica de populações em equilíbrio demográfico (Schneider *et al.*, 2000), no entanto os valores estimados de $F_s=-25,2422$ com $P<0,05$ para o filogrupo da Calha são indicativos de recente expansão populacional, entretanto para o filogrupo do rio Madeira os valores

($F_s = -3,52218$, $P = 0,147$) sustentam a distribuição registrada, provavelmente esta população passa por um momento de estabilidade em seu tamanho populacional.

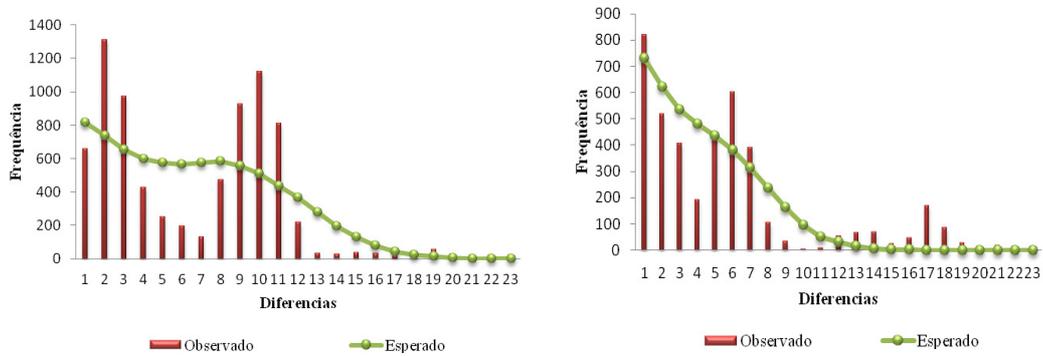


Figura 4. Distribucion Mismatch usando a informação da região controle para os filogrupos encontrados. O primeiro gráfico corresponde ao filogrupos da Calha e o segundo ao filogrupo do rio Madeira.

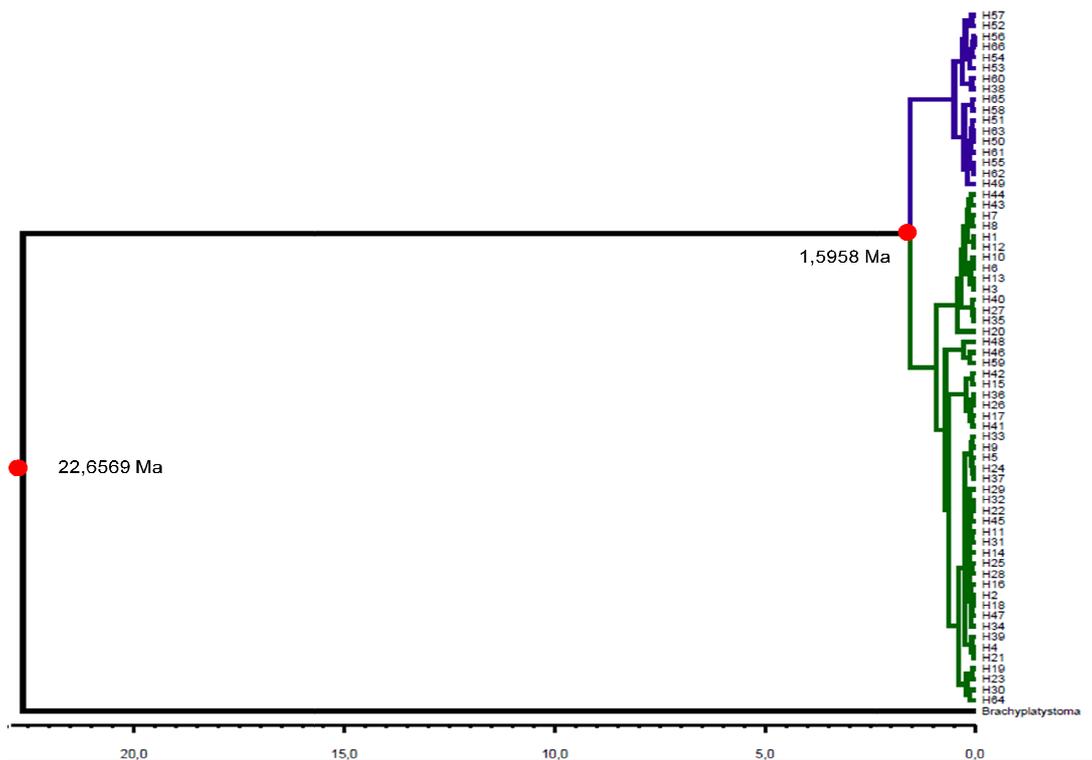


Figura 5. Tempo de divergência dos filogrupos estimado no BEAST, usando a região controle do mtDNA. Tempo em milhões de anos (Ma) antes do presente. Calha em verde e rio Madeira em azul.

Foi estimado o tempo de expansão para os filogrupos Calha e rio Madeira baseados no parâmetro demográfico tau (τ), entre 400.000 e 250.000 anos, respectivamente. Observa-se que o tempo de expansão para o filogrupo do rio Madeira é relativamente recente, razão pela qual, provavelmente, a distribuição Mismatch não teve resolução.

Discussão

A identificação dos padrões de distribuição da variação genética dentro e entre populações é referida como a estrutura genética populacional das espécies. Informação desta estrutura é um parâmetro fundamental na biologia evolutiva e 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).

Análises genéticas populacionais e filogeográficas usando marcadores moleculares constituem uma poderosa ferramenta e 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).

Considerando a grande diversidade biológica registrada na região amazônica e a importância do recurso íctico nesta área, têm levado ao incremento nos estudos da variabilidade genética de diversas espécies de peixes amazônicos, principalmente aquelas que constituem uma unidade de exploração comercial. Os grandes bagres amazônicos do gênero *Brachyplatystoma* são um importante recurso pesqueiro e biologicamente são reconhecidos por sua capacidade migratória (embora o padrão não tenha sido conhecido para todas as espécies) além de sua ampla distribuição no sistema a Amazonas-Solimões.

Brachyplatystoma platynemum representa uma das espécies menos estudadas do gênero e a pesar de representar um recurso de pequeno valor comercial, tem sido observado nos últimos anos um aumento em sua captura como consequência do decréscimo de espécies com alto valor comercial como *Brachyplatystoma filamentosum* (Petrere *et al.*, 2004). Assim é de extrema importância o conhecimento da variabilidade genética desta espécie no desenvolvimento de medidas de manejo e conservação.

Análises realizadas neste estudo para 216 indivíduos de *B. platynemum* usando 663pb da região controle mostram um padrão similar nos valores estimados para os índices de polimorfismo e distribuição espacial da diversidade genética, ao descrito em trabalhos realizados para outras espécies do gênero, como *Brachyplatystoma vaillanti* (Formiga-Aquino, 2003), *Brachyplatystoma capapretum* e *Brachyplatystoma filamentosum* (Huerdo, 2009) e *Brachyplatystoma rousseauxii* (Batista, 2010). Dos 66 haplótipos registrados para *B. platynemum* 47 corresponderam a haplótipos únicos, registrados em maior proporção para algumas localidades da calha (Iquitos 27,66% e Belém 21,28%) em tanto para os tributários amostrados, rio Purus (RP) e as localidades amostradas no rio Madeira foi achado um número menor de haplótipos; padrão similar na distribuição dos haplótipos foi registrado para *B. rousseauxii* (Batista, 2010) onde os tributários da margem direita (rio Madeira, rio Purus e rio Juruá) apresentaram um número reduzido de haplótipos únicos. Para *B. platynemum* o maior número de haplótipos foi registrado nas localidades de Iquitos (IP) e Belém (B) padrão que foi observado para *B. vaillanti* nas localidades de Belém, Manaus e Tabatinga (Rodrigues, 2009), em comparação para *B. rousseauxii* a localidade de Belém, apresentou os maiores valores para a maioria dos índices de diversidade molecular (Batista, 2010). O padrão de alta diversidade haplotípica registrado para as espécies de bagres na região do estuário, esta relacionada segundo Batista e Alves-Gomez (2006), com a função do estuário como área de criação, que congrega um número representativo de indivíduos nascidos nas cabeceiras dos diferentes tributários.

No entanto a presença de um número importante de haplótipos na região oeste da bacia amazônica, como foi observado para *B. platynemum* (localidade de Iquitos, IP) entre outras espécies do gênero, pode estar correlacionado com o processo de migração descrito para *B. rousseauxii*, onde indivíduos adultos podem não retornar ao estuário em um próximo ciclo migratório e sim à região entre o alto Amazonas e o baixo Solimões, área preferencial de alimentação (Barthem e Goulding, 1997; Barthem e Goulding, 2007; Leite *et al.*, 2007), mantendo uma alta diversidade de haplótipos nesta zona.

Análises usando a região controle foram realizadas e amostraram padrões similares na distribuição da variabilidade genética para algumas espécies de peixes como *Nannostomus eques* (Terêncio, 2009), *Hypopygus lepturus* (Schmitt, 2005), e para algumas espécies migradoras de prochilodontídeos como *Prochilodus nigricans*

(Machado, 2009) e *Semaprochilodus insignis* (Batalha, 2009), para espécies do gênero *Symphysodon* (Farias e Hrbek, 2008) e o gênero *Fluviophylax* (Souza, 2008).

Evidências de estruturação genética tinham sido observadas para duas espécies do gênero *Brachyplatystoma* na bacia amazônica, usando a região controle do DNA mitocondrial. Huergo em 2009 identificou que *B. filamentosum* apresenta estruturação genética associada principalmente ao tipo de água (branca, clara e preta), posteriormente foi observada uma baixa estruturação para *B. rousseauxii* entre o rio Madeira e rio Japurá (Batista, 2010) com a região controle, entretanto para *B. vaillanti* (Formiga-Aquino, 2004) usando locus microssatélites (Rodrigues, 2009) não foi observada estrutura genética, sendo definido o estado de panmixia para estas duas espécies constituindo uma única população no EAS. Padrões de estrutura genética foram identificados para algumas espécies de peixes amazônicos como o curimatã (*Prochilodus nigricans*) envolvendo localidades dos rios Tapajós, Xingu e alto Madeira (Machado, 2009) e para o jaraqui (*Semaprochilodus insignis*) foi observada estruturação entre a bacia amazônica e do Orinoco, no entanto ainda as espécies compreendem um único estoque na região amazônica (Batalha, 2009); um estudo realizado para outro bagre distribuído na bacia do Paraná *Pseudoplatystoma corruscans*, mostraram estrutura genética relacionada a comportamento de *homing* (Pereira *et al.*, 2010).

Os resultados aqui obtidos para *B. platynemum* mostram uma clara estruturação genética entre as localidades da calha e o rio Madeira, padrão que não é uma exceção à regra na região tropical (Lundberg, 1998, Saint-Paul, 2000). No entanto não foi observada uma redução da variabilidade genética no sentido leste oeste que possa ser associado a um comportamento de *homing*, como foi sugerido por Batista e Gomez (2006) para *B. rousseauxii*, onde a região do estuário foi identificada como uma área de agrupamento de diferentes pools gênicos com alta diversidade genética, em tanto os tributários de águas brancas apresentaram uma diminuição na diversidade genética, comportando se como zonas de segregação reprodutiva, devido a que indivíduos adultos migrantes viajam à cabeceira dos rios, regressando ao lugar de nascimento contribuindo na formação de agrupamentos monofiléticos nos diferentes tributários.

Embora no presente estudo uma alta variabilidade genética tenha sido identificada para a localidade de Belém, zona do estuário, também foram observados níveis importantes de variabilidade genética nas localidades de Iquitos e no rio Purus,

um dos dois tributários amostrados, que apresentou haplótipos compartilhados com as localidades amostradas na calha. Entretanto, para as localidades amostradas no rio Madeira, foi registrada a menor variabilidade genética e em consequência valores altos para o índice de fixação foram observados, principalmente entre a localidade da Cachoeira de Teotônio e as localidades da calha, no entanto entre as três localidades amostradas no rio Madeira não foi observada estrutura genética que possa ser associada ao isolamento físico das populações como consequência da cachoeira.

Estes resultados não mostram padrões claros de segregação genética entre tributários e calha, limitando a caracterização do comportamento de *homing* para *B platynemum*, mas evidenciam a formação de duas unidades populacionais, a primeira conformada pelas localidades da calha e o rio Purus, e uma segunda unidade conformada pelas localidades amostradas no rio Madeira, agrupamento que é sustentado pelas análises filogenéticas baseadas nas relações dos haplótipos para os dois marcadores mitocôndrias. De acordo com a calibração do relógio molecular foi estimado um tempo de divergência entre as populações de aproximadamente 1,5 milhões de anos (Ma) para a região controle.

De acordo com o tempo divergência estimado neste estudo é provável que a hipótese de refúgios do Pleistoceno possa explicar a separação das populações de *Brachyplatystoma platynemum*. A hipótese de refúgios baseada nas mudanças climáticas como força diretora de processos de divergência (Pickles *et al.*, 2010), prediz que as mudanças climáticas acontecidas no Pleistoceno (1,8 Ma a 11,000 anos) limitaram a quantidade de habitats disponíveis para plantas e animais durante as eras glaciais, pela contração da floresta tropical (Haffer 1969; Prance 1982; Whitemore e Prance 1987), no entanto estas previsões são baseadas na biota terrestre, devido ao que as mudanças ambientais são menos evidentes nos ecossistemas aquáticos (Hubert, 2007). Na área de estudo, foram identificados dos refúgios do Pleistoceno, o rio Beni, localizado na planície perto do flanco andino (cabeceira do rio Madre de Dios), e o rio Aripuanã no escudo brasileiro (rio Guaporé, tributário do rio Madeira), que tem sido de grande importância na colonização e diversificação de espécies no alto Amazonas (Hubert *et al.*, 2007). Estudos filogeográficos realizados recentemente indicam que o alto Amazonas foi colonizado durante os passados 4 Ma e unicamente durante o último milhão de anos foram colonizados alguns dos tributários (Aleixo 2004; Hubert *et al.*, in press), enquanto a topologia atual do rio Madeira foi estabelecida

durante os passados 2 Ma (Hubert *et al.*, 2007). Baseados na teoria dos refúgios e nos dados de divergência obtidos para os filogrupos de *B. platynemum* (1,5-1,0 Ma) assim como no padrão de estrutura genética observado entre o rio Madeira, é provável que mudanças climáticas tivessem isolado populações desta espécie no alto Amazonas, que provavelmente habitaram áreas de refúgio, sofrendo uma forte redução populacional, posteriormente quando as pressões climáticas foram reduzidas as populações de *B. platynemum* se expandiram e colonizaram o rio Madeira.

Padrões de estrutura genética e divergência populacional, associados a eventos climáticos no Pleistoceno foram identificados para *Serrasalmus rhombeus*, onde populações desta espécie se estabeleceram recentemente (1 Ma) no alto rio Madeira, sugerindo que modernos linhagens de mtDNA provieram da área do refúgio do rio Aripuana aproximadamente durante o último milhão de anos (Hubert *et al.* 2007), padrões similares foram observados para tucunaré (*Cichla*) (Renno *et al.*, 2006) e *Leporinus* na Guiana Francesa (Renno *et al.*, 1990, 1991).

Segundo Aleixo 2004, a divergência de espécies e populações em áreas de refúgio esta correlacionada com processos de expansão populacional posteriores à última grande glaciação (10,000-80,000 anos), de acordo com os resultados obtidos das análises demográficas (distribuição Mismatch e tempo de expansão populacional), não foi observada tendências de expansão populacional dos filogrupos, no entanto as estimativas baseadas no parâmetro populacional τ (τ) os tempos estimados de expansão não corresponderam com eventos importantes de mudanças climáticas.

Estudos filogenéticos têm evidenciado que o estado atual da diversificação pré-data o Pleistoceno, pelo que a hipótese do refúgio tem sido refutada como uma explicação potencial da origem da diversidade de peixes Sul Americanos (Weitzman e Weitzman 1982; Montoya-Burgos 2003), no entanto, esta teoria pode ter um papel importante na origem de altos níveis de diversidade local e diversificação das espécies, devido a que áreas de refúgio têm provavelmente, minimizando o impacto dos câmbios estocásticos na disponibilidade do nicho diminuindo a extinção de espécies (Hubert, 2007).

Outra hipótese, além da teoria dos refúgios, que pode contribuir no entendimento da divergência de peixes neotropicais e provavelmente da divergência populacional alopátrica, corresponde à hipótese hidrogeológica relacionada com a estruturação atual da bacia amazônica. Segundo Montoya-Burgos (2003) a divisão das drenagens, a

mudança no curso dos rios e as repetidas incursões e regressões marinhas podem ter produzido muitos eventos vicariantes, promovendo a riqueza biótica atual. Segundo Lundberg (1998) a diversidade de peixes de água doce pode ser o resultado de mudanças paleohidrológicas que promoveram dispersão seguida por divergência vicariante. Estudos paleontológicos e biogeográficos sugeriram que a diversificação de peixes até o nível de espécies modernas antecedeu o Pleistoceno (Weitzman e Weitzman 1982; Lundberg 1997), no entanto tempos de divergência menores entre 0,8-2 Ma tem sido descritos entre populações de peixes das bacias do Amazonas e Paraná-Paraguai, para *Pseudoplatystoma* (Torricco *et al.*, 2009). Neste contexto é provável que eventos paleohidrológicos possam explicar divergências ao nível populacional, principalmente por eventos de capturas de cabeceira. No entanto os resultados obtidos coincidem com o tempo de estabelecimento da topologia atual do rio Madeira (2 Ma), tempo durante o qual múltiplos eventos de captura de cabeceira e desconexão entre o alto rio Madeira, o rio Ucayali e o rio Madre de Dios podem ter acontecido, conduzindo a dispersão e posterior isolamento das populações de peixes. Por outro lado, não explicam com total claridade a divergência entre as populações da Calha e o rio Madeira, é pouco provável que a divergência fosse modelada por um evento de captura de cabeceira e posterior desconexão, devido a que indivíduos da espécie *Brachyplatystoma platynemum* não estão associados ao ambiente das áreas altas dos rios, mas não pode ser descartada a hipótese de que um evento deste tipo, tenha contribuído na diversificação das populações de *B. platynemum*.

Ao nível paleogeográfico não se tem uma hipótese clara que possa explicar o padrão encontrado. No entanto, para a região Amazônica se tem sugerido que processos geológicos como o surgimento dos Andes, são responsáveis pela separação e divergência de populações por eventos vicariantes (Haffer, 1997). Uma hipótese particular está relacionada com o levantamento de arcos geológicos na Amazônia ocidental, responsável da alteração do regime de fluxo, separando linhagens de cada lado dos arcos, resultando em divergência vicariante (Hubert e Renno, 2006). Esta hipótese tem sido questionada por Rossetti *et al.* (2005) e Wesselingh e Salo (2006), que sugerem que estas estruturas são extremamente antigas e devido à grande concentração de depósitos sedimentários, a elevação destas não pode ser responsável pelo padrão filogeográfico da maioria dos taxa. Estudos recentes (Roddaz *et al.*, 2006; Espurt *et al.*, 2007; Regard *et al.*, 2009; Roddaz *et al.*, 2010) tem identificado que o Arco

de Fitzcarraldo é uma estrutura geológica recente que data de não antes do Plioceno, e que tem uma importante influencia na formação dos rio na Amazônia ocidental (Toivonen *et al.*, 2007). Este arco de forma uma drenagem principal dividida (Church, 1901; Dumont, 1996; Espurt *et al.*, 2007; Regard *et al.*, 2009) entre a sub-bacia do Ucayali, a sub-bacia do Acre e a sub-bacia do Madre de Dios, pelo que linhagens irmãs podem ser registrados de cada lado do arco geológico, datando de eventos recentes no Plioceno. A pesar de existirem evidências de divergência genética como conseqüências destes eventos para outras espécies animais como no caso da lontra *Ptenoura brasiliensis* (Pickles *et al.*, 2010) com uma divergência das linhagens entre o alto Amazonas e o alto rio Madeira estimada de 1,24 Ma, tempo similar ao estimado neste estudo, esta hipótese não explica o padrão de divergência entre as populações de *B. platynemum* devido a que como foi exposto anteriormente é pouco provável que populações desta espécie tenham colonizado as áreas de cabeceira e tenham sido isoladas por processos vicariantes com surgimento do arco de Fitzcarraldo, levando à divergência das populações. Entretanto um aspecto importante observado nas redes de haplótipos corresponde à conexão dos dois filogrupos por haplótipos registrados na região de Iquitos, indicando que provavelmente as populações apresentaram uma conexão histórica.

De acordo com as hipóteses analisadas, a divergência das populações de *B. platynemum* provavelmente tem sido modelada, pelas mudanças ambientais durante o pleistoceno no passado, mas o interessante destes resultados é que a estrutura genética tem sido mantida até hoje e o padrão de variabilidade genética observada não sustenta a hipóteses de *homing*. Neste contexto como explicar que a população da Calha e a população do rio Madeira não se misturaram neste tempo? Se a espécie *B. platynemum* não apresenta um comportamento de *homing*, como explicar a redução do fluxo gênico entre as localidades da calha e o rio Madeira, entendendo que os indivíduos migrantes fazem uma escolha aleatória dos tributários para reproduzir se e desta forma tem a mesma chance de entrar em qualquer um dos tributários?

O rio Madeira é provavelmente um dos tributários geograficamente mais complexos da bacia amazônica (Torrente-Vilara, 2011) devido a sua complexidade geomorfológica apresentando uma série de aproximadamente 16 rápidos ou corredeiras, que separam a sub-bacia Boliviana da bacia principal do Amazonas (Goulding *et al.*, 2003) e que representam barreiras na distribuição de peixes e

vertebrados aquáticos (Goulding, 1979) sendo considerado como área de segregação de espécies (Patton *et al.*, 200; Hayes e Sewlal, 2004). Este rio tem sido reconhecido por apresentar uma grande diversidade de habitat aquáticos devido à influencia simultânea do escudo Brasileiro, os sedimentos de planície do terciário e dos Andes (Guyot,1993) assim os tributários do Madeira variam de acordo com a turbidez e conteúdo de nutrientes, sendo considerados de águas brancas, claras o pretas (Sioli, 1984). A heterogeneidade do habitat gerada pelos ciclos anuais de precipitação na bacia do rio Madeira tem sido identificada como um fator fundamental na estrutura genética das populações aquáticas (Hubert *et al.*, 2007).

De acordo com a complexidade estrutural e ecológica presente no rio Madeira e com os resultados obtidos de divergência genética entre as duas linhagens (filogrupos) de mtDNA de *B platynemum* a hipótese a nível biológico e ecológico que pode contribuir na compreensão da permanência da estrutura populacional é fundamentada na migração reprodutiva restrita das populações de *B platynemum* na bacia do rio Madeira. É provável que após a separação das populações pelas mudanças climáticas durante o Pleistoceno, estas foram isoladas sofrendo efeitos de gargalho que diminuíram o tamanho populacional, a ação da deriva posso causar um aumento nas diferencias genéticas entre populações, gerando o isolamento genético, onde os haplótipos ou clados que surgiram após a fragmentação, mas no mesmo isolado, irão mostrar distribuições espaciais restritas (Templeton, 2011). Eventos de expansão populacional, permitiram expandir se na bacia do Madeira, esta população adapto se às condições ambientais e o baixo fluxo gênico com as localidades da calha, facilitou a fixação de alelos. Processos de diferenciação fenotípica entre a população do rio Madeira e a população da Calha não podem ser descartados, mas requerem ser confirmados. Além pode existir acasalamento preferencial entre os indivíduos da população residente no rio Madeira, baseado na evidencia de não isolamento por distancia entre as populações, no entanto as estimativas para o fluxo gênico foram baixas, o que indica que indivíduos distribuídos na calha provavelmente entrem no rio Madeira mais não se reproduzem com a população residente.

Embora não se tenham estudos específicos dos padrões reprodutivos para *B platynemum* é provável que a população residente desta espécie no rio Madeira, siga o padrão de migração reprodutiva descrito por Barthem e Goulding (1997), onde indivíduos dos tributários migram rio abaixo para desovar nas águas do canal principal

do rio Madeira, e posteriormente as larvas e ovos são levados à áreas de várzea dispersando se na floresta inundada onde permanecem alimentando se por cerca de 4 a 5 meses. A população do rio Madeira tem uma área de alimentação própria, pelo que indivíduos provavelmente realizam cortas migrações reprodutivas dentro desta bacia, enquanto à população da calha provavelmente dispõe de diferentes áreas de alimentação ao extenso da bacia amazônica que não só incluem o estuário mas também à região entre o alto Amazonas e baixo Solimões (Barthem e Goulding, 1997; Barthem e Goulding, 2007; Leite *et al.*, 2007) o que pode explicar a alta variabilidade genética para as localidades de Iquitos e rio Purus.

De acordo com a informação obtida, a população do rio Madeira constitui uma população residente, que colonizou o rio Madeira há aproximadamente 1Ma e que provavelmente se adaptou à condições ambientais da bacia, e cujo padrão de migração provavelmente esta limitado à bacia do rio Madeira. A estrutura genética e divergência populacional de *B platynemum* na área de estudo, pode ter sido modelada por diversos eventos e mantida por processos adaptativos das populações a ambientes particulares, que tem gerado mecanismo para a regulação do fluxo gênico entre as populações identificadas.

Implicações para conservação e manejo das populações de *Brachyplatystoma platynemum*

A avaliação da biodiversidade dentro e entre áreas é fundamental para identificar e priorizar áreas de controle, manejo e proteção (Moritz e Faith, 1998). O significado da variação genética assim dos padrões e mecanismos responsáveis de esta variação tem sido reconhecido de fundamental importância na avaliação da biodiversidade. De fato a proteção da diversidade genética tem sido incorporada em numerosas políticas e convênios internacionais (Moritz *et al.* 1998; Calcagnotto *et al.* 2000).

Para o planejamento e conservação de uma espécie é importante a identificação das linhagens com significado evolutivo para manter ao máximo a diversidade genética e incorporar informação relacionada com os processos históricos populacionais (Moritz, 1998). Análises filogeográficas constituem uma ferramenta importante na biologia da conservação; a idéia de propor políticas de conservação a nível infra-específicos constitui uma forma de identificar unidades de manejo que refletem a importância

evolutiva das linhagens dentro das espécies, e com esta informação elaborar programas efetivos para a conservação de espécies em risco (Awise e Hamrick, 1996).

Definir uma área de conservação para *Brachyplatystoma platyneum* é uma tarefa difícil, apesar de que a informação obtida neste estudo constitua um ponto de partida, se requer de informação adicional a nível biológico, ecológico, comportamental e de monitoramento pesqueiro; aspetos que são desconhecidos até o momento. No entanto, considerando a estrutura genética identificada para *Brachyplatystoma platyneum* na área de estudo e a redução da variabilidade genética na região do rio Madeira, se considera de grande importância a implementação de medidas de conservação e recuperação de habitat nesta zona, principalmente das áreas de várzea. O rio Madeira é um dos principais tributários de águas brancas do Amazonas, a geomorfologia diferencial de sua bacia, apresentando uma serie de rápidos e a presença de tributários de diferentes tipos de águas são indicativos de uma alta heterogeneidade de habitats que abriga uma rica biodiversidade, importante na manutenção da variabilidade genética não só da espécie em estudo mais também do resto de espécies cujo ciclo de vida esta intimamente ligada aos canais principais dos rios (Santos e Ferreira 1999). No entanto a construção de barragens nesta bacia pode ter fortes impactos na biota aquática e terrestre, devido principalmente à modificação dos regimes de fluxo, a perda de habitats, à mudança dos parâmetros físicos e químicos da água (Vannote *et al.*, 1980; Junk *et al.*, 1989) e principalmente ao bloqueio das rotas de migração de diversas espécies de peixes (Barthem *et al.*, 1991; MacAllister, 2001). De acordo com os resultados neste estudo a população residente de *B. platyneum* na bacia do rio Madeira, pode ser fortemente afetada pela fragmentação do habitat e a interrupção do processo de migração como conseqüências das barragens, gerando fortes impactos na sobrevivência da população e na manutenção da variabilidade genética das populações, devido às mudanças nos padrões de reprodução e do fluxo gênico.

De acordo com esta informação se sugere uma avaliação profunda do estado da população desta espécie na bacia do rio Madeira, assim como da efetividade do sistema de transposição de peixes construído pelas empresas responsáveis do funcionamento das barragens, para garantir a subsistência da população do rio Madeira, além de dirigir esforços na conservação das áreas de alimentação na calha principal (EAS) devido a que esta constitui o hábitat preferencial não só da espécie de estudo mas, provavelmente, de incontáveis espécies de peixes.

5 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