

FUNDAÇÃO DO INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS

RELATÓRIO FINAL

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)

BOTUCATU

JULHO/2012

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. Os resultados sugerem que não há comportamento de *homing* entre os bagres estudados, ainda que pode haver um pequeno isolamento entre a população de babão do rio Madeira e as demais áreas da bacia Amazônica. Entre os Characiformes estudados (com exceção de *Moenkhausia collettii* para a qual não foi possível obter dados da parte de baixo do rio Madeira) não foi verificada diferenças populacionais entre as amostras coletadas acima e abaixo da cachoeira de Teotônio.

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 piraibas - *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).

1.1 Como a construção de uma Hidroelétrica afeta a genética das populações dos peixes?

Do ponto de vista genético, a barreira à migração dos peixes pode levar a uma redução ao fluxo gênico, isolando as populações e decrescendo a diversidade genética através dos processos de deriva genética e endocruzamento (Slatkin 1985) causando o que chamamos de erosão genética. Este processo pode aumentar o risco de extinção das populações através da endogamia diminuindo a adaptabilidade. Isolamentos devido a barreiras físicas levam a redução da diversidade genética dentro das populações e aumento da diferenciação genética entre as populações de peixes (Knaepkens *et al.* 2004).

Existem muitos exemplos dos efeitos da construção de hidroelétricas e barragens como barreiras ao fluxo gênico em peixes (Neraas & Spruell 2001, Knaepkens *et al.* 2004). Por exemplo, vários estudos foram realizados sobre os estoques do salmão do Pacífico o qual foi impedido de alcançar a área de reprodução devido à construção de hidroelétricas e barragens (NRC 1996), (Nehlsen *et al.* 1991). As pesquisas têm evidenciado um decréscimo da diversidade genética nas populações que permaneceram isoladas acima das hidroelétricas (Carlsson & Nilsson 2001, Castric *et al.* 2001, Costello *et al.* 2003, Taylor *et al.* 2003).

Neraas & Spruell (Neraas & Spruell 2001) estudaram a espécie migradora de truta *Salvelinus confluentus*, que historicamente reproduzia nas cabeceiras dos tributários do rio Clark Fork em Montana, antes da construção da hidroelétrica Cabinet Gorge em 1952. A hidroelétrica foi construída sem nenhum mecanismo para facilitar a passagem dos peixes. Neste trabalho encontram que as populações acima e abaixo da hidroelétrica já se encontram geneticamente diferenciadas, um efeito previsível quando se trata do rompimento dos padrões de migração dos peixes.

Wofford *et al.* (2005) estudaram a influência de barragens na variabilidade genética das populações da truta (*Oncorhynchus clarki clarki*) e encontraram que a construção das barreiras foi um fator extremamente forte contra a dispersão dos peixes causando a diferenciação genética das populações (estruturação) e a baixa variabilidade genética observada (via deriva genética). A redução da heterozigosidade com conseqüente rápida perda alélica foram fatores genéticos associados com as populações isoladas pelas barragens.

Populações da espécie de truta *Oncorhynchus mykiss* e em *Salvelinus leucomaenis*, que foram isoladas das populações restantes por mais de 30 anos pela construção de hidroelétricas, apresentaram-se geneticamente depauperadas nos estudos de Nielsen et al. (Nielsen *et al.* 1997) e Morita & Yamamoto (Morita & Yamamoto 2002). Já nos estudos de Knaepkens et al. (Knaepkens *et al.* 2004) que analisaram os efeitos das construções de barragens nos padrões genético-populacionais da espécie *Cottus gobio*, um peixe de água-doce amplamente distribuído na Europa, não encontraram nenhum dos efeitos negativos observados nos padrões genéticos das populações isoladas pela construção de barragens, sugerindo que outros fatores podem estar contribuindo para o resultado observado.

No estudo realizado por Jager et al. (2001) foram analisados os efeitos das hidroelétricas do rio Idaho (USA) sobre a diversidade genética das populações de esturjão (*Acipenser transmontanus*) através de simulações experimentais. Tal estudo evidenciou um decréscimo da diversidade genética nas populações. Outros estudos com o esturjão têm documentado que o efeito da construção de hidroelétricas foi uma perda na diversidade genética das populações (Bartley *et al.* 1985).

Quando esse tipo de fragmentação genética elimina o fluxo gênico entre as populações, resultados similares podem ocorrer com outros peixes. Uma vez que os efeitos genéticos do isolamento de populações podem ser similares através de diferentes espécies, os resultados desses estudos podem ser usados como exemplos do que pode vir a ocorrer com as populações dos grandes bagres migradores após a construção das Hidroelétricas do rio Madeira.

1.2 Como podemos minimizar os efeitos? Considerações gerais

Com relação ao nosso estudo, a principal consequência da construção da Hidroelétrica no rio Madeira seria o bloqueio na rota migratória para as espécies de peixe migradoras. Nas cabeceiras dos rios com hidrelétricas, as barreiras à migração podem resultar em isolamento genético e demográfico que poderá levar a redução da variabilidade genética em todo o sistema, e potencialmente comprometer o tempo de vida das populações (Wofford *et al.* 2005). Atualmente, existem várias maneiras de se minimizar os efeitos da construção de hidroelétricas sobre a migração dos peixes. Para algumas espécies, como o ocorrido com algumas espécies de salmão, as tecnologias que permitem a passagem dos peixes são bem desenvolvidas e entendidas, e seu sucesso depende do entendimento do comportamento de natação dos peixes, da hidrologia dos rios e outros fatores. Medidas mitigadoras como essas em prática é de fundamental importância que sejam monitorados os níveis de

variabilidade genética das espécies, preferencialmente utilizando os marcadores microssatélites por serem mais sensíveis em uma escala de tempo menor principalmente por dispormos de dados de variabilidade e estrutura genética dessas espécies em um cenário anterior a construção das hidrelétricas.

Além da passagem na direção acima das cachoeiras, as migrações no sentido descendente das cachoeiras é igualmente importante considerando que as larvas e juvenis das douradas e piramutabas usam esse percurso de forma passiva até atingirem o estuário onde permanecerão no período de crescimento (Barthem & Goulding 1997). Alternativas para a descida dos organismos devem ser implementadas para se evitar que os peixes morram ao passarem através das turbinas.

Qualquer atividade humana que comprometa a conectividade das populações dos bagres aos seus respectivos locais de reprodução pode afetar a sobrevivência das espécies no rio Madeira e diminuir a variabilidade genética destas.

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 30 exemplares de cada espécie em pontos abaixo e acima da futura barragem de Santo Antônio (populações locais).
- 2 Coletar 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 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 µL 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/µL 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 µL, utilizando entre 100 a 150 ng do produto de PCR purificado, o pre-mix do kit de sequenciamento (4 µL) 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 sequências da Região Controle

As sequências 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 sequências 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 sequências 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 $Nm = Y / (2 \cdot FST)$.

4.1 RESULTADOS *Brachyplatystoma platynemum* (babão)

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 Federal de Rondônia (UNIR) e a empresa Santo Antonio Energia S/A (SAE), 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.

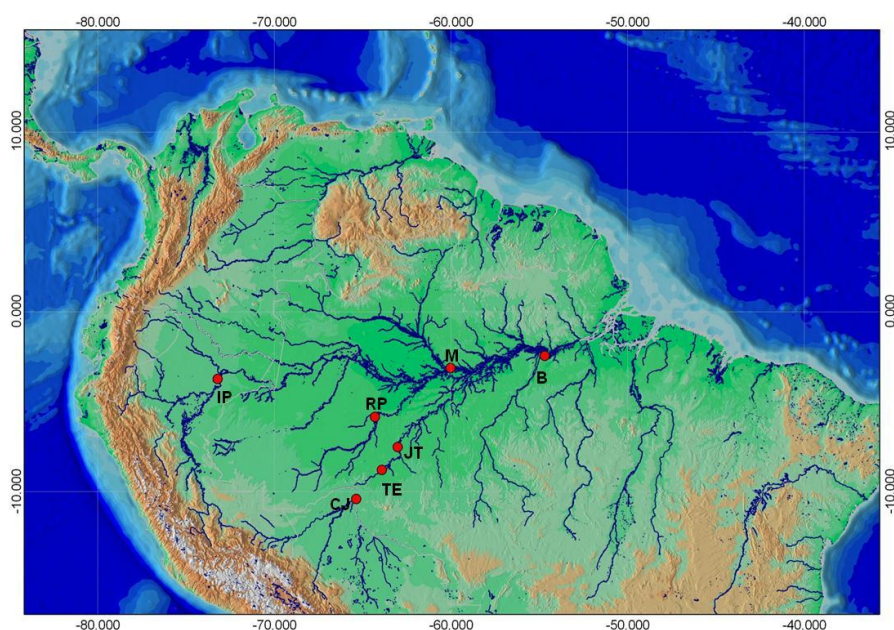


Figura 1 Localização dos pontos de coleta das amostras de *Brachyplatystoma platynemum*. IP=Iquitos, Perú; RP=Rio Purus, AM; CJ=Montante da cachoeira, Rio Madeira, AM; TE=Cachoeira de Teotônio, rio Madeira, AM; JT=Jusante da cachoeira, rio Madeira, AM; M=Manaus, AM; B=Belém, PA.

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 $PI=0,01490\pm0,00025$.

Foram observados um total de 66 haplótipos, registrando uma diversidade haplotípica 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 em relação à distância genética.

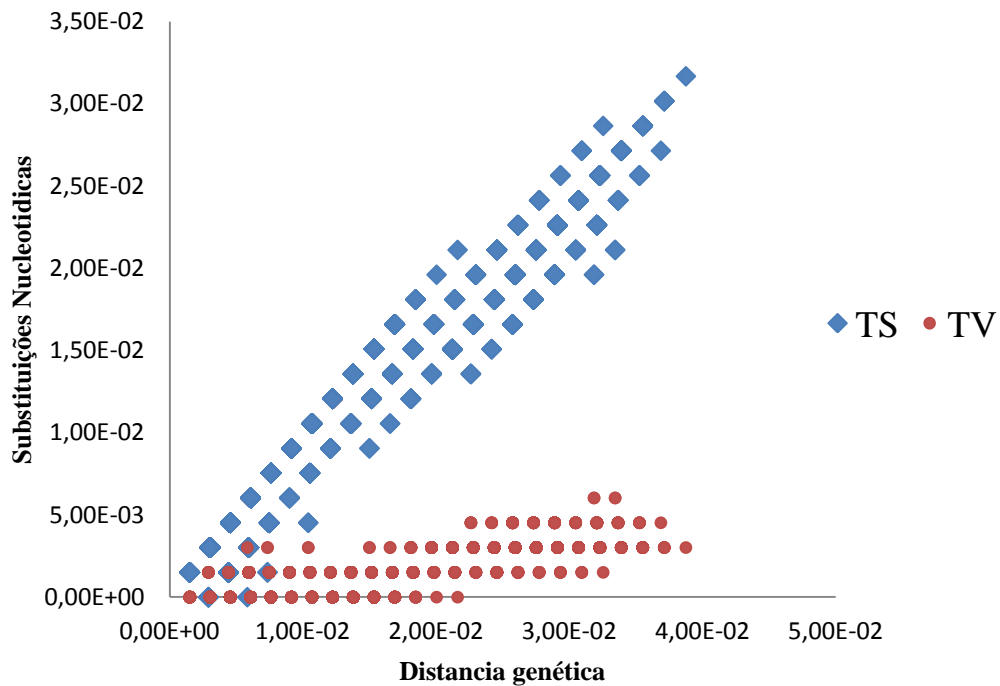


Figura 2. Gráfico de substituições nucleotídicas versus a distância genética para a região controle do DNA mitocondrial de *Brachyplatystoma platynemum*.

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% ($H_U=8$). Para esta localidade a diversidade haplotípica foi de $H_d=0,892$, 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 $F_{ST} = 0,09775$, 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.

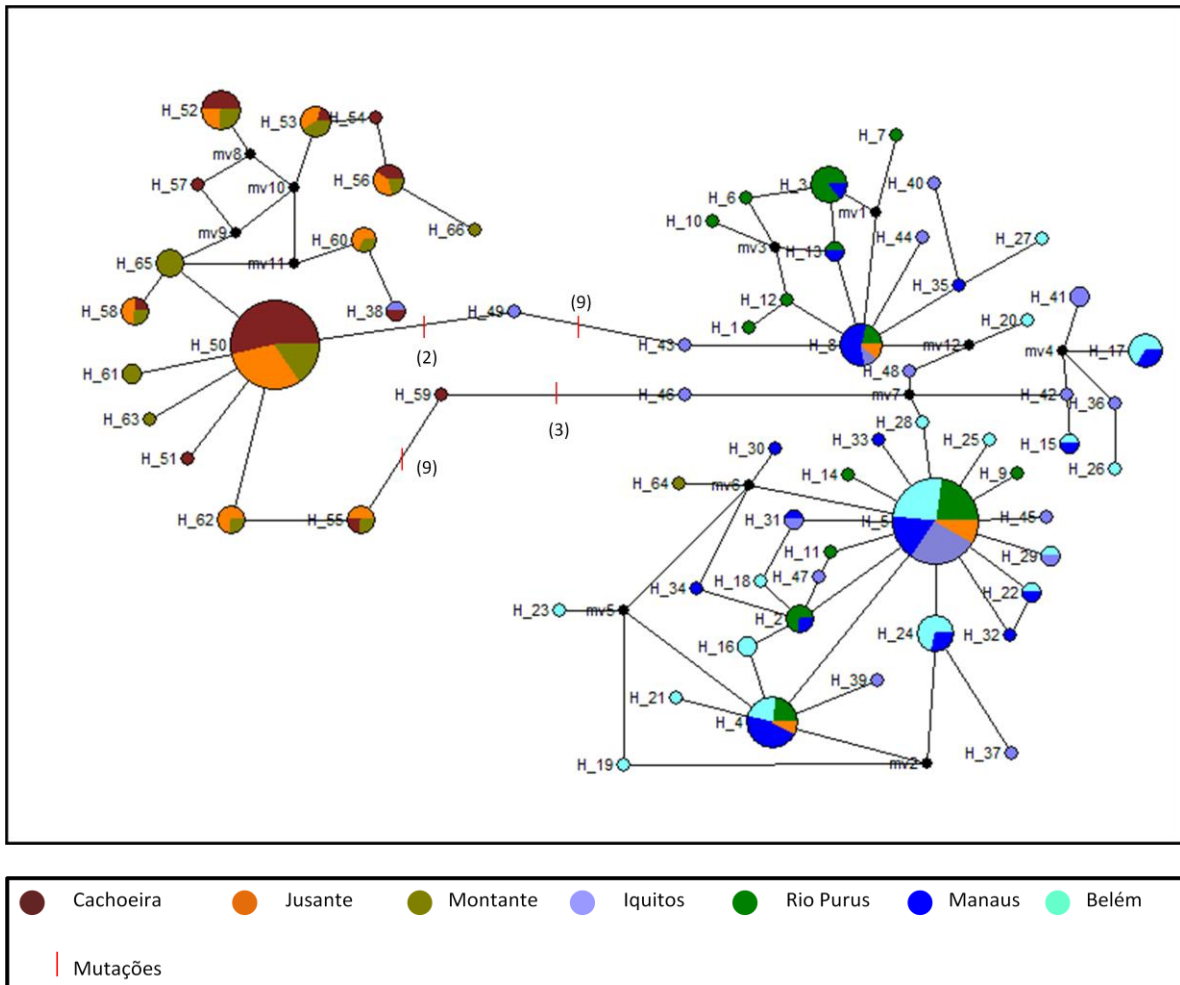


Figura 3. Rede de haplótipos para *Brachyplatystoma platynemum* obtida de sequências parciais de DNA da região controle (D-loop). Os traços ligando os haplótipos representam uma única mutação, sendo as exceções assinaladas (|).

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 há 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.

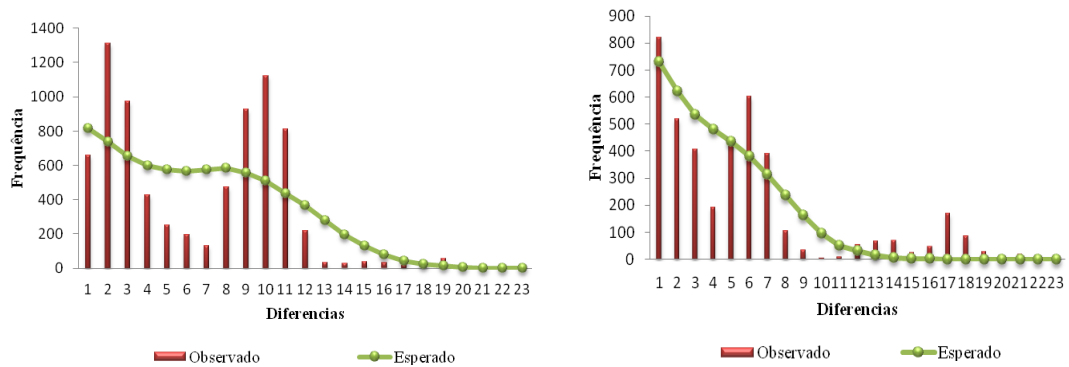


Figura 4. Distribucion Mismatch usando a informação da região controle para os filogrupos encontrados. O primeiro gráfico corresponde ao filogrupos da Calha e o segundo ao filogrupos do rio Madeira.

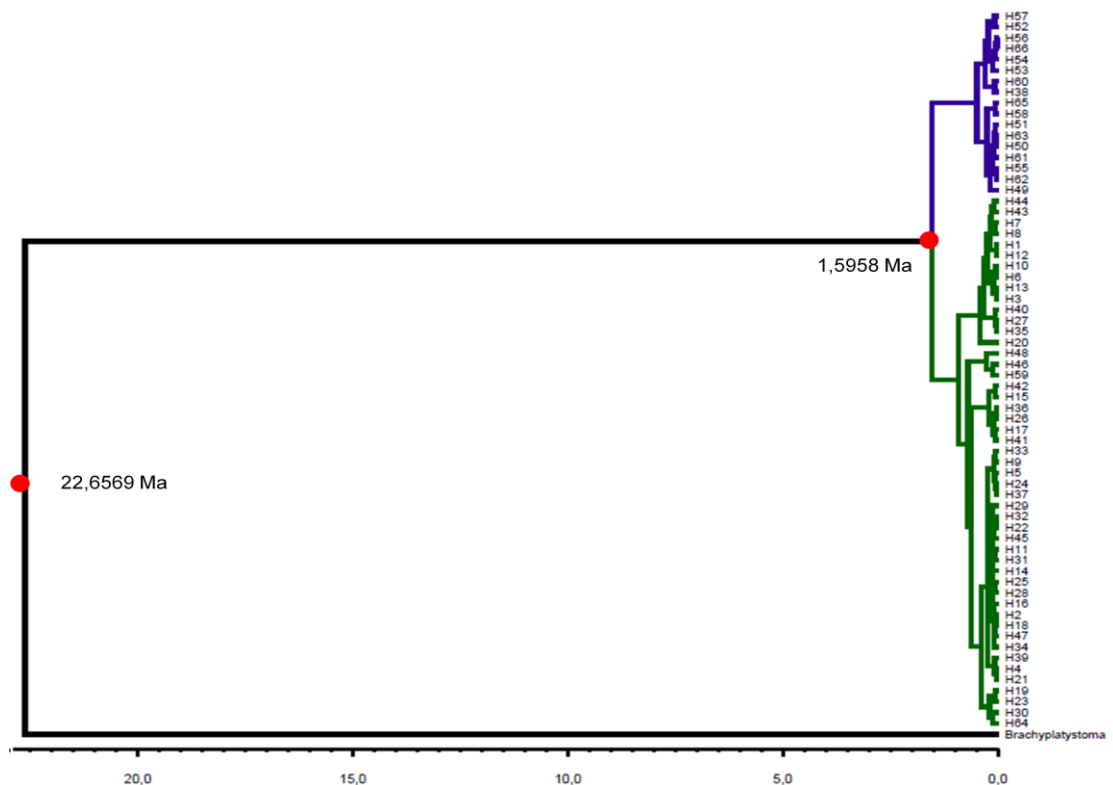


Figura 5. Tempo de divergência dos filogrupos estimado no BEAST, usando a região controle do mtDNA. Tempo em milhões de anos (Ma) antes do presente. Calha em verde e rio Madeira em azul.

Foi estimado o tempo de expansão para os filogrupos Calha e rio Madeira baseados no parametro demografico 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.

4.2 RESULTADOS *Brachyplatystoma vaillantii* (piramutaba)

Os locais de coleta dos exemplares de *Brachyplatystoma vaillantii* estão assinalados na Tabela 11 bem como o tamanho amostral em cada localidade.

Tabela 11: Locais de coleta e número amostral para *Brachyplatystoma vaillantii*.

Local de Coleta (Cidade ou tributário)	<i>B. vaillantii</i>
Belém (PA)	30
Manaus (AM)	30
Jusante AHE Santo Antônio, Rio Madeira (RO)	30
Rio Japurá (AM)	28
Rio Içá (AM)	28
Tabatinga (AM)	30
Total	206

Foi sequenciada a região controle do DNA mitocondrial de 206 amostras de *Brachyplatystoma vaillantii*, de seis localidades de coleta. O número amostral variou entre 28 a 30 entre as localidades (Tabela 11).

As Tabelas 12, 13, 14, 15 e 16 resumem os principais parâmetros da variabilidade e análise da estrutura genética para a piramutaba (*B. vaillantii*).

Para todas as localidades amostradas a piramutaba apresentou diversidade haplotípica alta. Em Manaus foi encontrado o maior número de haplótipos e de haplótipos únicos (H=19) (Tabela 12). Entre os três afluentes amostrados, o rio Içá apresentou o menor número de haplótipos únicos (HU=12) e a montante do empreendimento foi o maior (HU=16). O número total de mutações (ETA) variou entre 26 (Tabatinga) e 35 (Manaus).

Tabela 12: 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 dois afluentes do rio Solimões, sendo dois da margem esquerda (ríos Japurá e Içá) e um da margem direita (Jusante e Montante da AHE de Santo Antônio, no rio Madeira).

Localidade	N	H	HU	ETA	K	S	HD	Pi
Belém	30	22	16	31	6,949	31	0,958	0,0126
Manaus	30	23	19	35	6,181	35	0,977	0,0112
Tabatinga	30	19	15	26	6,514	26	0,937	0,0118
Rio Içá	28	18	12	34	6,952	34	0,960	0,0126
Rio Japurá	28	19	13	34	7,055	34	0,965	0,0128
Jusante AHE Santo Antônio	30	22	15	27	6,234	27	0,979	0,0113
Montante AHE Santo Antônio	30	19	16	30	5,891	30	0,931	0,0107

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 $F_{st} = 0,01566$, no entanto foi observada uma alta diversidade dentro dos grupos para cada localidade, com um percentagem de 98,43% de variação genética (Tabela 13).

A AMOVA realizada entre três grupos definidos como calha (Belém, Manaus e Tabatinga), tributários (ríos Japurá e Içá) e localidades do rio Madeira (cachoeira e jusante) revelou que 97,80% da variabilidade genética encontra-se dentro dos grupos formados e 2,69% entre os grupos com o valor de $F_{ST} = 0,022$ que nessa análise estima a variação entre as localidades entre os grupos formados. Como consequência, o valor de $F_{SC} = -0,004$ que estima a variação entre as localidades dentro de cada grupo é menor, de igual forma entre os grupos $F_{CT} = 0,026$ (Tabela 14).

Tabela 13. Análise de Variância Molecular (AMOVA) de piramutaba (*Brachyplatystoma vaillantii*) entre as sete localidades amostradas [Belém, Manaus, Tabatinga, ríos Içá, Japurá e Madeira (Jusante e Montante)].

Fonte da variação	Grau de Liberdade	Soma dos quadrados	Componentes de variação	Porcentagem de variação
Entre as localidades	6	28,766	0,0519 Va	1,57
Dentro das localidades	199	649,807	3,2653 Vb	98,43
Total	205	678,573	3,3173	
Índice de Fixação $F_{ST} = 0,01566$				

Tabela 14. Análise de Variância Molecular (AMOVA) de piramutaba (*Brachyplatystoma vaillantii*) entre três grupos de localidades: calha (Belém, Manaus e Tabatinga), tributários (rios Içá e Japurá) e rio Madeira (Jusante e Cachoeira).

Fonte da variação	Grau de Liberdade	Soma dos quadrados	Componentes de variação	Porcentagem de variação
Entre grupos	2	17,607	0,08972 Va	2,69
Entre as localidades dentro dos grupos	4	11,158	-0,01613 Vb	-0,48
Dentro dos grupos	199	649,807	3,26536 Vc	97,80
Total	205	678,573	3,338	
Índices de Fixação				
$F_{SC} 0,004$				
$F_{ST} 0,022$				
$F_{CT} 0,026$				

Os valores de F_{ST} nas comparações par a par, variam entre -0,0222 (rio Içá e Rio Japurá) e 0,1256 (Tabatinga e Cachoeira de Santo Antônio) (Tabela 15) mostrando uma leve estruturação genética, principalmente relacionada a cachoeira de Santo Antônio. Porém, após a correção de Bonferroni ($p=0,002$), nenhum dos valores foi significativo (Rice, 1989).

Tabela 15. Valores de F_{ST} par a par estimado para a piramutaba entre as sete localidades amostradas [Belém, Manaus, Tabatinga, rios Içá, Japurá e Madeira (Jusante e Cachoeira)].

	Belém	Manaus	Tabatinga	rio Içá	rio Japurá	Jusante
Manaus	0,0054					
Tabatinga	-0,0102	0,0074				
rio Içá	-0,0167	-0,0048	-0,0198			
rio Japurá	-0,0182	-0,0038	-0,0214	-0,0222		
Jusante	0,0119	0,0044	0,0246	0,0275	0,0126	
Montante	0,0642	0,0535	0,0720	0,0873	0,0607	0,0006

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 3,48 (entre Belém e a jusante do empreendimento) a 18,08 (entre Belém e rio Japurá) (Tabela 16).

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

	Belém	Manaus	Tabatinga	rio Içá	rio Japurá	Jusante
Manaus	Inf					
Tabatinga	Inf					
rio Içá	14,95	Inf				
rio Japurá	18,08	Inf	Inf	Inf	Inf	
Jusante	3,48	6,50	4,39	13,46	13,97	
Montante	Inf	Inf	Inf	Inf	Inf	7,53

Inf = valores altos de Nm que não poderem ser estimados pelo programa ARLEQUIN 3.11 em razão dos valores de F_{ST} negativos (ver esses valores na Tabela 09). Considerar para esses valores F_{ST} igual a zero.

4.3 RESULTADOS *Brachyplatystoma rousseauxii* (dourada)

Os locais de coleta dos exemplares de *Brachyplatystoma rousseauxii* assinalados na Tabela 17 bem como o tamanho amostral em cada localidade.

Tabela 17. Locais de coleta e numero amostral para *Brachyplatystoma rousseauxii*.

Local de Coleta (Cidade ou tributário)	<i>B. rousseauxii</i>
Belém (PA)	30
Jusante AHE Santo Antônio, Rio Madeira (RO)	30
Montante AHE Santo Antônio, Rio Madeira (RO)	30
Rio Purus (AM)	30
Rio Japurá (AM)	30
Rio Juruá (AM)	30
Rio Içá (AM)	30
Total	210

Foi analisada a região controle do DNA mitocondrial de 210 indivíduos distribuídos em sete localidades (N=30/local), sendo uma na calha principal do rio Solimões/Amazonas (Belém), duas no rio Madeira (Jusante e a montante da área do Empreendimento UHE Santo Antônio) e mais quatro tributários, sendo dois em cada

margem (rios Iça e Japurá na margem esquerda e rios Juruá e Purus na margem direita) (Tabela 17).

As Tabelas 18, 19, 20 e 21 sumarizam os principais parâmetros da variabilidade e análise da estrutura genética obtida para a dourada (*B. rousseauxii*).

O fragmento da RC do DNAm totalizou 911 pb e entre os 210 indivíduos foram observados 129 (61,43%) haplótipos entre os quais 109 haplótipos únicos (51,9%) e 21 compartilhados (10%). Em Belém foi encontrado o maior número de haplótipos compartilhados (12).

A dourada apresentou diversidade haplotípica alta, acima entre 96,1% (rio Purus) a 99,10% (rio Içá). O número de haplótipos variou entre 22 (montante da AHE Santo Antônio) e 27 (rio Içá) (Tabela 18). O número total de mutações (ETA) variou entre 28 (rio Purus) a 46 (rio Içá), a média de diferenças par a par (K) entre 7,549 (rio Juruá) e 9,136(rio Içá) e a diversidade nucleotídica (Pi) entre 0,0083 (rio Juruá) e 0,0100(rio Içá).

Tabela 18: Parâmetros de diversidade genética para a dourada (*Brachyplatystoma rousseauxii*) amostradas em uma localidade da calha principal do eixo principal estuário-Amazonas-Solimões (Belém) e cinco afluentes do rio solimões/Amazonas. Dados baseados na análise de 911 bp região controle do DNAm.

Localidade	N	H	HU	ETA	K	S	HD	Pi
Belém	30	25	13	44	8,625	43	0,989	0,0095
Jusante AHE Santo Antônio	30	26	14	31	7,751	41	0,989	0,0085
Montante AHE Santo Antônio	30	22	13	36	8,075	34	0,970	0,0088
Rio Japurá	30	25	16	38	8,574	37	0,986	0,0094
Rio Içá	30	27	20	46	9,136	45	0,991	0,0100
Rio Purus	30	23	11	28	7,726	40	0,961	0,0084
Rio Juruá	30	25	17	29	7,549	33	0,989	0,0083

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 ausência de estrutura genética significativa encontrada é corroborada com as estimativas de fluxo gênico a partir dos valores de Nm (número de migrantes por geração) que variou entre 10,88 (entre rio Içá e a porção a montante da AHE Santo Antônio, rio Madeira) a 806,95 (entre os rios Purus e Japurá) (Tabela 22).

A análise de variância molecular mostrou uma baixa variação genética entre as localidades amostradas com um valor para o índice de fixação $F_{st} = 0,014$. Foi observada uma alta diversidade dentro das localidades amostradas, com um percentual de 98,56 % de variação genética (Tabela 19).

Tabela 19: Análise de Variância Molecular (AMOVA) de dourada (*Brachyplatystoma rousseauxii*) entre as 07 localidades amostradas [Belém, rios Içá, Japurá, Madeira (jusante, montante da AHE Santo Antônio) Purus e Juruá], com base na análise de 911 bp região controle do DNAm.

Fonte da variação	Grau de Liberdade	Soma dos quadrados	Componentes de variação	Porcentagem de variação
Entre as localidades	6	35,38	0,059 Va	1,44
Dentro das localidades	203	832,87	4,103 Vb	98,56
Total	209	868,25	4,162	
Índice de Fixação $F_{ST} = 0,014$				

A AMOVA realizada entre três grupos definidos como calha (Belém), tributários (rios Juruá, Purus, Japurá e Içá) e localidades do rio Madeira (jusante e montante da AHE Santo Antônio) revelou que 98,06% da variabilidade genética encontra-se dentro dos grupos formados e 1,54% entre os grupos com o valor de $F_{ST} = 0,019$. Como consequência, o valor de $F_{SC} = 0,004$, que estima a variação entre as localidades dentro de cada grupo foi menor, de igual forma que dentro dos grupos $F_{CT} = 0,015$ (Tabela 20).

Tabela 20: Análise de Variância Molecular (AMOVA) de *Brachyplatystoma rousseauxii* entre três grupos: Localidades do rio Madeira (Montante e Jusante da AHE Santo Antônio), Calha principal (Belém) e tributários (Rios Japurá, Içá, Juruá e Purus), com base na análise de 911 bp região controle do DNAm.

Fonte da variação	Grau de Liberdade	Soma dos quadrados	Componentes de variação	Porcentagem de variação
Entre grupos	2	16,948	0,065 Va	1,54 Fst
Entre as localidades dentro dos grupos	4	18,433	0,017 Vb	0,40 Fsc
Dentro dos grupos	203	832,867	4,103 Vc	98,06 Fct
Total	209	868,248	4,184	
Índices de Fixação:				
$F_{SC} 0,004$				
$F_{ST} 0,019$				
$F_{CT} 0,015$				

Os valores de F_{ST} par a parestimados entre cada duas localidades, mostram uma baixa estruturação entre as localidades amostradas com valores variando entre - 0,016 (Porção a junsante da AHE de Santo Antônio com o rio Purus) a 0,044 (porção a

montante da AHE Santo Antônio no rio Madeira com rio Içá) (Tabela 21). Porém nenhum dos valores foi significativo após a correção de Bonferroni ($P > 0,0024$) (Rice, 1989).

Tabela 21: Valores de F_{ST} par a par estimado para a dourada entre 07 localidades amostradas [Belém, rios Içá, Japurá, Madeira (jusante e montante) Purus e Juruá], com base na análise de 911 bp região controle do DNAm.

Localidades	Belém	rio Japurá	rio Içá	rio Purus	rio Juruá	jusante AHE
rio Japurá	-0,009					
rio Içá	0,035	0,015				
rio Purus	0,011	-0,001	0,012			
rio Juruá	0,015	0,013	0,010	0,005		
jusante AHE S. Antônio (RM)	0,011	0,004	0,033	-0,016	0,010	
montante AHE S. Antônio (RM)	0,039	0,029	0,044	0,006	0,035	-0,011

RM = rio Madeira.

Tabela 22. Número de Migrantes por geração (Nm) para a dourada estimados a partir dos valores de F_{ST} par a par entre as 07 localidades amostradas [Belém, rios Içá, Japurá, Madeira (jusante e montante da AHE Santo Antônio) Purus e Juruá] com base na análise de 911 bp região controle do DNAm.

Localidades	Belém	rio Japurá	rio Içá	rio Purus	rio Juruá	jusante AHE
rio Japurá	58,64					
rio Içá	13,70	33,96				
rio Purus	45,04	806,95	41,66			
rio Juruá	31,82	38,96	48,91	107,96		
jusante AHE Sto Antônio, RM	45,88	110,86	14,74	31,04	50,26	
montante AHE Sto Antônio, RM	12,38	17,01	10,88	80,93	13,59	46,63

RM = rio Madeira

4.4 RESULTADOS CHARACIFORMES

Os resultados obtidos na análise de polimorfismo da região controle do DNAm para as três espécies de Characiformes estudadas mostram que *Pygocentrus nattereri* apresenta valores menores dos parâmetros genéticos em comparação a *Potamorhina latior* e *Moenkhausia collettii* (Tabela 23). Além de ter o maior número de espécimes analisados (54 amostras). *M. collettii* é a espécie que apresenta os maiores valores de

parâmetros genéticos, dado que somente temos amostras da Montante e o menor número de espécimes analisados (11 amostras).

Tabela 23. Parâmetros genéticos da região controle do DNA mitocondrial para espécimes da Montante e Jusante das espécies *Pygocentrus nattereri*, *Potamorhina latior* e *Moenkhausia collettii*.

Parâmetros Genéticos	<i>Pygocentrus nattereri</i>		<i>Potamorhina latior</i>		<i>Moenkhausia collettii</i>
	Montante	Jusante	Montante	Jusante	Montante
Número de sítios	829		874		683
Tamanho amostral (<i>M</i>)	54		45		11
	25	29	25	20	
Número de haplótipos (<i>H</i>)	5		39		10
	5	2	23	17	
Diversidade haplotípica (<i>Hd</i>)	0.495 ± 0.070		0.993 ± 0.007		0.982 ± 0.046
	0.607 ± 0.093	0.379 ± 0.084	0.993 ± 0.013	0.984 ± 0.020	
Diversidade nucleotídicas (<i>π</i>)	0.00078 ± 0.00016		0.01661 ± 0.00197		0.20127 ± 0.04124
	0.00105 ± 0.00025	0.00046 ± 0.00010	0.01232 ± 0.00084	0.01865 ± 0.00408	
Número total de mutações (<i>ETA</i>)	4		88		285
	4	1	44	77	
Número de sítios polimórficos (<i>S</i>)	4		86		226
	4	1	44	75	
Médias das diferenças nucleotídicas par a par (<i>K</i>)	0.647		14.386		80.709
	0.873	0.379	10.747	16.147	

Distribuição dos haplótipos

Foram analisadas as três espécies sem particioná-las, inicialmente, entre as zonas de Montante e Jusante. Observa-se na Tabela 23, que *P. nattereri* apresenta o menor número de haplótipos (5 em total), mesmo assim, tendo o maior número de espécimes analisados. O haplótipos com maior número de espécimes foram Hap_1, Hap_3 e Hap_4 (se repetiram 37, 5 e 10 vezes, respectivamente). *P. latior* apresentou o maior número de haplótipos (39 no total), com 34 haplótipos únicos e 5 haplótipos que se repetiram (Hap_3, Hap_12, Hap_30 e Hap_33 se repetiram 2 vezes e Hap_17 se repetiu 3 vezes). *M. collettii* apresentou 10 haplótipos, com 9 haplótipos únicos e o haplótipo Hap_8 que se repetiu 2 vezes. Tanto *P. nattereri* como *P. latior*, apresentam haplótipos compartilhados entre Montante e Jusante, caso não observado em *M. collettii* por contar somente com amostras de Montante. Pode ser confirmado na figura 6.

Tabela 24. Haplótipos de *Pygocentrus nattereri*, *Potamorhina latior* e *Moenkhausia collettii*.

Espécie	Haplótipo	Espécime	
		Montante	Jusante
<i>Pygocentrus nattereri</i>	H_1	MPN12, MPN13, MPN14, MPN31, MPN38, MPN632, MPN633, MPN2285, MPN2235, MPN2280, MPN2281, MPN2282, MPN3296, MPN3610, MPN6112	JPN5839, JPN5840, JPN5841, JPN5842, JPN5846, JPN5848, JPN5851, JPN5852, JPN5853, JPN5854, JPN5855, JPN5856, JPN5857, JPN5858, JPN5859, JPN5860, JPN5862, JPN5863, JPN5865, JPN5866, JPN5888, JPN5890
	H_2	MPN30	
	H_3	MPN35, MPN407, MPN2167, MPN3159, MPN611	
	H_4	MPN630, MPN632, MPN634	JPN5849, JPN5850, JPN5861, JPN5889, JPN5891, JPN6012, JPN6793
	H_5	MPN2319	
<i>Potamorhina latior</i>	H_1	MPL10	
	H_2	MPL22	
	H_3	MPL51, MPL5742	
	H_4	MPL448	
<i>Moenkhausia collettii</i>	H_5	MPL1713	
	H_6	MPL1714	
	H_7	MPL2140	
	H_8	MPL2144	
	H_9	MPL2307	
	H_10	MPL2308	
	H_11	MPL2309	
	H_12	MPL2310, MPL3594	
	H_13	MPL2582	
	H_14	MPL3498	
	H_15	MPL3499	
	H_16	MPL3592	
	H_17	MPL3593	JPL1893, JPL1894
	H_18	MPL5741	
	H_19	MPL5766	

	H_20	MPL5774	
	H_21	MPL5780	
	H_22	MPL5798	
	H_23	MPL6209	
	H_24		JPL987
	H_25		JPL1851
	H_26		JPL2530
	H_27		JPL2531
	H_28		JPL2603
	H_29		JPL2611
	H_30		JPL3316, JPL3317
	H_31		JPL 3393
	H_32		JPL3412
	H_33		JPL4949, JPL4951
	H_34		JPL4950
	H_35		JPL4955
	H_36		JPL5952
	H_37		JPL6013
	H_38		JPL6017
	H_39		JPL6927
<i>Moenkhausia collettii</i>	H_1	MMC681	
	H_2	MMC172	
	H_3	MMC249	
	H_4	MMC1151.1	
	H_5	MMC1151.2	
	H_6	MMC1151	
	H_7	MMC50593	
	H_8	MMC50594, MMC50595	
	H_9	MMC50596	
	H_10	MMC50707	

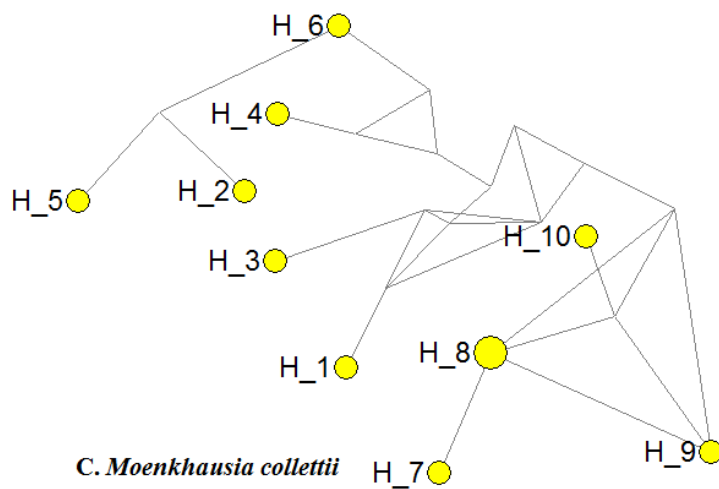
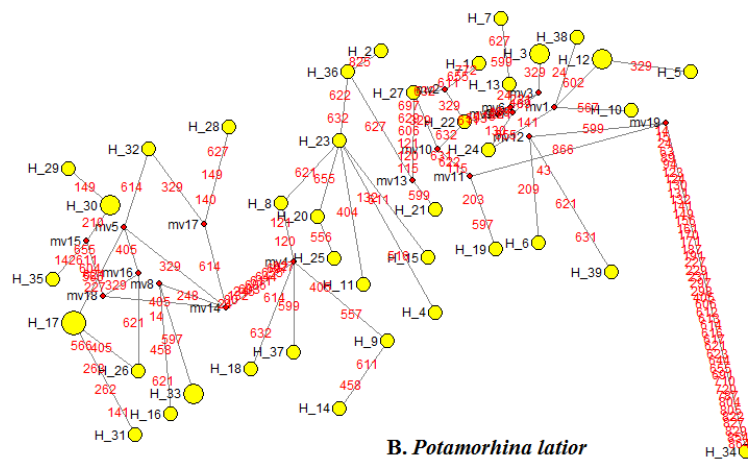
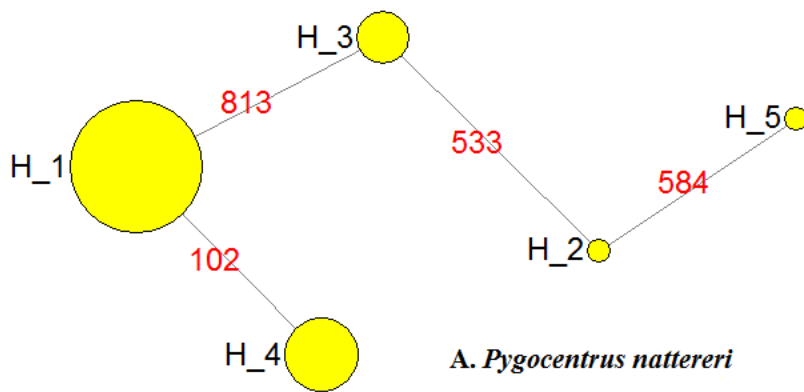


Figura 6. Relação entre os haplótipos de *Pygocentrus nattereri* (A), *Potamorhina latior* (B) e *Moenkhausia collettii* (C).

Distância genética

Os valores de distância genética foram obtidos dentro de cada espécie, considerando as amostras de Montante e Jusante (Tabelas 25 e 26). No caso de *M. collettii*, foi feita a distancia intra e interespecifica comparando com *P. nattereri* e *P.*

latior (Tabela 27). Os espécimes da Montante e Jusante de *P. nattereri*, apresentam uma distancia genética de 0.1%, sendo a menor em comparação a *P. latior* (1.9%) e *M. collettii* (21.9%), mesmo assim sendo amostras somente da Montante. Com o objetivo de apresentar melhor a visualização dos resultados da distância genética, foi computada um árvore consenso para cada espécie. As árvores foram obtidas pelo método de máxima verossimilhança, usando o modelo T92 (Tamura, 1992) e *bootstrap* de 1000 (Figuras 7 a 9).

Tabela 25. Distância genética intraespecífica de *Pygocentrus nattereri*.

<i>Pygocentrus nattereri</i>	Montante	Jusante
Montante	0.001 ± 0.000	
Jusante	0.001 ± 0.000	0.000 ± 0.000

Tabela 26. Distância genética intraespecífica de *Potamorhina latior*.

<i>Potamorhina latior</i>	Montante	Jusante
Montante	0.013 ± 0.002	
Jusante	0.019 ± 0.003	0.019 ± 0.003

Tabela 27. Distância genética intra e interespecífica de *Moenkhausia collettii*.

	<i>P. nattereri</i>	<i>P. latior</i>	Montante <i>M. collettii</i>
<i>Pygocentrus nattereri</i>			
<i>Potamorhina latior</i>	0.126 ± 0.010		
Montante <i>M. collettii</i>	0.431 ± 0.033	0.438 ± 0.034	0.219 ± 0.014

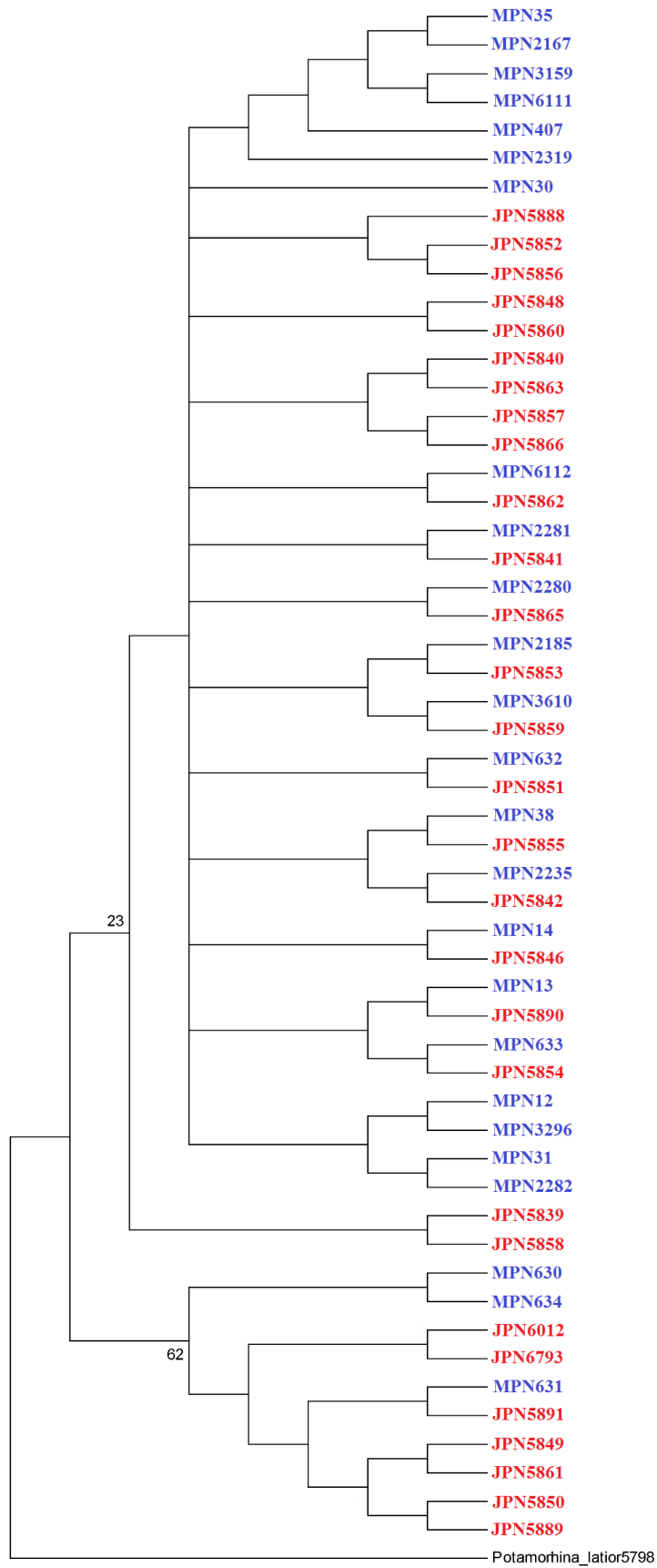


Figura 7. Árvore obtida por Máxima Verossimilhança com os indivíduos de *P. nattereri* das regiões Montante (Táxons em azul) e Jusante (Táxons em vermelho). O táxon *Potamorhina latior* foi utilizado como grupo externo.

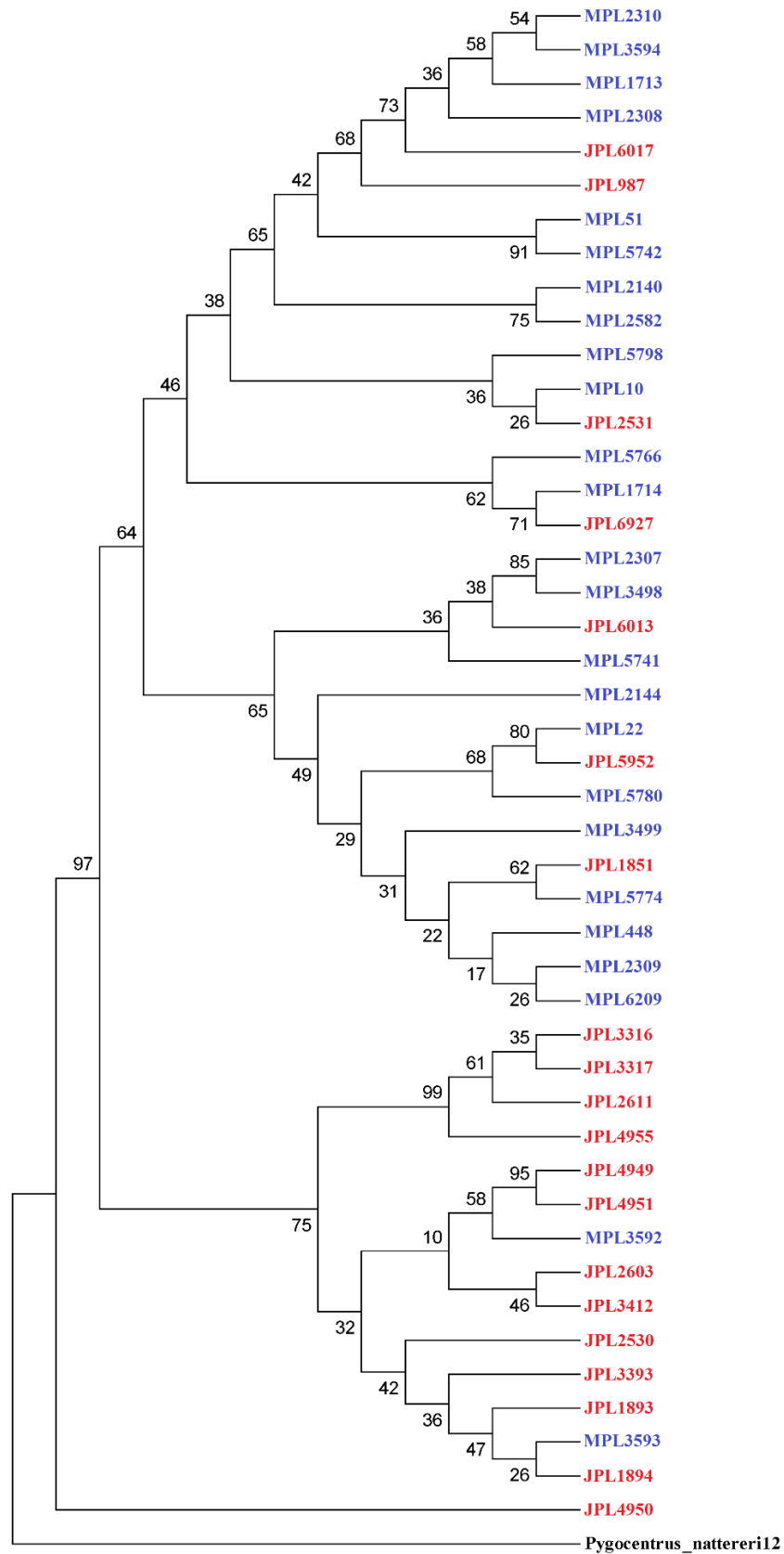


Figura 8. Árvore obtida por Máxima Verossimilhança com os indivíduos de *P. latior* das regiões Montante (Táxons em azul) e Jusante (Táxons em vermelho). O táxon *Pygocentrus nattereri* foi utilizado como grupo externo.

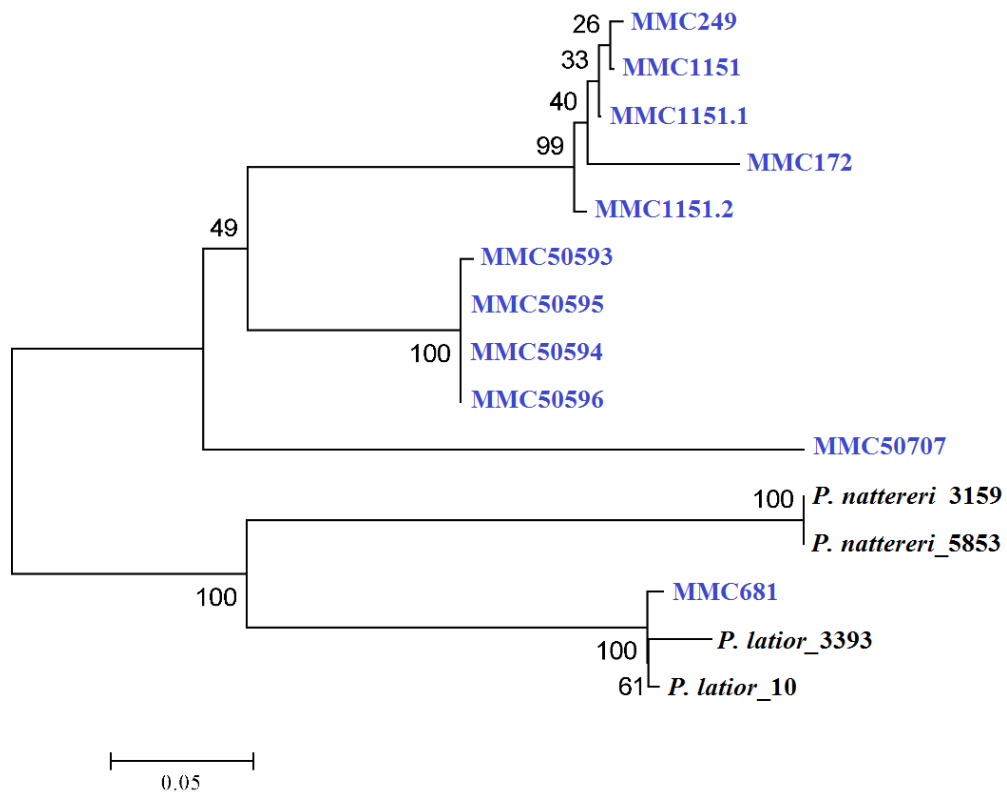


Figura 9. Árvore obtida por Máxima Verossimilhança com os indivíduos de *M.collettii* da região Montante (Táxons em azul). Os táxons *P. nattereri* e *P. latior* foram utilizados como grupo externo. A amostra MMC681 representa uma provável contaminação entre as amostras.

5 DISCUSSÃO

5.1 Discussão sobre as amostras de Babão

A identificação dos padrões de distribuição da variação genética dentro e entre populações é referida como a estrutura genética populacional das espécies. Informações sobre essa estrutura são parâmetros fundamentais 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, além de sua ampla distribuição no sistema a Amazonas-Solimões.

Brachyplatystoma platynemum representa uma das espécies menos estudadas do gênero e apesar 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* (Huergo, 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 mostraram 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 sugerida uma baixa estruturação para *B. rousseauxii* entre o rio Madeira e rio Japurá (Batista, 2010) com a região controle. Entretanto, para *B. vaillanti* 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 eixo Amazonas-Solimões. 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 que 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.*, 2009).

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 *et al.*, 1998). 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, descartando 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 formada 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 de 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), sugere 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 1997; Prance 1982; Whitemore e Prance 1987), no entanto estas predições são baseadas na biota terrestre, devido ao que as mudanças ambientais são menos evidentes nos ecossistemas aquáticos (Hubert *et al.*, 2007). Na área de estudo, foram identificados dois 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), 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 refugio, 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 refugio 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 refugio esta relacionada 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 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 refugio 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 refugio 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* (Torrico *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 pela alteração do regime de fluxo, separando linhagens de cada lado dos arcos, resultando em divergência vicariante (Hubert e Renno, 2006). Esta hipótese foi 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 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. Apesar de existirem evidências de divergência genética como consequências destes eventos para outras espécies animais como no caso da ariranha *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 devido a sua origem 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.*, 2000; Hayes e Sewlal, 2004). Este rio tem sido reconhecido por apresentar uma grande diversidade de habitat aquáticos devido à influência 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* uma hipótese a nível biológico e ecológico que pode explicar a origem e permanência da estrutura populacional é fundamentada na migração reprodutiva restrita das populações de *B platynemum* na bacia do rio Madeira. Assim, é possível que após a separação das populações por mudanças climáticas durante o Pleistoceno, as populações sofreram efeitos de gargalo que diminuíram o tamanho populacional, a ação da deriva genética nessas populações reduzidas e separadas pode ter causado um aumento nas diferenças genéticas entre elas. Além disso, 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 entram no rio Madeira mas 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 curtas 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 às 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 moldada 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.

5.1.1 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 (Avise 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. Requer-se 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 platynemum* 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 série de corredeiras 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. platynemum* na bacia do rio Madeira, pode ser fortemente afetada pela fragmentação do habitat e a interrupção do processo de migração como consequências 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.

5.2 Discussão sobre as amostras de Dourada e Piramutaba

A diversidade genética obtida para a dourada e piramutaba tem valores próximos a da maioria das espécies (Tabela 28), principalmente daquelas com comportamento migratório, como a piraíba, o filhote capapreta, o tambaqui, o jaraqui e o curimatã. Isso é fortemente verificado nos valores altos de diversidade haplotípica (conhecida também como diversidade génica).

Baixa variabilidade genética foi observada em algumas espécies de bagres da família Pimelodidae, oriundas de outras regiões do Brasil, com o uso da região controle (DNAmt). Níveis baixos de diversidade nucleotídica ($P_i = 0,0038$), foram obtidos para *Zungaro jahu*, um jaú, pertencente a família Pimelodidae, oriundo da bacia Paraná-Paraguai (Boni, 2008). Essa espécie vem sendo afetada pelos represamentos e está listada como vulnerável nos estados brasileiros de Minas Gerais e Paraná (Mikich e Bérnils, 2004). É considerada localmente extinta em vários trechos das bacias dos rios Grande e Paranaíba devido às cascatas de reservatórios nesses rios (Alves, 2006).

Baixa diversidade nucleotídica (P_i entre 0,0000 a 0,0041) também foi reportada para o bagre migrador *Pimelodus maculatus*, ao se avaliar o impacto de barragens na estrutura e variabilidade genética dessa espécie, em oito localidades do rio São Francisco (Zagonel, 2009), onde se encontram 23% da área ocupada por reservatórios no Brasil (Sato e Godinho, 2004).

Com relação a estrutura ou diferenciação populacional, a análise conjunta dos resultados das taxas de fluxo gênico baseados nos valores de N_m , valores de F_{ST} , os resultados da AMOVA e da distribuição de haplótipos aponta para um cenário de panmixia em que cada uma das duas espécies (dourada e a piramutaba) é composta por um único estoque genético que se distribui (e migra) ao longo da Amazônia brasileira e também certamente em território de outros países amazônicos. Esse cenário corrobora os estudos anteriormente

realizados com outros tipos de ferramentas como os dados morfométricos e merísticos (Alonso, 2002; Barthem e Goulding, 1997) bem como com a primeira abordagem genética, utilizando a região controle (DNAmt) como marcador molecular, em indivíduos coletados na calha principal do rio Solimões/Amazonas (Batista, 2001; Alves-Gomes, 2006; Formiga-Aquino, 2004; Rodrigues, 2009).

Várias espécies de peixes amazônicos de importância comercial, para as quais foi utilizada a região controle (DNAmt), se enquadram nesse cenário de panmixia formando um único estoque, entre as quais: o tambaqui (*Colossoma macropomum*) amostrado em cinco localidades do eixo EAS (Santos et al. 2007) e a pescada (*Plagioscion squamosissimus*) amostrada em cinco localidades da bacia amazônica (Galletti, 2009).

Tabela 28. Índices de variabilidade genética estimados para a dourada (*Brachyplatystoma rousseauxii*) e piramutaba (*B. vaillantii*) em relação aos obtidos em espécies de peixes amazônicos, distribuídas em quatro Ordens de peixes, estimados com a região controle (DNamt).

Espécie	Nome popular	Ordem	N	pb	H	S	Hu	HD	Pi	Referencia
<i>Nannostomus eques</i>	peixe-lápis	C	68	1087	51	34	29	0,913	0,0027	Terencio (2009)
<i>Prochilodus nigricans</i>	Curimatã	C	348	834	170	169	151	0,914	0,0162	Machado (2009)
<i>Colossoma macropomum</i>	Tambaqui	C	45	1077	44	72	43	0,999	0,0120	Santos <i>et al.</i> (2007)
<i>Semaprochilodus insignis</i>	jaraqui escama grossa	C	249	1148	121	125	43	0,961	0,0119	Batalha (2009)
<i>Serrasalmus rhombeus</i>	Pacu	C	75	963	41	-	67	0,530 a 0,990	0,0010 a 0,007	Hubert <i>et al.</i> (2007)
<i>Plagioscion squamosissimus</i>	Pescada	P	81	727	54	71	43	0,978	0,0163	Galletti (2009)
<i>Hypopygus lepturus</i>	Sarapó	G	135	911	48	67 a 110	33	0,348 a 0,978	0,0090 a 0,0570	Schmitt, 2005
<i>Brachyplatystoma vaillantii</i>	piramutaba	S	206	550	142	31	100	0,958	0,0119	Presente estudo
<i>Brachyplatystoma filamentosum</i>	Piraíba	S	225	914	130	68	96	0,987	0,0118	Huergo (2009)
<i>Brachyplatystoma capapretum</i>	filhote capapreta	S	112	913	53	34	40	0,951	0,0041	Huergo (2009)
<i>Brachyplatystoma rousseauxii</i>	Dourada	S	45	1037*	31	54	27	0,886 a 1,000	0,0064 a 0,0095	Batista e Alves-Gomes (2006)
<i>Brachyplatystoma rousseauxii</i>	Dourada	S	210	911	129	39	109	0,980	0,0089	presente estudo

N: número de indivíduos analisados; PB: pares de bases; S: número de sítios polimórficos; Hu: número de haplótipos únicos; HD: diversidade haplotípica e Pi: diversidade nucleotídica. C - Characiformes; P - Perciformes; G –Gymnotiformes e S – Siluriformes.

* Número de pares de bases resultante do somatório de 12 bp da sequência nucleotídica tRNA treonina, 70 pb do tRNA da prolina, a completa sequência da região controle (911 pb) e 44 pb da sequência parcial do tRNA da fenilalanina.

Ausência de estrutura genética significativa também foi observada em *Pangasianodon hypophthalmus* e *Pangasius bocourti*, duas espécies de bagres migradores amostrados em seis localidades do rio Mekong na Cambódia (Ásia), a partir de um estudo com PCR-RFLP do DNA mitocondrial (So *et al.*, 2006).

Prochilodus costatus (curimatá-piôa), um peixe migrador amostrado em três localidades do médio-alto rio São Francisco no estado de Minas Gerais, compõem uma única população panmítica a partir de um estudo com seis microssatélites (Carvalho-Costa *et al.*, 2008).

Diferenciação populacional foi encontrada para o jaraqui (*Semaprochilodus insignis*), um peixe migrador de importância comercial, mas 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).

Utilizando o mesmo marcador molecular, a presença de estoques geneticamente distintos foi reportada para o curimatã (*Prochilodus nigricans*) envolvendo localidades dos rios Tapajós, Xingu e alto Madeira (Machado, 2009).

Por outro lado, diferentemente das outras espécies do gênero *Brachyplatystoma*, a piraíba (*Brachyplatystoma filamentosum*), outro bagre migrador de importância comercial, apresenta fortes indícios de compreender três estoques geneticamente distintos (resultados também da região controle do DNAmt), sendo cada estoque relacionado a cada tipo água (branca, preta e clara) (Huergo, 2009).

Altos níveis de estrutura genética foram reportados em quatro espécies de importância comercial no mercado de peixes ornamentais amostradas em diferentes regiões da Amazônia: o peixe lápis (*Nannostomus eques*) (Terencio, 2009) e o peixe borboleta (*Carnegiella strigata*) (Schneider, 2007), utilizando a região controle (DNAmt) e os genes ATPase 8/6 (DNAmt), respectivamente, o cardinal (*Paracheirodon axelrodi*) (d' Assunção, 2007) e o acará-disco (espécies do gênero *Symphysodon* spp.) (Amadio, 2008), ambos utilizando locos microssatélites.

Grande parte dos estudos envolvendo peixes amazônicos enquadrados em um cenário de panmixia (formam uma única população) relaciona essa ausência de estruturação genética ao sistema de várzea na Amazônia, que em épocas de cheia produzem conexões que favorecem o fluxo gênico entre os indivíduos de diferentes localidades.

5.2.1 A questão do *homing*/filopatria

Batista e Alves-Gomes (2006) originalmente levantaram a hipótese de *homing* em *B. rousseauxii* como uma forma de interpretar o decréscimo significativo na diferenciação genética entre indivíduos coletados na região do estuário e em Tabatinga. De certa forma esta tendência foi verificada neste estudo, mas a inclusão de um número maior de localidades amostradas bem como de indivíduos coletados, não permite corroborar o cenário de filopatria baseado nos resultados obtidos com região controle do DNA mitocondrial. O resultado do presente estudo indica que as populações de dourada e a piramutaba não podem ser diferenciadas em função dos afluentes e, conseqüentemente, não pode ser caracterizada como apresentando comportamento filopátrico. A alternativa para este cenário seria a escolha aleatória do rio para desovar.

No entanto sugerimos que seja realizada uma análise conjunta dos resultados obtidos com a região controle do DNAmt juntamente com um marcador codominante de herança biparental e utilizado largamente em estudos populacionais como os microssatélites a fim de confirmar esse resultado.

Dois cenários podem ser considerados para a dourada:

1) ainda que a dourada não possua um comportamento de *homing* conspícuo ou de fácil observação, é provável que uma parte das douradas nascidas em um determinado tributário eventualmente voltem (ou pelo menos tentem voltar) para este mesmo tributário para desovar. Contudo, o percentual de sucesso nesta jornada é variado e isso se reflete na homogenização genética encontrada.

2) O ciclo de vida da dourada é mais complexo do que o inicialmente postulado e ainda não está completamente esclarecido. A escolha do tributário para a desova, a influência de variáveis climáticas e das características físico-químicas das águas neste processo, o local de permanência dos indivíduos adultos na Amazônia, o número de desovas que cada fêmea é capaz de realizar ao longo da vida, são somente alguns dos aspectos ainda a serem elucidados.

Straying é o termo usado para caracterizar a migração de indivíduos para desovar em um rio onde eles não nasceram. Em situações não filopátricas, o peixe tende a entrar em um rio com características físico-químicas (captadas sensorialmente) parecidas com as do rio onde nasceu (Pascual e Quinn, 1994), e possui a probabilidade maior de escolher o local específico de desova em um afluente a montante do rio de origem (Quinn, 1991). Isso também pode estar ocorrendo com a dourada, uma vez que a maioria das cabeceiras utilizadas para a desova se

encontra em rios geologicamente andinos com características físico-químicas da água semelhantes.

O comportamento filopátrico ocorre em vários organismos e diferentes métodos são utilizados para estudá-lo (Papi, 1992; Wehner *et al.*, 1996). Em peixes, esse estudo é conhecido em uma parte de espécies pertencentes à família Salmonidae, que inclui o salmão do atlântico (*Salmo salar*). Utilizando locos microssatélites, estrutura populacional foi observada nessa espécie em sete rios da província de Quebec, Canadá (Fontaine *et al.*, 1997). Esse comportamento também foi reportado para o pintado, *Pseudoplatystoma corruscans*, uma espécie de bagre da família Pimelodidae de importância comercial, amostrado em seis rios da bacia Paraná-Paraguai, utilizando sete locos microssatélites (Pereira *et al.*, 2008).

5.2.2 Implicação para conservação e manejo de *Brachyplatystoma rousseauxii* e *B. vaillantii* na Amazônia

A conservação pode ser vista como a tentativa de proteger a diversidade genética produzida pela evolução ao longo de 3,5 bilhões de anos em nosso planeta (Eisner *et al.*, 1995).

O alvo preferencial de estratégias conservacionistas precisa ser focado na população (se estas forem diferenciadas), especialmente as de espécies vulneráveis, sobre risco de exploração ou sobrepescadas, ao invés de focalizar a espécie propriamente dita (Hobbs e Mooney, 1998)

Um plano de conservação precisa também prever ações voltadas à proteção do habitat, pois este é fortemente relacionado à história natural e ciclo de vida de uma espécie (Agostinho *et al.*, 2005; Allendorf e Luikart, 2007). Em outras palavras, além da importância de conhecer a variabilidade genética e identificar os estoques é necessário adotar e aplicar medidas de conservação ao ambiente de distribuição geográfica. A degradação e/ou fragmentação dos ecossistemas ripários são apontadas como as principais causas da diminuição das populações exploráveis de peixes (Beverton, 1992; Agostinho *et al.*, 1994). Principalmente nos dias atuais, quando muito se vê e comenta-se sobre mudanças ambientais de origem antrópica e sobre mudanças climáticas. No caso da dourada e piramutaba, as cabeceiras de diferentes afluentes do Solimões/Amazonas são áreas de reprodução onde os adultos desovam e as larvas geradas são carregadas pela correnteza do rio até áreas de criação, como a região estuarina, por onde ficam até 2 a 3 anos. A partir daí uma grande parcela do estoque migra, no início da vazante para a Amazônia central onde ficará nesta região até estarem aptos a reproduzir e, nesse momento, iniciam a regressar às cabeceiras de algum tributário para desovar e o ciclo recomeçar. De forma que não há um único ecossistema e país que englobe o ciclo de vida

completo dessa espécie. Portanto, a conservação e manejo dos bagres migradores na Amazônia precisam incluir medidas de proteção não somente ao complexo ciclo de vida dessas espécies mais também ao ecossistema como um todo.

A compilação dos resultados do presente estudo mostrou que, de uma forma geral, todos os tributários amostrados são igualmente importantes para a manutenção da variabilidade genética do estoque das espécies de bagres estudadas, além das localidades do eixo EAS.

Uma agenda de metas para o desenvolvimento do Brasil está sendo executada pelo atual governo federal. Entre essas metas inclui a construção de hidrelétricas (UHE) em alguns rios no país, entre os quais o rio Madeira, afluente utilizado por algumas espécies de bagres em sua rota migratória. Existem na literatura vários registros de populações de diferentes espécies de peixes impactadas por esse tipo de empreendimento (Nielsen *et al.*, 1997; Jagera *et al.*, 2001; Knaepkens *et al.*, 2004; Sanches, 2007; Zagonel, 2009). A dourada é um forte alvo de conflitos e polêmicas ligado à construção das UHEs do rio Madeira. A partir da reunião de esforços da comunidade científica, medidas mitigadoras foram propostas e aceitas para minimizar os impactos, não somente da dourada mas também de outras espécies de peixes. Será que essas ações serão satisfatoriamente efetivadas e o suficiente para evitar algum impacto no estoque genético de espécies de peixes, no caso do presente estudo da dourada, piramutaba e babão? Medidas de monitoramento precisam ser de fato executadas para ajudar a responder essa questão a longo prazo. Ainda que os resultados do presente estudo indiquem que não há uma população geneticamente restrita ao rio Madeira para dourada e piramutaba, este rio contribui substancialmente para os níveis de variabilidade genética e número de migrantes.

Nas cabeceiras dos rios com hidroelétricas, as barreiras à migração podem resultar em isolamento genético e demográfico que poderá levar a redução da variabilidade genética em todo o sistema, e potencialmente comprometer o tempo de vida das populações (Wofford *et al.*, 2005).

Diante desse cenário, é importante a elaboração de um plano de conservação e manejo integrados, bem como sua execução e monitoramento, que se fundamente em informações e atores oriundos de diferentes áreas do conhecimento (biologia pesqueira, pesca, ecológicas e genéticas, sócio-economia, geografia, conhecimento tradicional e outras) e dos diferentes segmentos da cadeia produtiva, envolvendo também tomadores de decisões pertencentes aos Estados e Países Amazônicos que exploram esse recurso (Isaac *et al.*, 1996; Barthem e Goulding, 1997; Ruffino *et al.*, 2000; Alonso, 2002; Fabr e *et al.*, 2005). Todos os atores envolvidos precisam fornecer sua parcela de contribui o e comprometimento. Esse quadro   emergencial, uma vez que a sobrepesca afeta as popula es humanas de todos os pa ses

envolvidos, além de interferir na interligação ecológica (por exemplo, reprodução e cadeia alimentar) existente nessa grande área geográfica.

5.3 Discussão sobre as amostras de Characiformes

Os resultados mostram que *Pygocentrus nattereri* apresenta menores valores de polimorfismo de DNA [número de haplótipos ($H = 7$), diversidade haplotípica ($Hd = 0,792 \pm 0,066$) e diversidade nucleotídica ($\pi = 0,00139 \pm 0,0025$)] em relação a *Potamorhina latior* (Tabela 2). Sabendo-se que a variabilidade genética é uma função da taxa de mutação e sua probabilidade de fixação (McMillan e Palumbi, 1997), e este último está diretamente relacionada com a reprodução, o que permite a análise de um traço genético de uma geração para a seguinte (Alberts et al. 1996). Apesar da diferença de valores entre *P. nattereri* e *P. latior*. Ambas as espécies têm altos níveis de variabilidade genética. Parâmetros genéticos de diversidade haplotípica (Hd) e diversidade nucleotídica (π) da região controle do mtDNA podem ser úteis para se saber o estado atual de uma população de uma determinada espécie, como foi mostrado para amostras de *B. filamentosum* e *B. capapretum* (Huergo, 2009) que possuem valores elevados de diversidade haplotípica ($Hd = 0,9871$ e $0,9509$, respectivamente), mas diferentes valores de diversidade de nucleotídeos. O autor sugeriu que esta diferença pode ser devido à pesca intensa de *B. capapretum*, requerendo a adoção de medidas de gestão da pesca. Outro estudo em *B. vaillantii* (Rodríguez, 2009), em quatro locais na Amazônia brasileira, mostrou uma diversidade haplotípica elevada (superior a 99%) e baixa diversidade nucleotídica. Ele sugere que esta espécie passa através de uma população de crescimento recente, de modo que esta espécie tende a acumular novas mutações. Se considerarmos a relação entre os valores de diversidade haplotípica e de nucleotídeos do DNA mitocondrial proposta por Grant & Bowen (1998), podemos classificar *P. nattereri* e *P. latior* tendo altos valores de diversidade haplotípica e nucleotídeos como espécies com populações estáveis com grandes tamanhos efetivos, fluxo gênico e distribuição geográfica ampla. Caso contrário, as espécies que possuem valores baixos de diversidade haplotípica e de nucleotídeos, que são espécies submetidas ou que tenham sido submetidas a um efeito de gargalo recente. Este efeito gargalo (Bignotto et al., 2009, Cui et al., 2009), de acordo com as interpretações sugeridas para espécies com baixa variabilidade genética são aqueles que estão em perigo em sua adaptabilidade a mudanças e adversidades ambientais (Bernatchez, et al., 1989), o que não parece estar ocorrendo com as espécies de Characiformes estudadas.

6 – CONCLUSÕES

- Os marcadores mitocôndrias e nucleares utilizados para determinar a distribuição espacial da variação genética de *Brachyplatystoma platynemum*, apresentaram padrões similares, indicando uma forte estruturação genética entre as localidades amostradas no rio Madeira e as localidades da calha principal do eixo Amazonas-Solimões e rio Purus.
- A estrutura populacional observada para *B. platynemum* além de não estar associada com barreiras físicas (corredeiras presentes no rio Madeira), não apresenta padrões claros de segregação genética entre os tributários avaliados e a calha principal, o que exclui a caracterização do comportamento de *homing* para esta espécie.
- O padrão de estrutura genética observado para os filogrupos de *B. platynemum*, pode ser explicado pela ação das mudanças climáticas no isolamento de populações desta espécie em áreas próximas às zonas de refúgio durante o Pleistoceno, no entanto eventos paleohidrográficos e paleogeográficos podem ter contribuído de forma indireta nesta divergência.
- A manutenção da estrutura populacional de *B. platynemum* provavelmente esta associada a processos de migração reprodutiva restrita e ao acasalamento preferencial da população residente na bacia do rio Madeira; premissa fundamentada na evidencia de não isolamento por distancia entre as populações e pelos baixos valores para o numero de migrantes registrados.
- As douradas e piramutabas de todo o sistema amazônico apresentam altos índices de variabilidade genética com níveis particulares para cada espécie.
- As populações destas duas espécies comportam-se como uma grande população panmítica em todo o sistema amazônico estudado, ou seja, as populações não são diferentes nos diferentes sistemas de rios, evidenciando altos níveis de indivíduos emigrantes e imigrantes entre todas as regiões;
- Uma vez que o rio Madeira contém populações de dourada e piramutaba com consideráveis níveis de variabilidade genética, compondo grande parte da variabilidade genética de todo o sistema, é necessário que a integridade desta população associada às outras diferentes populações do sistema amazônico seja mantida, para que o *pool* gênico das espécies possa se manter ao longo do tempo;
- Apesar da diferença de valores de diversidade haplotípica entre *P. nattereri*, *P. latior* e em menor grau entre *M. collettii*, as espécies têm altos níveis de variabilidade genética. e podemos classificá-las como tendo altos valores de diversidade haplotípica e nucleotídica, como espécies com populações estáveis com grandes tamanhos efetivos e fluxo gênico e distribuição

geográfica ampla, não estando separadas pela Cachoeira de Santo Antônio.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agostinho, A. A. et al. (1994). Itaipu reservoir (Brazil): impacts of the impoundment on the fish fauna and fisheries. In: COWX, I. G. (Ed.). Rehabilitation of freshwater fisheries. Osney Mead, Oxford: Fishing News Books, p. 13.
- Agostinho, A.A. et al. (2005). Conservação da biodiversidade em águas continentais do Brasil. *Megadiversidade*, v. 1, n. 1, p. 9.
- Alberts, B.; Bray, D.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K. and Watson, J. D. (1996). *Biología Molecular de la Célula*. Tercera Edición. Ediciones Omega. S. A. 1385pp.
- Aleixo, A. (2004). Historical diversification of a terra-firme forest bird superspecies: a phylogeographic perspective on the role of different hypotheses of Amazonian diversification. *Evolution*, 58, 1303–1317.
- 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.
- Allendorf, F. W.; Luikart, G. (2007). Conservation and the genetics of populations. Malden (MA): Blackwell.
- Alonso, J. C. (2002). Padrão espaço temporal da estrutura populacional e estado atual da exploração pesqueira da dourada *Brachyplatystoma flavicans*, Castelnau, 1855 (Siluriformes: Pimelodidae), no sistema Estuário-Amazonas-Solimões. Tese de Doutorado, INPA/UFAM, Manaus.
- Alves, C. B. M. (2006). Jaú (*Zungaro jahu*): Um peixe mais ameaçado que os outros? *Boletim sociedade Brasileira de Ictiologia*, p. 2.
- Amado, M. V. et al. (2011). A Molecular Perspective on Systematics, Taxonomy and Classification Amazonian Discus Fishes of the Genus *Symphysodon*. *International journal of evolutionary biology*.
- 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.
- Aquadro, C. F.; Greenberg, B. D. (1983). Human mitochondrial DNA variation and evolution: Analysis of nucleotide sequences from seven individuals. *Genetics*, v. 103, n. 2, p. 287-312.
- 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.

- Barthem, R.; Goulding, M. (1997). Os Bagres Balizadores: Ecologia, Migração e Conservação de Peixes Amazônicos. Sociedade Civil Mamirauá, MCT - CNPq, IPAAM. Brasília, Brazil. 140 pp.
- Barthem, R.B.; Goulding, M. (2007). An unexpected ecosystem: the Amazon revealed by the fisheries. Gráfica Biblos, Lima. Botanical Garden Press. Missouri. 241 pp.
- Bartley, D. M. et al. (1985). Preliminary description of the genetic structure of white sturgeon, *Acipenser transmontanus*, in the Pacific Northwest. In: BINKOWSKI, F. P.; DOROSHOV, S. I. (Ed.). North American Sturgeons: Biology and Aquaculture Potential, Developments in Env. Biol. Fish. 6. Dordrecht: Dr W. Junk Publishers, p. 105-109.
- Bassan, B.J.; Caetano- Anolles, G.; Gresshoff, P.M. (1991). Fast and sensitive silver staining of DNA polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.* 196: 80- 83.
- Batalha, K. P. (2009). Genética populacional do jaraqui de escama grossa (*Semaprochilodus insignis* - Prochilodontidae, Characiformes). (2009). 57 f. Dissertação de Mestrado (Mestre), UFAM, Manaus.
- Batista, J. S. (2001). Estimativa da Variabilidade intraespecífica da dourada (*Brachyplatystoma flavicans*) (Castelnau,1855) no eixo estuário, Amazonas-Solimões. (2001). 97 f. Dissertação de Mestrado (Master) - BADPI, INPAUFAM, Manaus.
- Batista, J. S.; Alves-Gomes, J. (2006). A Phylogeography of *Brachyplatystoma rousseauxii* (Siluriformes - Pimelodidae) in the Amazon Basin offers preliminary evidence for the first case of “homing” for an Amazonian migratory catfish. *Genetics and Molecular Research* , v. 5, n. 4, p. 723-740.
- Batista, J.S., Farias, I.P., Formiga-Aquino, K., Sousa. A.C.B., Alves-Gomes, J. (in press). DNA microsatellite markers for “dourada” (*Brachyplatystoma rousseauxii*, Siluriformes: Pimelodidae), a migratory catfish of utmost importance for fisheries in the Amazon: development, characterization and inter-specific amplification *Conservation Genetics Resources*, in press. Doi: 10.1007/s12686-009-9117-5.
- Batista, J.S. 2010. Caracterização genética da dourada - *Brachyplatystoma rousseauxii*, Castelnau, 1855 (Siluriformes-Pimelodidae) na Amazônia por meio de marcadores moleculares mitocondriais e microssatélites: subsídios para conservação e manejo/ Jacqueline da Silva Batista. Manaus : [s.n.], 2010. Tese de doutorado. INPA. Manaus.
- Bayley, P. B. (1981). Fish Yield from the Amazon in Brazil: Comparison with African River Yields and Management Possibilities. *Transactions of the American Fisheries Society* , v. 110, n. 3, p. 351-359.
- Beachan, T.D., Wood C.C. (1999). Application of the microsatellite DNA variation to estimation of stock composition and escapement 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.
- Bernatchez, L.; Dodson, J. J. and Boivin, S. (1989). Population bottlenecks: influence on mitochondrial DNA diversity and its effect in coregonine stock discrimination. *J. Fish Biol.* 35: 233–244.
- Beverton, R. J. H. (1992). Fish resources; threats and protection. *Netherlands Journal of Zoology* , v. 42, p. 36.

- Bignotto, T. S.; Prioli, A. J.; Prioli, S. M. A. P.; Maniglia, T. C.; Boni, T. A.; Lucio, L. C.; Gomes, V. N.; Prioli, R. A.; Oliveira, A. V.; Júlio-Junior, H. F. and Prioli, L. M. (2009). Genetic divergence between *Pseudoplatystoma corruscans* and *Pseudoplatystoma reticulatum* (Siluriformes: Pimelodidae) in the Paraná River Basin. *Braz. J. Biol.* 69: 681 – 689.
- Boni, T. A. (2008). Comparação molecular de populações naturais de Jaú (Zungaro) (Pisces, Siluriformes, Pimelodidae) das bacias amazônica e do Paraná-Paraguai. (2008). 59 f. - Dep. de Biologia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá.
- 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.
- Carlsson, J.; Nilsson, J. (2001). Effects of geomorphological structures on genetic differentiation among brown trout populations in a Northern Boreal river drainage. *Transactions of the American Fisheries Society* , v. 130, p. 36-45.
- Carvalho, G.R. (1993). Evolutionary aspects of fish distribution: genetic variability and adaptation. *J. Fish Biol.* 43, 53-73.
- Carvalho-Costa, L. F. et al. (2008). Evidence of lack of population substructuring in the Brazilian freshwater fish *Prochilodus costatus*. *Genetics and Molecular Biology* , v. 31, n. 1 (suppl), p. 4.
- Castric, V. et al. (2001). Landscape structure and hierarchical genetic diversity in the brook charr, *Salvelinus fontinalis*. *Evolution* , v. 55, p. 1016-1028.
- Church, G.E. (1997). South America: An Outline of Its Physical Geography. The Geographical freshwater habitats in southern California. *Transactions of the American Fisheries Society* , v. 12, p. 397–417.
- Costello, A. B. et al. (2003). The influence of history and contemporary stream hydrology on the evolution of genetic diversity within species: an examination of microsatellite DNA variation in bull trout, *Salvelinus confluentus* (Pisces: Salmonidae). *Evolution* , v. 57, p. 328-344.
- Cui, Z.; Liu, Y.; Li, C. P.; You, F. and Chu, K. H. (2009). The complete mitochondrial genome of the large yellow croaker, *Larimichthys crocea* (Perciformes, Sciaenidae): Unusual features of its control region and the phylogenetic position of the Sciaenidae. *Gene* 432: 33–43.
- D'assunção, A. A. A. (2007). Estudo da variabilidade genética do cardinal (*Ostariophysi*: Characiformes: *Paracheirodon axelrodi*) na bacia do rio Negro. (2007). 67 f. Mestrado - Programa de Pós-graduação em Biologia Tropical e Recursos Naturais, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia - INPA, Manaus.
- 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.
- Dumont, J. F. 1996. Neotectonics of the Subandes-Brazilian craton boundary using geomorphological data: The Marañon and Beni basins. *Tectonophysics* 259:137–151.
- Eisner, T. et al. (1995). Building a Scientifically Sound Policy for Protecting Endangered Species. *Science* , v. 269, n. 5228, p. 1231-1232.
- Esguícero, A.; Arcifa, M. (2010). Fragmentation of a Neotropical migratory fish population by a century-old dam. *Hydrobiologia* , v. 638, n. 1, p. 41-53.

- Espurt, N., Baby, P., Brusset, S., Roddaz, M., Hermoza, W., Regard, V., Antoine, P.-O., Salas-Gismondí, R., Bolanos, R., 2007. How does the Nazca Ridge subduction influence the modern Amazonian foreland basin?. *Geology* 35: 515–518.
- 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.
- 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.
- Fabré, N. N. et al. (2005). Sistema integrado para o manejo dos grandes bagres migradores. In: FABRÉ, N. N.; BARTHEM, R. B. (Ed.). O manejo da pesca dos grandes bagres migradores: piramutaba e dourada no eixo Solimões-Amazonas. Manaus: IBAMA.
- Farias, I.P.; Hrbek, T. (2008). Patterns of diversification in discus fishes (*Symphysodon* spp. Cichlidae) of the Amazon basin. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 49: 32-43.
- Fontaine, P. M. et al. (1997). A genetic test of metapopulation structure in Atlantic salmon (*Salmo salar*) using microsatellites. *Can. J. Fish. Aquat. Sci* , v. 54, n. 10, p. 8.
- Formiga-Aquino, K. (2004). Variabilidade genética da piramutaba - *Brachyplatystoma vaillantii* (Velenciennes, 1840) (Siluriformes - Pimelodidae) no sistema Estuário-Amazonas-Solimões. Mestrado, CPBA, INPA/UA, Manaus, 73 pp.
- Galetti, E. S. (2009). Distribuição da variabilidade genética da pescada, *Plagioscion squamosissimus* (Heckel, 1840) na calha do Rio Amazonas. (2009). 67 f. Dissertação de Mestrado (Mestre), INPA, Manaus.
- 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>
- Goulding, M. (1979). *Ecologia de Pesca do Rio Madeira*. INPA, Manaus, Brazil.
- Goulding, M., Barthem, R.B., Ferreira, E.J.G. (2003). *The Smithsonian Atlas of the Amazon*. Smithsonian Institution Press, Washington, DC.
- Grant, W. S. & Bowen, B. W. (1998). Shallow population histories in deep evolutionary lineages of marine fishes: Insights from sardines and anchovies and lessons for conservation. *The American Genetic Association* 89: 415–426.
- Guyot JL 1993. *Hydrogéochimie des Fleuves de l'Amazonie Bolivienne*. Editions de l'ORSTOM, Collection Etudes et Thèses, Paris.
- Haffer, J., 1997. Alternative models of vertebrate speciation in Amazonia: an overview. *Biodiversity and Conservation* 6: 451–476.
- Hall, T. A. (1999). Bio Edit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Res.* , v. 27, p. 98-99.
- 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.
- Hayes, F.E. & Sewlal, J.N. 2004. The Amazon Rivers as a dispersal barrier to passerine birds: effects of river width, habitat and taxonomy. *Journal of Biogeography* 31: 1809–1818.
- Hobbs, R. J.; Mooney, (1998). H. A. Broadening the extinction debate: population deletions and additions in California and western Australia. *Conserv. Biol.* , v. 12, p. 271-283.
- Hubert, N.; Duponchelle, F; Nuñez, Rivera, JR Bonhomme, F and Renno, JN. (2007). Isolation by distance and Pleistocene expansion of the lowland populations of the white piranha *Serrasalmus rhombeus*. *Molecular Ecology* (2007) 16, 2488–2503.

- Huergo, G. M. et al. (2011). Molecular genetics as a tool for fisheries management in the Brazilian Amazon: Piraíba (*Brachyplatystoma filamentosum* and *Brachyplatystoma capapretum*)(Siluriformes: Pimelodidae) in white-water rivers. *Pan-American Journal of Aquatic Sciences* , v. 6, n. 4, p. 280-289.
- Huergo, G. P. C. M. (2009). Estimativa da diversidade genética da piraíba (*Brachyplatystoma filamentosum*, Lichtenstein 1819) e da piraíba negra (*Brachyplatystoma capapretum*, Lundberg e Akama 2005), na Amazônia Brasileira, inferidas através do DNA mitocondrial: Subsídios para Manejo e Conservação. Tese (doutorado) – INPA.
- Isaac, V. J. et al. (1996). A pesca arsenal no Baixo Amazonas: análise multivariada da captura por espécies. *Acta Amazônica* , v. 26, n. 3, p. 33.
- 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.
- Jagera, H. I. et al. (2001). A theoretical study of river fragmentation by dams and its effects on white sturgeon populations. *Environmental Biology of Fishes* , v. 60, p. 347-361.
- 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
- Knaepkens, G. et al. (2004). The use of genetic tools for the evaluation of a potential migration barrier for the bullhead. *Journal of Fish Biology* , v. 64, p. 1737-1744.
- 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.
- Leite, R.G.; Cañas, C.; Forsberg, B.; Barthem, R.B.; Goulding, M. (2007). *Larvas dos Grandes Bagres Migradores*. Lima, Peru. 127 pp.
- Lundberg, J.G.; Marshall, L.G.; Guerrero, J.; Horton, B.; Malabarba, M.C.; Wesselingh, F. (1998). The Stage for Neotropical Fish Diversification: A History of Tropical South American Rivers. In: Malabarba, L.R.; Reis, R.E.; Vari, R.P.; Lucena, C.A.S.; Lucena, Z.M.S., (Eds.), *Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes*. Museu de Ciências e Tecnologia, PUCRS. Porto Alegre. pp. 13-48.
- Machado, V.N. (2009). Análise da variabilidade genética da curimatã *Prochilodus nigricans* (Agassiz, 1829) na calha do rio Amazonas e seus principais tributários. Mestrado, UFAM, Manaus.
- McMillan, W. O. and Palumbi, S. R. 1997. Rapid rate of control-region evolution in Pacific Butterflyfishes (*Chaetodontidae*). *J. Mol. Evol.* 45: 473 – 484
- Mezerra, M.; Lurgiàder, 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.
- Mikich, S. B.; Bérnils, R. S. (2004). *Livro vermelho da fauna ameaçada no Estado do Paraná*. Governo do Paraná. ed. Curitiba.
- Montoya-Burgos, J.I. 2003. Historical biogeography of the catfish genus *Hypostomus* (Siluriformes: Loricariidae), with implications on the diversification of Neotropical ichthyofauna *Molecular Ecology* (2003) 12, 1855–1867.

- 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.
- Morita, K.; Yamamoto, S. (2002). Effects of habitat fragmentation by damming on the persistence of stream-dwelling charr populations. *Conservation Biology* , v. 16, p. 1318–1323.
- Nehlsen, W. et al. (1991). Pacific salmon at the crossroads: stocks risk from California, Oregon, Idaho and Washington. *Fisheries* , v. 16, p. 4-21.
- Neraas, L. P.; Spruell, P. (2001). Fragmentation of riverine systems: the genetic effects of dams on bull trout (*Salvelinus confluentus*) in the Clark Fork River system. *Molecular Ecology* , v. 10, p. 1153-1164.
- Nielsen, J. L. et al. (1991). Mitochondrial DNA and nuclear microsatellite diversity in hatchery and wild *Oncorhynchus mykiss* from California, Oregon, Idaho and Washington. *Fisheries* v. 16, p. 4-21.
- NRC (1996). Upstream: salmon and society in the Pacific Northwest. Committee on Protection and Management of Pacific Northwest Anadromous Salmonids. National Resource Council. Portland, OR & Seattle, WA.
- 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.
- Papi, F. (1992). General aspects In *Animal Homing*. London: Chapman & Hall.
- Pascual, M. A.; Quinn, T. P. (1994). Geographical patterns of straying of fall chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) from Columbia River (U.S.A.) hatcheries. *Aquacult. Fish. Manage* , v. 25, p. 17-30.
- Patton, J.L., Silva, M.N.F. and Malcolm, J.R. 2000. Mammals of the Rio Jurua´ and the evolutionary and ecological diversification of Amazonia. *Bulletin of American Museum of Natural History* 44: 1–305.
- 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.
- Petere, M.; Barthem, R.; Cordoba, E.; Gomez, B. 2004. Review of the large catfish fisheries in the upper Amazon and the stock depletion of piraíba (*Brachyplatystoma filamentosum* Lichtenstein). *Rev. Fish. Biol. Fish.*, 14: 403-414.
- Pickles R , Groombridge J , Zambrana V , Van Damme P, Gottelli D , Kundu S, Bodmer R, Ariani C , Iyengar A . 2011. Evolutionary history and identification of conservation units in the giant otter, *Pteronura brasiliensis*. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 61:616–627.
- PORTO, J. I. R. Análise cariotípica e sequenciamento de mtDNA de populações de *Mylesinus paraschomburgkii* (Characiformes, Serrasalminidae) da Bacia Amazônica. (1999). Tese de Doutorado (Doutorado), INPA, Manaus, 1999.
- 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.

- Prance GT . 1982. Biological Diversification in the Tropics. Columbia University Press, New York
- Peakall, R.; Smouse, P.E. 2006. genalex 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes*, 6: 288-295.
- Pritchard, J. K., Stephens, M., and Donnelly, P. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155: 945-959.
- Quinn, T. P. (1991). Models of Pacific salmon orientation and navigation on the open ocean. *Journal of Theoretical Biology* , v. 150, p. 539-545.
- Regard, V., Lagnous, R., Espurt, N., Darrozes, J., Baby, P., Roddaz, M., Calderon, Y., Hermoza, W. 2009. Geomorphic evidence for recent uplift of the Fitzcarrald Arch (Peru): a response to the Nazca Ridge subduction. *Geomorphology* 107, 107–117.
- Renno J, García C, Duponchelle F, Nuñez J . 2005. Biología de las Poblaciones de Peces de la Amazonía y Piscicultura. Comunicaciones del Primer Coloquio Internacional de la Red de Investigación sobre la Ictiofauna Amazónica, Iquitos, Perú.
- Renno JF, Berrebi P, Boujard T, Guyomard R. 1990. Intraspecific genetic differentiation of *Leporinus friderici* (Anostomidae, Pisces) in French Guiana and Brazil: a genetic approach to the refuge theory. *Journal of Fish Biology*, 36, 85–95.
- Renno JF, Hubert N, Torrico JP et al. 2006. Phylogeography of *Cichla* (Cichlidae) in the upper Madera basin (Bolivian Amazon). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 41, 503–510.
- Renno JF, Machordom A, Blanquer A, Boursot P. 1991. Polymorphism of mitochondrial genes in populations of *Leporinus friderici* (Bloch, 1974): intraspecific structure and zoogeography of the Neotropical fish. *Genetica*, 84, 137–142.
- 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.
- Roddaz, M., Brusset, S., Baby, P., Herail, G. (2006). Miocene tidal-influenced sedimentation to continental Pliocene sedimentation in the forebulge–backbulge depozones of the Beni–Mamore foreland Basin (northern Bolivia). *Journal of South American Earth Sciences* 20: 351–368.
- Roddaz, M., Hermoza, W., Mora, A., Baby, P., Parra, M., Christophoul, F., Brusset, S., Espurt, N. (2010). Cenozoic sedimentary evolution of the Amazonian foreland basin system. In: Hoorn, C., Wesselingh, F. (Eds.), *Amazonia, Landscape and Species Evolution: A Look at the Past*. Wiley-Blackwell, Oxford, pp. 61–88.
- 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.
- Rodriguez, F. C. 2009. Estimativa da variabilidade da piramutaba (*Brachyplatystoma vaillantii*) por meio de marcadores moleculares microsatélites e D-loop de quatro localidades da Amazônia diferenças entre calha e tributários. Dissertação (mestrado) – INPA/UFAM.
- Rossetti, D.F., de Toledo, P.M., Goes, A.M., 2005. New geological framework for Western Amazonia (Brazil) and implications for biogeography and evolution. *Quaternary Research* 63, 78–89.
- Rousset, F. (2007). GENEPOP'007: a complete re-implementation of the GENEPOP software for Windows and Linux. *Mol. Ecol. Res.* 8:103-106.
- Ruban, G. I. (1997). Species structure, contemporary distribution and status of the Siberian sturgeon, *Acipenser baerii*. *Environmental Biology of Fishes* , v. 48, p. 221-230.

- Ruffino, M. L. et al. (2000). Perspectivas do manejo dos bagres migradores na Amazônia. In: FISHER, C. F. A. (Ed.). Recursos pesqueiros do médio Amazonas: Biologia e estatística pesqueira. Brasília: IBAMA, p. 141-152.
- Ryman, N. (1991). Conservation genetic considerations in fishery management. *J. Fish Biol.* 39: 211-224.
- Sambrook, J. et al. (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd edition. ed. Cold Springs Harbor, NY: Cold Springs Harbor Laboratory Press.
- Sanches, A. (2007). Estrutura genética populacional *Brycon hilarii* (Characidae) da sub-bacia do rio Miranda, e seu significado para programas de conservação. (2007). 126 f. Doutorado - Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais, Universidade Federal de São Carlos - UFSCar, São Carlos.
- Santos, M. D. C. F. et al. (2007). High levels of genetic variability and panmixia of the tambaqui *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818) in the main channel of the Amazon River. *J. Fish Biol.* , v. 71a, n. 1, p. 33-44.
- Sato, Y.; Godinho, H. (2004). Migratory fishes of the São Francisco River. In: CAROLSFELD, J. et al (Ed.). *Migratory Fishes of South America: Biology, Fisheries and Conservation Status*. Victoria: IDRC, p. 380.
- Schmitt, R. (2005). Filogeografia de *Hypopygus lepturus* Hoedman, 1962 (Gymnotiformes: Rhamphichthyidae) ao longo do médio rio Negro, Amazônia. Mestrado, CPBA, INPA/UFAM, Manaus, 95 pp.
- Schneider, C. H. et al. (2010). Cryptic diversity revealed in mtDNA of the ornamental fish, *Carnegiella strigata*, from the Central Amazon. *Canadian Journal of Fisheries & Aquatic Sciences* , v. submitted.
- Sioli H. (1984). The Amazon and its main affluents: hydrography, morphology of the river courses, and river types. In: *The Amazon: Limnology and Landscape Ecology of a Mighty Tropical River and its Basin* (ed. Sioli H), pp. 127–165. *Monographiae Biologicae* 56, The Netherlands.
- 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.
- Slatkin, M. (1985). Gene flow in natural populations. *Annual Review of Ecology and Systematics* , v. 16, p. 393-430.
- So, N. et al. (2006). Genetic diversity and population history of the migratory catfishes *Pangasianodon hypophthalmus* and *Pangasius bocourti* in the Cambodian Mekong River. *Fisheries Science* , v. 72, n. 3, p. 469-476.
- Souza, E.R. (2008). Filogeografia do gênero neotropical *Fluviphylax* (Cyprinodontiformes: Poeciliidae) das bacias do Amazonas e do Orinoco. Tese de mestrado. INPA/UFAM. Manaus.
- Sunnucks, P. (2000). Efficient genetic markers for population biology. *Tree* 15: 199-203.
- Sunnucks, P. et al. (2000). SSCP is not so difficult: the application and utility of single-stranded conformation polymorphism in evolutionary biology and molecular ecology. *Molecular Ecology* , v. 9, n. 11, p. 1699-1710.
- Taylor, E. B. et al. (2003). Population subdivision in westslope cutthroat trout (*Oncorhynchus clarki lewisi*) at the northern periphery of its range: evolutionary inferences and conservation implications. *Molecular Ecology* , v. 12, p. 2609-2622.

- Taylor, M. I., Verheyen, E. (2001). Microsatellite data reveals weak population substructure in *Copadichrois* sp. 'virginalis kajose', a demersal cichlid from Lake Malawi, Africa. *J. Fish Biol.* 59: 593-604.
- Templeton, A. 2011. *Genética de populações e teoria microevolutiva*. Tradução de: *Population genetics and microevolutionary theory*. Editora SBG.
- Terêncio, M. L. et al. (2012). Molecular signature of the D-loop in the brown pencilfish *Nannostomus eques* (Characiformes, Lebiasinidae) reveals at least two evolutionary units in the Rio Negro basin, Brazil. *Journal of fish biology*, v. 81, n. 1, p. 110–124.
- Terêncio, M.L. (2009). Estimativa da variabilidade genética da região controle do DNA mitocondrial de *Nannostomus eques* (Characiformes, Lebiasinidae) da bacia do rio Negro. Dissertação de Mestrado, CGBEV, INPA, Manaus 102 pp.
- Thompson, J. D. et al. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*.
- 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.
- Toivonen, T., Maki, S., Kalliola, R., 2007. The riverscape of Amazonia – a quantitative approach to the fluvial biogeography of the region. *Journal of Biogeography* 34, 1374–1387.
- Torraco, J.P., Hubert, N., Desmarais, E., Duponchelle, F., Nunez Rodriguez, J., Montoya-Burgos, J., Garcia Davila, C., Carvajal-Vallejos, F.M., Grajales, A.A., Bonhomme, F., Renno, J.-F., 2009. Molecular phylogeny of the genus *Pseudoplatystoma* (Bleeker, 1862): biogeographic and evolutionary implications. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 51, 588–594.
- 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.
- Wehner, R. et al. (1996). Navigation. *The Journal of Experimental Biology*, v. 199, p. 1-261.
- Wei, Q. et al. (1997). Biology, fisheries, and conservation of sturgeons and paddlefish in China. *Environmental Biology of Fishes*, v. 48, p. 241-255.
- Weitzman SH, Weitzman MJ . 1982. Biogeography and evolutionary diversification in Neotropical freshwater fishes with comments on the refuge theory. In: *Biological Diversification in the Tropics*(ed. Prance GT), pp. 403–422. Columbia University Press, New York.
- Wesselingh, F.P., Salo, J.A., 2006. Miocene perspective on the evolution of the Amazonian biota. *Scripta Geologica* 133, 439–458.
- Whitmore TC, Prance GT. 1987. *Biogeography and Quaternary History in Tropical America*. Oxford University Press, Oxford.
- Wofford, J. E. B. et al. (2005). Influence of barriers to movement on within-watershed genetic variation of coastal cutthroat trout. *Ecological Applications*, v. 15, n. 2, p. 628-637.
- 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

Zagonel, L. B. (2009). Avaliação do impacto das barragens na variabilidade e estruturação genética *Pimelodus maculatus* Lacépède, 1803 (Siluriformes, Pimelodidae) do rio São Francisco. (2009). 76 f. - Zoologia, Universidade Federal do Paraná, Paraná.

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'C. de Oliveira', with a stylized flourish at the end.

Dr. Claudio de Oliveira