



UNIVERSIDADE DO ESTADO DO AMAZONAS
ESCOLA DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA E RECURSOS
NATURAIS DA AMAZÔNIA

KÁTIA CILENE GOMES DE CARVALHO

MARCADORES DE DNA MICROSSATÉLITES E ESTIMATIVA DA VARIABILIDADE
GENÉTICA DA PIRAMUTABA (*Brachyplatystoma vaillantii*) NO RIO MADEIRA-AM
NO CONTEXTO DA CONSTRUÇÃO DE HIDRELÉTRICAS

MANAUS
2015

KÁTIA CILENE GOMES DE CARVALHO

**MARCADORES DE DNA MICROSSATÉLITES E ESTIMATIVA DA VARIABILIDADE
GENÉTICA DA PIRAMUTABA (*Brachyplatystoma vaillantii*) NO RIO MADEIRA-AM
NO CONTEXTO DA CONSTRUÇÃO DE HIDRELÉTRICAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia da Universidade do Estado do Amazonas (UEA), como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia e Recursos Naturais.

Orientador: Prof^a. Dr^a. Jacqueline da Silva Batista

**MANAUS
2015**

KÁTIA CILENE GOMES DE CARVALHO

**MARCADORES DE DNA MICROSSATÉLITES E ESTIMATIVA DA VARIABILIDADE
GENÉTICA DA PIRAMUTABA (*Brachyplatystoma vaillantii*) NO RIO MADEIRA-AM
NO CONTEXTO DA CONSTRUÇÃO DE HIDRELÉTRICAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia da Universidade do Estado do Amazonas (UEA), como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia e Recursos Naturais.

Data da aprovação ___/___/___

Banca Examinadora:

Dr. Cleiton Fantin Rezende

Dr^a Waleska Gravena

Dr^a Jacqueline da Silva Batista

**MANAUS
2015**

C331m Carvalho, Kátia Cilene Gomes de
Marcadores de DNA microssatélites e estimativa da
variabilidade genética da piramutaba (*Brachyplatystoma vaillantii*)
no rio Madeira –Am no contexto da construção de hidrelétricas . /
Kátia Cilene Gomes de Carvalho -- Manaus: Universidade do
Estado do Amazonas, 2015.

70 f. : il. color

Dissertação (Mestrado) - Universidade do Estado do
Amazonas - Programa de Pós-Graduação em
Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia, 2015.

1. Marcadores microssatélites 2.
Brachyplatystoma vaillantii 3.Cachoeira de Santo Antônio
4.Cachoeira de Teotoniol I. Título.

CDU:604(043)

*Aos amigos do mestrado e
as minhas sobrinhas Giovanna e Nicolý
pelo amor incondicional!*

Se vai tentar, vá até o fim

Charles Bukowski

AGRADECIMENTOS

Realizei esta etapa da minha vida acreditando que eu não seria capaz, mais através de pessoas extraordinárias, pude concluir essa Dissertação. Por isso agradeço:

A Universidade do Estado do Amazonas – UEA e ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia, na pessoa do Coordenador Dr. Cleiton Fantin.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão de bolsas de estudo.

Ao Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA) e ao Laboratório Temático de Biologia Molecular (LTBM / INPA) por propiciar as condições necessárias de infraestrutura e logística para a execução desse trabalho.

Ao projeto PIRADA – Genética, manejo e conservação dos grandes bagres migradores na Amazônia pelo financiamento deste estudo.

A minha orientadora Dra. Jacqueline da Silva Batista, primeiramente pela oportunidade de acreditar que um profissional de outra área de atuação pudesse contribuir com o grande projeto dos Bagres na Amazônia. Agradeço ainda pelos ensinamentos, pelo grande apoio, incentivos e principalmente pela amizade. Muito Obrigada!!!

As minhas colaboradoras especiais, a Msc. Kyara Formiga e a Msc. Giselle Moura pela amizade, carinho, conselhos, incentivo, apoio... Enfim, faltariam palavras para dizer o quanto sou grata a vocês meninas e muito obrigada é pouco para agradecer a enorme contribuição de trabalho e de vida que compartilhamos.

Ao professor Msc. Geverson Façanha pelo incentivo e apreço nessa jornada.

Aos membros da banca de qualificação pelas contribuições no plano de trabalho (Dra. Maria da Conceição Freitas Santos, Dr. Cleiton Fanti e Dra. Míriam Silva Rafael).

Aos membros da banca de defesa pelas contribuições na dissertação (Dra. Waleska Gravena, Dr. Cleiton Fantin e Dra. Jacqueline da Silva Batista).

Aos amigos da turma de mestrado: Julia do Carmo, Marta, Sarah, Fabianne e Elerson. Obrigado pelos laços de amizade que atamos e pelos nós que ainda vamos compartilhar. Estamos juntos. Sempre!

A minha nova família do Laboratório Temático de Biologia Molecular (LTBM): Giselle Moura, Saulo, piradinhas (Aline, Amanda, Ricardo, Raphael, Patrícia e Janaína), Adriel, Santiago, Shizuka, Paula, Glauco, Érick, Érico, Camila Paiva, Larissa, Rita, Chrysa

(Fofinha), Yumi, Denise... Não tenho palavras para agradecer o apoio, a amizade e a união que encontrei nesse lugar, que não chamo de laboratório, mais de "lar".

A minha mamãe (fofa), as minhas irmãs Cintia, Kelly e Silmara (grandes guerreiras), Sarah e Duda (minhas sobrinhas), por suportarem minha ausência e ainda assim acreditar que a espera foi necessária.

As minhas filhas do coração Giovanna e Nicolly. Meus presentes. Obrigada meninas. Titia ama vocês!

E finalmente ao Deus todo poderoso, que não só me imbutiu na jornada da vida, mas caminhou junto comigo todos os dias. Obrigada Pai!

RESUMO

O rio Madeira é o segundo maior rio da bacia amazônica, com 3.200 km desde a nascente até a sua desembocadura no rio Amazonas. Cobre cerca de 1.380.000 km² em territórios do Brasil, Bolívia e Peru. No sistema continuam 18 corredeiras, das quais Jirau e Teotônio eram as principais devido a sua extensão que delimitava ambientes e navegação. Com a construção dos reservatórios das hidrelétricas de Jirau na ilha do Padre, e de Santo Antônio na Cachoeira de Santo Antônio essas foram extintas e a dinâmica do rio foi alterada incluindo o potencial de distribuição das espécies. O rio Madeira é considerado berçário para algumas espécies de bagres migradores, como *Brachyplatystoma vaillantii*, espécie capaz de migrar cerca de 4.500 km em busca de áreas distintas para alimentação, criação e reprodução sendo altamente explorada e atualmente encontra-se em sobrepesca de crescimento. A variabilidade genética é um componente fundamental para a sobrevivência e adaptação de uma espécie e como a piramutaba é um dos peixes mais capturados e explorados na Amazônia, o conhecimento de sua variabilidade genética é de grande importância para a conservação de seu estoque. Nesse contexto, esse trabalho desenvolveu marcadores moleculares microssatélites para a *Brachyplatystoma vaillantii*, aplicando-os no estudo da variabilidade genética ao longo do rio Madeira, avaliando se as cachoeiras de Santo Antônio e Teotônio eram barreiras ao fluxo gênico da espécie. Esta dissertação divide-se em dois capítulos no formato de artigos científicos. No capítulo I foram desenvolvidos 22 locos microssatélites polimórficos e testada sua amplificação nas demais espécies do gênero *Brachyplatystoma*. O número de alelos por loco variou de 2 a 14 e valores na heterozigosidade observada (H_O) e esperada (H_E) variaram de 0,111 à 0,966, e 0,106 à 0,929, respectivamente. Três locos mostraram desvio significativo para o equilíbrio de Hardy-Weinberg e o desequilíbrio de ligação foi detectado entre os locos Bva05 e Bva06. A amplificação heteróloga destes marcadores moleculares foi feita com sucesso para outras espécies de *Brachyplatystoma* e em um indivíduo de *Phractocephalus hemiliopterus* e de *Pseudoplatystoma punctifer*. No capítulo II foi estimada a variabilidade genética espacial em sete localidades do rio Madeira com o uso de 10 locos polimórficos, dos quais foram obtidos 121 alelos com média de 12,10 por loco, variação de 4 a 18 alelos por loco e tamanho entre 164 a 356 pares de bases (pb). A média da H_O e a H_E foi de 0,768 a 0,833, respectivamente. Foi estimada a variabilidade genética temporal entre 4 períodos anuais utilizando 10 locos microssatélites, dos quais foram obtidos 118 alelos, com média de 11,80, variação de 4 a 17 alelos por loco e tamanho entre 191 a 346 pb. A H_O foi de 0,829 e a H_E foi 0,769, mostrando alta variabilidade na espécie. As estatísticas F de Wright não indicaram estruturação genética entre as localidades ($F_{ST} = 0,013$ para análise espacial e 0,007 para análise temporal). A distância genética entre as sete localidades variou de 0 a 0,032, e na análise da variabilidade genética temporal de 0 a 0,014 indicando distribuição bastante homogênea. A análise *Bayesiana* por meio do programa *STRUCTURE*, apresentou 1 *cluster* ($K = 1$), indicando ausência de estruturação e que a espécie compõem uma única população panmítica no rio Madeira e que as cachoeiras de Teotônio e Santo Antônio não eram barreiras ao fluxo gênico da espécie. Estes dados podem estar mostrando um status histórico da espécie no rio Madeira que poderão auxiliar nas medidas de conservação e manejo de *Brachyplatystoma vaillantii*.

Palavras-chave: Marcadores microssatélites. *Brachyplatystoma vaillantii*. Variabilidade genética. Cachoeira de Santo Antônio. Cachoeira de Teotônio.

ABSTRACT

The Madeira River is the second longest river in the Amazon basin, with 3.200km from its source to its mouth in the Amazon river. The system contained 19 rapids, which Jirau, Teotônio and Santo Antonio were the main due to its length demarcating environments and navigation. With the construction of hydroelectric dams in Jirau on ilha do Padre and of Santo Antonio on Santo Antonio Waterfalls, these were extinguished and the river dynamics has changed including the potential distribution of the species. The Madeira River is considered nursery for some species of migratory catfish, as *Brachyplatystoma vaillantii*, which is able to migrate about 4500 kilometers in search of distinct areas for reproduction, feeding and breeding being highly exploited and currently is in growth overfishing. The genetic variability is an essential component for the survival and adaptation of a species. As piramutaba is one of the most captured fish and exploited in the Amazon, the knowledge of their genetic variability is of great importance for the conservation of its stock. In this context, this work developed microsatellite molecular markers for *Brachyplatystoma vaillantii*, applying them in the study of genetic variability along the Madeira River, considering the waterfalls of Santo Antonio and Teotônio as barriers to gene flow of this species. This dissertation is divided into two chapters in scientific articles format. In Chapter I 22 microsatellite loci were developed and tested its amplification in the other species of the genus *Brachyplatystoma*. There were no monomorphic loci among 37 individuals *B.vaillantii*. The number of alleles per locus ranged from 2 to 14 and the values in the observed and expected heterozygosity ranged from 0.111 to 0.966 and 0.106 to 0.929 respectively. Three loci showed a significant deviation from Hardy-Weinberg equilibrium and linkage disequilibrium was detected between Bva05 and Bva06 loci. A successful cross-amplification was made of these molecular markers for other species of *Brachyplatystoma*, an individual *Phractocephalus hemiliopterus* and *Pseudoplatystoma punctifer*. In the chapter II the spatial genetic variability was estimated in 7 localities of the Madeira River applying in 10 polymorphic loci, of which 121 alleles were obtained with an average of 12.10, range 4-18 alleles per locus and size between 164-356 base pairs. The average observed heterozygosity and expected heterozygosity was from 0.768 to 0.833, respectively. The temporal genetic variability was estimated among four annual periods using 10 polymorphic loci, which were obtained 118 alleles, with an average of 11.80, range 4-17 alleles per locus and size between 191-346 base pairs. The observed heterozygosity was 0.829 and the expected heterozygosity was 0.769, showing high variability in both analyzes. Wright's F statistics did not indicate genetic structure between localities ($F_{ST} = 0.013$ to 0.007 for spatial analysis and spatial analysis). The genetic distance between the seven localities ranged from 0 to 0.032, and the analysis of temporal genetic variability from 0 to 0.014 indicating highly homogeneous distribution. The Bayesian analysis using the program STRUCTURE presented one cluster ($K = 1$), indicating lack of structuring. This data may be showing a historical status of the species on the Madeira River that may help in the conservation and management of *Brachyplatystoma vaillantii*.

Keywords: Microsatellite Markers. *Brachyplatystoma vaillantii*. Genetic Variability. Santo Antônio Waterfall. Teotônio Waterfall.

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I.....	28
Tabela 1. Características dos 22 microssatélites desenvolvidos para <i>Brachyplatystoma vaillantii</i> amostrada no rio Madeira.....	34
Tabela 2. Amplificação heteróloga de 22 marcadores desenvolvidos para <i>Brachyplatystoma vaillantii</i> , em seis espécies do gênero <i>Brachyplatystoma</i> (N=4 para as demias espécies do gênero <i>Brachyplatystoma</i> e 6 para <i>B. platynemum</i>), <i>Phractocephalus hemiliopterus</i> (N = 1) e <i>Pseudoplatystoma punctifer</i> (N = 1)	35
CAPÍTULO II.....	39
Tabela 1. Locais de coleta, rios e números de indivíduos coletados (N) de <i>Brachyplatystoma vaillantii</i> em sete localidades e tamanho amostral retrospectivo ao longo de 10 anos variando entre 3 e 4 anos.	43
Tabela 2. Organização do sistema multiplex contendo 10 locos microssatélites para a genotipagem de 96 amostras de piramutaba.....	44
Tabela 3. Índices de diversidade genética para <i>Brachyplatystoma vaillantii</i> amostrada em seis localidades ao longo do rio Madeira e uma no rio Amazonas, bem como em 4 anos intervalos ao longo de 10 anos (entre 2003 e 2013).....	46
Tabela 4. Alelos privados (pb) e suas frequências (entre parênteses) observados em 10 locos microssatélites de <i>Brachyplatystoma vaillantii</i> em 6 localidades e em 4 anos amostrados. Os valores máximos e mínimos estão destacados.....	47
Tabela 5. Índices de diversidade genética obtidos em 10 locos microssatélites de <i>Brachyplatystoma vaillantii</i> em sete localidades ao longo do rio Madeira e quatro anos 2003 e 2013.	48
Tabela 6. Índices da diversidade genética obtidos com 10 locos microssatélites de <i>Brachyplatystoma vaillantii</i> em sete localidades e quatro anos distribuídos no rio Madeira e Amazonas.	50
Tabela 7. Valores de F_{ST} (diagonal inferior) estimados entre indivíduos de <i>Brachyplatystoma vaillantii</i> em cada duas (par a par) das sete localidades e nos quatro anos amostrados. Valores máximos e mínimos estão em destaque. Os valores de P estão diagonal superior.	51
Tabela 8. Fluxo gênico (par a par) estimado entre as sete localidades e os quatro anos amostrados para <i>Brachyplatystoma vaillantii</i> , a partir dos valores de Nm (número de migrantes por geração baseado nos valores de F_{ST}), utilizando 10 microssatélites. Valores máximos e mínimos estão em destaque.....	52

LISTA DE FIGURAS

1 INTRODUÇÃO.....	13
Figura 1. Contexto do Complexo Hidrelétrico do rio Madeira. 1a Usina Hidreletrica de Santo Antônio.1b Usina Hidreletrica de Jirau	17
Figura 2: Exemplar de <i>Brachyplatystoma vaillantii</i>	20
Figura 3. Hipótese migratória da piramutaba ao longo do sistema Solimões-Amazonas	21
CAPÍTULO II.....	39
Figura 1. Localidades ao longo do rio Madeira onde amostras de piramutaba (<i>Brachyplatystoma vaillantii</i>) foram coletadas: 1. Cachoeira de Jirau, 2. Cachoeira de Teotônio, 3. Cachoeira do Macaco, 4. Cachoeira de Santo Antonio, 5. Porto Velho 6. Humaitá, 7. Itacoatiara. De 1 a 5 no Estado de Rondônia e 6 e 7 no Estado do Amazonas.....	43
Figura 2. Única população ($K = 1$) estimada para <i>Brachyplatystoma vaillantii</i> , amostrada em sete localidades a partir de inferência Bayesiana implementado no programa <i>STRUCTURE</i> 2.3.1, para K variando entre 1 a 10. 2a – Valores da probabilidade a posteriori na vertical e na horizontal dos números de agrupamento (K) possíveis. 2b – Triângulo indicando que os indivíduos se encontram sobrepostos	52

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	13
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	15
2.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	15
2.2 RIO MADEIRA.....	15
2.3 O CONTEXTO DO COMPLEXO HIDRELÉTRICO DO RIO MADEIRA	16
2.4 GRANDES BAGRES MIGRADORES DA AMAZÔNIA	18
2.5 PIRAMUTABA (<i>Brachyplatystoma vaillantii</i>)	19
2.6 IMPORTÂNCIA COMERCIAL DA PIRAMUTABA.....	22
2.7 VARIABILIDADE GENÉTICA E OS MARCADORES MOLECULARES.....	23
2.8 MARCADORES MOLECULARES MICROSSATÉLITES.....	24
3 OBJETIVO GERAL.....	27
3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	27
CAPÍTULO I.....	28
CAPÍTULO II.....	39
4 DISCUSSÃO GERAL.....	62
5 CONCLUSÃO.....	63
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	64

1 INTRODUÇÃO

O rio Madeira é o segundo maior rio da bacia Amazônica com cerca de 3.200 km de extensão da nascente até a foz no rio Amazonas. Sua bacia cobre cerca de um quarto da Amazônia brasileira (125 milhões de hectares). A rica biodiversidade do rio Madeira chama atenção por abrigar mais de 700 espécies de peixes e outros organismos (TORRENTE-VILARA et. al. 2013). Além da importância ambiental, o rio Madeira também é importante economicamente para várias regiões no que diz respeito ao transporte hidroviário, agricultura e pesca (ANTAQ, 2011). O transporte hidroviário no rio Madeira limita-se a cidade de Porto Velho em Rondônia, próximo a extinta Cachoeira de Teotônio, uma das cachoeiras de grande porte de um conjunto 18 cachoeiras que um dia fizeram parte da exuberante paisagem do rio Madeira (ANTAQ, 2011; CELLA-RIBEIRO et. al. 2013).

A construção da Hidrelétrica de Santo Antônio na Cachoeira de Santo Antônio e a construção da Hidrelétrica de Jirau na Ilha do Padre substituíram as barreiras naturais que existiam na área do reservatório e alteraram a dinâmica do rio e pode ainda ter comprometido a dispersão das espécies no rio Madeira, incluindo as de hábito migratório, como a dos grandes bagres migradores da Ordem de peixes Siluriformes, como a piramutaba (*Brachyplatystoma vaillantii*).

Brachyplatystoma vaillantii é um bagre comercialmente importante na região amazônica, explorado tanto pela pesca artesanal quanto pela industrial. A pesca da piramutaba foi fortemente impulsionada a partir de 1971, através de incentivos fiscais do governo federal, porém, o aumento da exploração promoveu a redução do estoque pesqueiro, o que nos últimos anos, vem se traduzindo em sobrepesca de crescimento, na qual indivíduos jovens são capturados e impedidos de reproduzir (DIAS-NETO, MESQUITA, 1988; CHAVES et. al. 2003; MINISTÉRIO DE PESCA E AQUICULTURA, 2010).

A piramutaba nasce e reproduz no alto das cabeceiras dos afluentes dos rios Solimões-Amazonas, alimenta-se no estuário (Belém-PA) até dois anos, cresce ao longo da Amazônia Central, e seguem em direção dos afluentes para a reprodução e desova. Os afluentes são extremamente importantes para o ciclo de vida dos grandes bagres migradores, pois são verdadeiros berçários e contribuem com uma parcela significativa da dinâmica de reprodução (BARTHEM, GOLDING, 1997; FORMIGA-AQUINO, 2004; BATISTA et. al. 2005). A piramutaba pode ser capturada em ampla extensão do rio Madeira e por esta razão, supõe-se que as cachoeiras não sejam barreiras geográficas para o fluxo da espécie (BARTHEM, 1990; SIQUEIRA, 2003).

No entanto, a construção de barragens promove o bloqueio de rotas migratórias, podendo provocar alguns efeitos de ordem genética mesmo que em longo prazo, como a redução do fluxo gênico, isolamento das populações e decréscimo da variabilidade genética, resultando em erosão populacional e diminuição da capacidade de adaptação da espécie ao habitat. Altos níveis de variabilidade genética contribuem para maiores chances de sobrevivência, resistência a doenças e sucesso reprodutivo da espécie. Determinar o nível de variabilidade dentro e entre as populações pode subsidiar decisões acertadas referente ao manejo e conservação de espécies expostas a alterações ambientais ou estruturadas geograficamente (SLATKIN, 1985).

O acesso a variabilidade genética é possível mediante a utilização de marcadores moleculares, entre os quais, os microssatélites cuja utilização se destaca em estudos ecológicos e genéticos populacionais pelas vantagens de co-dominância, altos níveis de polimorfismo, ampla distribuição no genoma de eucariotos. Os marcadores microssatélites são pequenas sequências de nucleotídeos repetidas em *tandem* (fila), capazes de acessar a variabilidade genética dentro e entre as populações, estimar fluxo gênico e verificar estrutura genética populacional de uma espécie. A estruturação populacional das espécies pode ser condicionada por separação geográfica, capacidade de dispersão restrita dos indivíduos e por filopatria (FRANKHAM, 1995; AVISE, 2004).

Formiga-Aquino (2004) a partir do estudo com 942 pares de bases (pb) da região controle do DNA mitocondrial de indivíduos de piramutaba coletados no eixo do sistema estuário-Amazonas-Solimões (Belém, Santarém, Manaus, Tefé e Tabatinga) observou que a espécie compõe um único estoque pesqueiro com alta variabilidade genética. No rio Madeira em Porto Velho (RO), localizado a jusante da antiga Cachoeira de Santo Antônio, o resultado foi similar, porém outras localidades necessitam ser estudadas para confirmar homogeneidade de espécie no rio Madeira (RODRIGUES, 2009). Considerando que a distribuição da piramutaba no trecho das corredeiras do rio Madeira é desconhecida, fez-se necessário o desenvolvimento de marcadores microssatélites para realizar estudos populacionais e estimar a variabilidade genética da piramutaba no rio Madeira, no contexto da construção das hidrelétricas, a fim de disponibilizar informações que contribuam para uma melhor avaliação da influência e impactos das uninas sobre a piramutaba no futuro.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS

A Amazônia Legal possui a superfície de 5.217.423 km² e representa 61,2% do território nacional (SERRA, FERNANDEZ, 2004) e de acordo com a Agência Nacional de Águas (ANA, 2011), a Bacia Amazônica é a mais extensa rede hidrográfica do planeta, com 25.000 quilômetros de rios navegáveis e uma área de 6,1 milhões de quilômetros quadrados distribuídos por seis países, além do Brasil. A grande pluviosidade da região torna os rios permanentemente caudalosos, escoando cerca de um quinto do volume de água doce do mundo, sendo que os rios Juruá, Madeira, Purus e o Amazonas, encontram-se entre os mais extensos do mundo (COSTA, 1998). A Região Neotropical é considerada como a mais rica em número de espécies de peixes de água doce do mundo, no entanto o conhecimento de sua ictiofauna é bastante limitado devido à fragmentação dos estudos (MONTROYA-BURGOS, 2003). A biodiversidade aquática tem grande importância sócio-econômica, ainda assim, ela vem sofrendo alteração e perdas significativas, havendo o risco do equilíbrio fragilizado ser rompido.

2.2 RIO MADEIRA

O rio Madeira é o maior afluente na margem direita do rio Amazonas, englobando uma área de aproximadamente 1,5 milhões de km² distribuído entre o Peru, Bolívia e Brasil, cobrindo cerca de 20% de toda bacia amazônica. Este rio é formado pelos rios Mamoré (Andes bolivianos) e Madre de Dios e Beni (Andes peruanos), distando 3.300 km da nascente até a desembocadura no rio Amazonas. O rio Madeira é responsável por 15% do volume de água e 50% de todo o sedimento que o rio Amazonas recebe. Seus principais afluentes são os rios Abunã, Ji-Paraná (RO) e Aripuanã (AM) (AGRA, 2012).

O sistema do rio Madeira é complexo, caracterizado pela presença de águas barrentas (brancas), alta carga de sedimento, cachoeiras, corredeiras, vegetação e solo próximo às margens adaptados a ciclos alternados de enchentes e vazante, presença de mais de 700 espécies de peixes e várias espécies de outros organismos (GOULDING et. al. 2003; AGRA, 2012; CELLA-RIBEIRO et. al. 2013).

No sentido leste oeste, entre os municípios de Porto Velho e Guajará-Mirim haviam 18 barreiras naturais (corredeiras e cachoeiras) que se estendem por cerca de 300 km. As

cachoeiras de Teotônio (900 m de largura e 30 m de queda) e Jirau (730 m de largura) destacavam-se por suas diferenças acentuadas em elevação média de superfície da água. As demais cachoeiras foram consideradas como corredeiras devido a elevação média de superfície da água serem mais baixas como a Cachoeira de Santo Antônio (CELLA-RIBEIRO et. al. 2013).

As regiões de corredeiras no rio Madeira estavam localizadas em áreas com altitude entre 80 e 170 metros acima do nível do mar. A profundidade no rio Madeira desde a confluência com o rio Beni até as mediações próximas a Cachoeira de Teotônio é bastante complexa, com profundidades variando entre oito e 33 metros. A partir da Cachoeira de Santo Antônio o substrato pedregoso é substituído pelo arenoso lamacento com profundidade entre 10 a 20 metros. O Trecho entre as corredeiras atuavam como um marco divisor entre as comunidades de peixes que apresentam substituição entre os períodos de cheia e seca, indicando a existência de uma zonação ecológica (TORRENTE-VILARA, 2011). Atualmente as cachoeiras de Jirau, Teotônio e Santo Antônio estão sobmersas, juntamente com outras sete corredeiras dentro da área dos reservatórios das Usinas hidrelétricas de Jirau e Santo Antônio (CELLA-RIBEIRO et. al. 2013).

O rio Madeira está entre as três sub-bacias amazônicas com maior potencial hidroelétrico a ser explorado, estimado 12.127,49 MW (ELETROBRÁS, 2003). O aproveitamento hidrelétrico da bacia Amazônica iniciou-se na década de 70 quando grandes investimentos no setor resultaram na construção das hidrelétricas de Tucuruí e Samuel, como parte do projeto estrutural da região e principalmente, da elevação da oferta de energia do País. Na região do rio Madeira o aproveitamento energético foi fortemente influenciado pelas perspectivas de expansão das hidrovias na região que facilitaria o acesso dos países da bacia Amazônica ao Oceano Atlântico e posteriormente ao mercado europeu (CONAB, 2006).

2.3 O CONTEXTO DO COMPLEXO HIDRELÉTRICO DO RIO MADEIRA

O Complexo hidrelétrico do rio Madeira é composto até o momento por duas Usinas: Santo Antônio e Jirau (Figura 1). Juntas somarão ao final de sua implantação o equivalente a 6.450 MW de energia que será agregado ao Sistema Integrado Nacional (SIN), no Estado de São Paulo. O projeto prevê ainda a construção de eclusas para ampliar a navegação e a construção de mais duas usinas, uma binacional na fronteira Brasil/Bolívia e a outra na Bolívia ampliando a ligação inter-regional em aproximadamente 4.400 km entre a fronteira Brasil/Bolívia até o Peru (MORET, GUERRA, 2009; LAATS, 2010).

O complexo é financiado por Instituições Financeiras Multilaterais como (IFMs), o Banco Interamericano de Desenvolvimento (BID), a Corporação Andina de Fomento (CAF) e o Fundo Financeiro para Desenvolvimento da Bacia do Prata (Fonplata) que além de financiar, coordenam a IIRSA (Iniciativa para a Integração da Infraestrutura Regional Sul-Americana), detentora do projeto. As hidrelétricas fazem parte do Programa de Aceleração do Crescimento (PAC) do governo federal brasileiro, que prevê um investimento inicial de US\$ 146,5 bilhões para a infraestrutura energética de 2007 a 2010 (AIDA, 2009).



Figura 1. Contexto do Complexo Hidrelétrico do rio Madeira. 1a Usina Hidreletrica de Santo Antônio. 1b Usina Hidralétrica de Jirau.

Fonte: www.pac.gov.br

As obras da primeira usina tiveram início em 2008. O empreendimento foi instalado na Cachoeira de Santo Antônio, local que deu nome a usina, localizado a 7 km da cidade de Porto Velho a 1.063 km da foz do rio Amazonas. O potencial energético gerado será de 3.150 MW e a energia média de 2.140 MW, ao custo inicial de R\$ 15,1 bilhões (AGRA, 2012). A segunda usina, hidrelétrica de Jirau, foi construída a 120 quilômetros do centro da cidade de Porto Velho em Rondônia, na região conhecida como Ilha do Padre. A obra teve investimento de inicial de R\$ 10 bilhões para geração de 3.750 MW de energia e garantia física média de 2.184,6 MW (ENERGIA SUSTENTÁVEL DO BRASIL, 2013).

Empreendimentos desse porte comprometem a dinâmica do rio, alteram a qualidade da água a montante e a jusante da barragem e afetam a biodiversidade local. A interrupção do fluxo normal do curso do rio provoca mudanças na temperatura e na composição química da água. A temperatura da água no fundo do reservatório é diferente do restante do rio, tornam-se geralmente mais fria e possuem baixa taxa de oxigênio dissolvido. A água da superfície do reservatório é mais quente do que a do rio, praticamente em todas as estações alterando o ciclo de vida da fauna aquática local (SANTOS, 1995; SOUSA, 2000).

Segundo o relatório de Estudo do Impacto Ambiental do rio Madeira (EIA), a construção de barragens terão impacto negativo sobre o pescadeiro em 50% nos cinco primeiros anos após a construção. Fatos históricos revelam que esse tempo pode se estender como aconteceu nas usinas Hidrelétricas de Balbina e Samuel que depois de 10 anos em operação, ainda não tinham a recomposição da massa pesqueira no local barrado (FEARNSIDE, 1990; FEARNSIDE, 2001; SANTOS, 1995).

Do ponto de vista genético, a construção de barragem pode reduzir o fluxo gênico com a interrupção da migração dos peixes, induzir o isolamento das populações e o decréscimo da diversidade genética através de deriva genética e endocruzamento, elevando o risco de extinção da espécie (SLATKIN, 1985).

Na literatura podemos encontrar exemplos desses eventos em algumas espécies de peixes como no estudo com estoques de salmão no Pacífico, que demonstrou que a espécie foi impedida de alcançar o sítio de reprodução, em razão da construção de barragem (NEHLSSEN et. al. 1991). Outros estudos apontam redução da variabilidade genética das populações de salmão à montante de hidrelétrica (COSTELLO et. al. 2003; TAYLOR et. al. 2003).

No estudo de Neraas e Spruell (2001), foram encontradas duas populações de trutas (*Salvelinus confluentus*) geneticamente diferenciadas a montante e a jusante da hidrelétrica de Cabinet Gorge no rio Clark Fork, em Montana (finalizada em 1908). Efeito esse evidenciado quando há quebra nos padrões de migração. Historicamente as trutas do rio Clark Fork faziam parte de uma única população.

De modo geral, barreiras podem promover o isolamento parcial ou total entre as populações da mesma espécie, porém para se obter o registro genético dessas alterações são necessários muitos anos e sucessivas gerações além do conhecimento do status genético da espécie antes da construção dos empreendimentos em uma escala de tempo. O rio Madeira se encontra nesse contexto, dois novos empreendimentos alterando a dinâmica local e barreiras que necessitam de avaliação quanto a sua importância ecológica para as espécies que habitam nas águas desse rio, principalmente as espécies de importância comercial.

2.4 GRANDES BAGRES MIGRADORES DA AMAZÔNIA

Os grandes bagres migradores da Amazônia pertencem a Ordem Siluriformes, família Pimelodidae. Em toda a região Amazônica os bagres são conhecidos como peixes de couro ou ainda peixes lisos, por deterem a pele do corpo sem a cobertura de escamas. Os peixes dessa família apresentam características morfológicas comuns, como nadadeiras

adiposas bem desenvolvidas, corpo sem placas, acúleos nas nadadeiras peitorais e dorsal, presença de um par de barbilhões longos na maxila superior e dois pares na maxila inferior (NELSON, 1994). A família Pimelodidae compõe aproximadamente 300 espécies que se distribuem ao longo dos rios da América do Sul, América Central, Ilhas do Caribe e Sul do México (NELSON, 2006).

Além de numerosos, os bagres dessa família são economicamente importantes tanto para a pesca artesanal como para a industrial. Algumas espécies de bagres são valorizadas na pesca industrial por não possuírem espinhas, originando produtos secundários e de maior valor econômico como filés e postas (IBAMA, 2007). Economicamente os peixes lisos da família Pimelodidae representam aproximadamente 85% da pescaria de bagres na região e quase 80% deste total é obtido somente pela captura de piramutaba (*Brachyplatystoma vaillantii*, dourada (*B. rousseauxii*), filhote capapreta (*B. capapretum*) e piraíba (*B. filamentosum*), capturados por frotas pesqueiras ao longo do sistema de rios Solimões/Amazonas desde Belém, no estuário do rio Amazonas até Pucallpa, no Peru a 5.500 km a oeste próximo aos Andes (BARTHEM, GOULDING, 1997; BARTHEM, GOULDING, 2007).

2.5 A PIRAMUTABA (*Brachyplatystoma vaillantii*)

A piramutaba (*Brachyplatystoma vaillantii*) recebe algumas denominações conforme as regiões geográficas onde ocorre, tais como pira-botão, mulher ingrata, piramutaba no Brasil, pirabuton ou blanco-pobre na Colômbia, bagre no Equador e manitoa no Peru (FABRÉ, BARTHEM, 2005) (figura 2). A piramutaba é um peixe demersal, geralmente capturado em profundidades de até 40m, em águas doces e salobras de baixa salinidade, mais distribuída em período chuvoso (PAIVA, 1997).

A espécie foi descrita pela primeira vez por Valenciennes (1840). A classificação taxonômica dada por Cervigón et. al. (1992) juntamente com Szpilman (2000) e após revisão taxonômica do gênero (LUNDBERG, AKAMA, 2005) sistematizaram a espécie da seguinte forma.

Reino: Animalia

Filo: Chordata

Classe: Actinopterygii

Ordem: Siluriformes

Família: Pimelodidae

Tribo: Brachyplatystomatini

Gênero: *Brachyplatystoma*

Espécie: *Brachyplatystoma vaillantii*

Morfologicamente a piramutaba distingue-se dos demais bagres porque apresenta cabeça chata recoberta por uma fina camada de pele, focinho fortemente deprimido, olhos pequenos localizados na parte dorsolateral, os barbilhões são longos depositados no maxilar superior, a nadadeira caudal possui forma de furca com raios longos e filamentosos, a base da nadadeira adiposa é mais longa que a base da nadadeira anal, a região dorsal apresenta coloração cinza-escuro e a região ventral a coloração é clara, os dentes são deprimidos dispostos em bandas distribuídos tanto no maxilar superior quanto no inferior. A estimativa de vida da piramutaba é de 22 anos, podendo atingir 105m (seu maior tamanho já registrado) e chegar ao peso de 10 kg. A idade de recutamento ocorre por volta de 2 anos de idade e a maturação sexual em torno de 3 anos (BARTHEM, 1990; BARTHEM, GOULDING, 1997; FABRÉ, BARTHEM, 2005).



Figura 2: Exemplar de *Brachyplatystoma vaillantii*

A piramutaba juntamente com outras espécies do gênero *Brachyplatystoma*, possui uma ampla distribuição geográfica, compreendendo as bacias do rio Amazonas, Tocantins, Orinoco, Parnaíba e pequenos rios que desaguam entre a costa destes rios. Na Amazônia encontram-se principalmente nos tributários do sistema Solimões-Amazonas (MEES, 1974; BARTHEM, GOULDING, 1997). Quanto ao ciclo de vida, a piramutaba é capaz de realizar longa migração, aproximadamente 4.500 Km para completar seu ciclo de vida (BARTHEM, GOULDING, 1997).

Godoy (1979) foi o primeiro a realizar um trabalho sobre o modelo de migração da piramutaba utilizando o método de marcação e captura, mas seu resultado foi inconclusivo devido à baixa porcentagem (0,67%) de indivíduos recuperados em relação ao total de marcados (9.296). Posteriormente Barthem e Goulding (1997) apresentaram um modelo de

migração para a piramutaba a partir de levantamento de captura e de dados merísticos e morfométricos. O postulado descreve que a migração da piramutaba inicia-se em junho e segue até novembro, antes da subida do rio. Os adultos juntamente com os jovens deixam a região do estuário e nadam em direção oeste da Amazônia, a fim de realizar a desova na cabeceira dos tributários dos rios Solimões e Amazonas. Após a desova, as larvas são levadas pela correnteza passivamente com eventuais paradas e redução da velocidade para alimentação (fitoplâncton, zooplâncton e larvas de insetos) até a região do estuário do rio Amazonas, onde passam os dois primeiros anos de vida. Depois migram para Amazônia Central onde crescem e quando adultos retornam aos afluentes iniciando novo ciclo (figura 3).

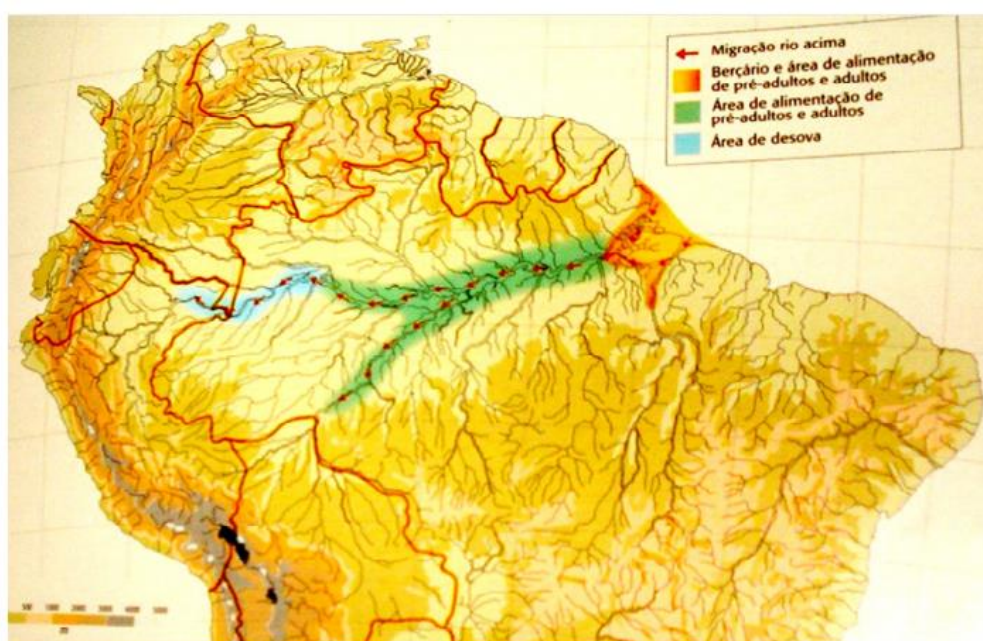


Figura 3. Hipótese migratória da piramutaba ao longo do sistema Solimões-Amazonas (Fonte: Barthem e Goulding, 2007)

A hipótese migratória da piramutaba descrita por Barthem e Goulding (1997) foi fortalecida por Formiga-Aquino (2004) no qual em um estudo com 942 pb da região controle do DNA mitocondrial de 100 indivíduos coletados em cinco pontos ao longo do eixo estuário-Amazonas-Solimões (Belém, Santarém, Manaus, Tefé e Tabatinga), confirmou a existência de um único estoque pesqueiro na região amostrada e, também revelou a presença de alta variabilidade genética.

Batista et. al. (2005), observaram os cardumes de piramutabas migrando no sentido Oeste do estuário (Belém-PA) com gradativa diminuição dos indivíduos do grupo ao longo do percurso e concluíram que os indivíduos do grupo se dispersavam da calha principal em

direção aos afluentes como os rios Madeira, Içá, Japurá provavelmente para a reprodução e desova. Os afluentes funcionando como verdadeiros berçários, contribuindo com uma boa parcela da diversidade genética populacional e na manutenção de todo o sistema dinâmico de migração dessa e de outras espécies.

2.6 IMPORTÂNCIA COMERCIAL DA PIRAMUTABA

Os peixes se destacam como um grupo de elevado número de espécies e pela contribuição como uma das principais fontes de alimento, trabalho, lazer e renda para a população ao longo da bacia Amazônica. A pesca na região Amazônica constitui um dos maiores sustentáculos da economia amazônica e brasileira, gerando mais de 100 mil empregos diretos e 16 mil somente no rio Madeira (CABRAL JR, ALMEIDA, 2006).

A atividade pesqueira no Amazonas recai sobre várias espécies de peixes incluindo algumas espécies de bagres como a dourada e a piramutaba. *Brachyplatystoma vaillantii* é uma das espécies mais importantes comercialmente na região Amazônica, principalmente para o mercado de exportação. É uma das principais espécies de bagres em volume de captura em várias regiões na amazônia brasileira. Sua exportação já atingiu US\$ 13 milhões somente no estuário, onde ocorre à pesca industrial em 1980, no estado do Pará. A pesca da piramutaba foi praticada artesanalmente até o final da década de 60. Já na década seguinte, o Governo Federal disponibilizou recursos financeiros para incentivar a pesca no país, o que possibilitou a organização de frotas pesqueiras sofisticadas que impulsionou a atividade pesqueira principalmente na região do estuário Amazônico (CASTILLO, 1978).

A pesca intensiva da piramutaba teve início em 1971 e os desembarques atingiram o ápice em 1977 com 28.829 t do pescado. Sua menor marca ocorreu em 1992 quando o total do desembarque atingiu apenas 6.299t (GOULDING, BARTHEM, 2003). Castillo (1978) acredita que os dados fornecidos pelas indústrias pesqueiras são tendenciosos, uma vez que o número relatado não corresponde ao total de pescado e sim ao total desembarcado.

No ano de 1980, a piramutaba alcançou o nono lugar na lista de produtos de exportação do estado do Pará e em 1986 e 1987 foi o terceiro principal pescado exportado pelo Brasil. No ano de 2000, a piramutaba ocupou o 2º lugar na captura da pesca industrial com 18.642 t (ALMEIDA, 2006). Desde o maior pico de pesca até os dias atuais, a piramutaba não recuperou o total histórico de 28.829 t desembarcado em 1977 e a produção anual tem se mantido em torno de 24.000t ano (MINISTÉRIO DE PESCA E AQUICULTURA, 2010).

Dias-Neto e Mesquita (1988) observaram que a piramutaba poderia estar sofrendo sobrepesca, baseados no declínio no número de capturas apresentados pelo desembarque a partir de 1977, apesar de que, em 1982 e 1983 os peixes pequenos passaram a ser aproveitados e aparentemente ocorreu um aumento do desembarque da piramutaba.

Estudo sobre o monitoramento do tamanho médio predominante de *B. vaillantii* foi realizado por Oliveira e Camargo (2009) nos meses de julho de 2008 a julho de 2009. Foi observada a redução de pelo menos cinco centímetros entre o tamanho médio dos indivíduos de *B. vaillantii* de um ano para o outro. Estes dados fortalecem a questão da sobrepesca de crescimento da piramutaba, logo seu estoque pesqueiro necessita de monitoramento quanto às questões relacionadas à sobrepesca e a introdução de barragens, a fim de promover estratégias para o manejo e conservação desse estoque.

Segundo Jimenez et. al. (2013) a alta exploração pesqueira associada ao sistema de pesca industrial com rede de arrasto aumentam os indícios de sobrepesca. Apontam também que a composição sazonal da ictiofauna amazônica no Estuário amazônico em 2009, indicou que a pressão pesqueira com rede de arrasto atua sensivelmente sobre os indivíduos de pequeno (20-30 cm) e médio porte (30-50 cm) e que a captura de *B. rousseauxii* e *B. vaillantii*, foi composta predominantemente por juvenis nos períodos de seca e cheia, o que fortalece a questão da sobrepesca.

2.7 VARIABILIDADE GENÉTICA E OS MARCADORES MOLECULARES

O aumento da exploração dos recursos naturais brasileiros tem produzido graves impactos sobre a ictiofauna nacional. Entre as ações humanas mais impactantes estão a construção de usinas Hidrelétricas, a sobrepesca, a pressão pesqueira e outros. A implantação de barragens afeta diretamente a rota migratória dos peixes, podendo levar a fragmentação e redução da variabilidade genética das populações através dos processos de deriva genética e endocruzamento, erosão genética em razão da redução do fluxo gênico, levando ao isolamento das populações (SLATKIN, 1985).

Segundo Knaepkens et. al. (2004) o risco de extinção deve ser considerado no processo de implantação de usinas, uma vez que o isolamento populacional pode levar a endogamia, diminuir a adaptabilidade da população, levando também a redução da diversidade genética dentro das populações e aumento da diferenciação genética populacional.

O estudo da estimativa da variação genética é fundamental para subsidiar políticas de conservação e manejo sustentável. A sobrevivência das populações naturais depende

grandemente da variabilidade genética, e sua redução entre as populações reduz a habilidade de sobrevivência a mudanças climáticas e ambientais durante o seu processo evolutivo (RYMAN, 1991; FRANKHAM, 1995). Em contrapartida, índices elevados de variação aumentam potencialmente a capacidade das populações em responder positivamente as mudanças ambientais, possibilitando a sobrevivência em uma grande variedade de ambientes (CARVALHO, 1993).

Sob o ponto de vista genético populacional, as pesquisas nesse campo podem responder a muitas especulações relacionadas 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).

A avaliação do padrão de distribuição da variabilidade genética dentro e entre populações, a identificação estrutural assim como outros parâmetros de uma espécie é possível ser acessado através marcadores moleculares (THUESEN et. al. 2008; ESGUÍCERO, ARCIFA, 2010).

A partir da década de 80 os marcadores moleculares tornaram-se mais úteis para estudos relacionados à variabilidade genética populacional. Os marcadores desenvolvidos para estas finalidades podem ser divididos em três grupos: em variantes de proteínas (alozimas), os de polimorfismo de sequência de DNA e os baseados em variação do DNA repetitivo. Os marcadores moleculares baseados no polimorfismo do DNA destacam-se por promoverem acesso às diversas mutações contidas em diferentes regiões analisadas do genoma (FERREIRA, GRATTAPAGLIA, 1996).

Os marcadores moleculares são locos gênicos que apresentam variabilidade e podem ser utilizados para detectar diferenças entre indivíduos e diferenças intra e entre as populações. Podem ser definidos como todo e qualquer fenótipo derivado de um gene expresso ou locos presentes na molécula de DNA (AVISE, 2004).

2.8 MARCADORES MOLECULARES MICROSSATÉLITES

Os marcadores moleculares microsatélites, também conhecidos como *Simple senquence repeats* (SSR), *Variable Number of Tandem Repeats* (VNTR), *Sequence Tagged Microsatellites* (STMS) ou ainda *Single Sequence Length Polymorphisms* (SSLP), são pequenas sequências repetidas em *tandem* (em fila) contendo de um a seis nucleotídeos, frequentemente encontradas nos genomas de eucariotos (SCHLOTTERER, 2004). Dentre os

diversos marcadores moleculares existentes, os microssatélites destacam-se nos estudos de identificação individual, investigação de vínculo familiar, mapeamento genético em seres vivos, estudos genético-populacionais e outros (FERREIRA, GRATTAPAGLIA, 1996).

Os microssatélites podem ser classificados por motivos de repetições em mononucleotídeo, dinucleotídeo, tetranucleotídeo, pentanucleotídeo e hexanucleotídico. Goldstein e Schlötterer (1999) estabelecem uma classificação quanto à composição nucleotídica em microssatélites perfeitos, aqueles sem interrupção na sequência de nucleotídeos (ex.: GTGTGTGTGTGTGT), os imperfeitos, a sequência apresenta uma pequena interrupção (ex.: GTGTGTGTcGTGT), os interrompidos, aqueles que outra sequência interrompe o motivo de repetição (ex.: GTGTGTatcgGTGTGT) e os compostos, quando há dois microssatélites com motivos de repetições distintos e adjacentes (ex.: GTGTGTGTACACACACACAC).

Os microssatélites possuem altas taxas mutacionais, variando entre 10^{-2} a 10^{-6} nucleotídeos/loco/por geração (SHÖTTERER, 2000). Lanzaro et al. (1995) apontam os escorregões da DNA polimerase (*slippage*) ou *crossing over* desigual, como hipóteses para os processos mutacionais que adicionam ou eliminam sequências adjacentes de nucleotídeos. Os escorregões da DNA polimerase são apontados como os principais responsáveis pelas mutações dos microssatélites, porém outro mecanismo ainda não muito bem esclarecido tem sua parcela de contribuição, são os relacionados aos retrotransposons, no qual os microssatélites ricos em adenina são gerados pela extensão terminal 3' dos retrotranscritos (ARCOT et. al. 1995).

Os mecanismos de evolução dos microssatélites são pouco conhecidos, em particular os modelos do alelo infinito, de mutação gradual em passos e o modelo de duas fases. Modelo IAM (*Infinite Allele Model*) ou modelo do alelo infinito consiste na mutação que ganha ou perde um ou mais motivo de repetição de forma aleatória, resultando em um novo alelo (KIMURA, CROW, 1964). O Modelo SMM (*stepwise Mutation Model*) ou modelo de mutação gradual em passos é o modelo mais aceito onde a mutação em determinado alelo se dá pela repetição de um motivo de cada vez (SLATKIN, 1985). O modelo TPM (*Two Phase model*) ou modelo de duas fases é uma extensão do modelo de SMM, pode atingir maiores proporções mutacionais de processos diferentes e está ligado ao modelo da coalescência e históricos demográficos para estimar o número de repetições nos microssatélites (DI RIENZO et. al. 1994).

Muitas são as vantagens dos microssatélites nos estudos ecológicos e populacionais. Segundo Goldstein e Pollock (1997) os marcadores microssatélites são altamente

polimórficos, co-dominantes, multialélicos, amplamente distribuído no genoma de eucariotos e os locos desenvolvidos podem ser compartilhados entre laboratórios podendo ser usados em estudos heterólogos. Esses marcadores também apresentam desvantagens como a complexidade das técnicas, a demanda de tempo, alto custo que limita muitas vezes o seu uso, modelos evolutivos não esclarecidos, erro de genotipagem pela presença de artefatos, *dropout*, alelos nulos e *stutters* (MCCOUCH, et. al. 1997; FERREIRA, GRATTAPAGLIA, 1996).

Apesar das desvantagens, o uso desse marcador tem sido importante na detecção de locos polimórficos, na caracterização de um indivíduo em uma população, no monitoramento da transmissão de genes através de gerações, possibilitando acelerar a estimativa de parâmetros genéticos que são de considerável interesse em estudos de diversidade, padrões de estrutura genética e conservação de populações (CHASE et. al. 1996; GOLDSTEIN, SCHLOTTERER, 1999). Marcadores microssatélites já foram desenvolvidos para a caracterização e estudos ecológicos e genéticos populacionais visando o monitoramento e conservação de peixes de importância econômica, entre os quais estão: o pirarucu (*Arapaima gigas*) (FARIAS et al. 2003), o aruanã (*Osteoglossum bicirrhosum*) (SILVA et al. 2009), o cardinal (*Parachanna axelrodi*) (BEHEREGARAY et. al. 2004) e o tambaqui (*Colossoma macropomum*) (SANTOS et al. 2009). Entre os peixes Siluriformes podemos citar algumas espécies: o pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*) (REVALDAVES et al. 2005), *Pimelodella chagrasi* (MOESER, BERMINGHAM, 2005), o grande bagre do Mekong (*Pangasianodon gigas*) (NGAMSIRI et. al. 2006), o jaú (*Zungaro jahu*) (CARRILLO-AVILA et. al. 2009), o surubim (*Pseudoplatystoma punctifer*) (SAULO-MACHADO et. al. 2010), a dourada (*Brachyplatystoma rousseauxii*) (BATISTA et. al. 2010) e o filhote capapreta (*B. capapretum*) (LIRA-CORDEIRO, et. al. 2014). Foram desenvolvidos 15 locos microssatélites para piramutaba (*B. vaillantii*) (RODRIGUES et al. 2009), dos quais foi possível somente o uso de seis locos para estimar a variabilidade genética da espécie no sentido norte-sul da bacia amazônica (RODRIGUES et. al. 2009). O desenvolvimento de novos locos microssatélites pode ampliar e favorecer a melhor escolha desses marcadores no estudo da variabilidade genética da piramutaba.

Marcadores moleculares também foram utilizados para avaliar a variabilidade genética de tilápia nilótica (*Oreochromis niloticus*) (MOREIRA et. al. 2007); peixe flecha de prata (*Odontesthes bonariensis*) (TAVARES et. al. 2011), Piabanha (*Brycon insignis*) (MATSUMOTO, HILSDORF, 2011), Babão (*Brachyplatystoma platynemum*) (OCHOA et. al. 2015) e surubim (*Pseudoplatystoma reticulatum*) (ABREU et. al. 2009).

3 OBJETIVO GERAL

- Isolar e caracterizar marcadores microssatélites do genoma da espécie *Brachyplatystoma vaillantii* a fim de utilizá-los para estudos em genética populacional e na estimativa da variabilidade genética espaço temporal da espécie ao longo do rio Madeira.

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Isolar e caracterizar marcadores microssatélites para *Brachyplatystoma vaillantii*;
- Verificar o alcance da amplificação heteróloga dos locos desenvolvidos para piramutaba nas demais espécies de *Brachyplatystoma*;
- Estimar a variabilidade genética espacial de *Brachyplatystoma vaillantii* ao longo do Rio Madeira;
- Estimar e comparar a variabilidade genética temporal, da piramutaba em intervalos de três e quatro anos no rio Madeira;
- Avaliar se a Cachoeira de Santo Antônio, atual Usina Hidrelétrica Santo Antônio, e a Cachoeira de Teotônio constituíam barreiras para fluxo gênico para *Brachyplatystoma vaillantii*.

CAPÍTULO I

Isolamento, caracterização e amplificação interespecífica de marcadores microssatélites para *Brachyplatystoma vaillantii* (Siruliformes: Pimelodidae).

Isolamento, caracterização e amplificação interespecífica de marcadores microssatélites para *Brachyplatystoma vaillantii* (Siruliformes: Pimelodidae).

CARVALHO, K. C. G^{1,2}; BATISTA, J. S²; GUIMARÃES-MARQUES, G.M²;
FORMIGA, K. M.².

1-Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia, Univ. do Estado do Amazonas, Brasil, Manaus.

2-Laboratório Temático de Biologia Molecular (LTBM), Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Brasil, Manaus.

RESUMO

A piramutaba (*Brachyplatystoma vaillantii*) é um bagre comercialmente importante na região amazônica, explorado tanto pela pesca artesanal quanto pela industrial. Vinte e dois marcadores microssatélites foram isolados e caracterizados em 29-37 indivíduos da espécie. Foi obtido um total de 230 alelos. O número de alelos por loco variou entre 2 a 14, com média de 10,45. A heterozigosidade observada (H_O) e esperada (H_E) variou entre 0,111 a 0,966 (média de 0,669) e 0,106 a 0,917 (média de 0,747), respectivamente. Três locos não se mostraram em equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) e desequilíbrio de ligação foi detectado entre os locos Bva05/Bva06. A amplificação interespecífica resultou entre 5 a 22 locos polimórficos entre as seis espécies do gênero *Brachyplatystoma*, 16 locos para *Phractocephalus hemiliopterus* e 19 *Pseudoplatystoma punctifer*. Os marcadores obtidos poderão ser utilizados em estudos genéticos que poderão contribuir para subsidiar políticas de conservação e manejo da Piramutaba e as demais espécies do gênero *Brachyplatystoma* e espécies *P. hemiliopterus* e *P. punctifer*.

Palavras-Chave: Piramutaba. Microssatélites. *Brachyplatystoma vaillantii*. Amplificação interespecífica.

1 INTRODUÇÃO

Brachyplatystoma vaillantii (VALENCIENNES, 1840) é um bagre migrador pertencente à família Pimelodidae, popularmente conhecido como piramutaba (NELSON, 2006). Realiza longas migrações, cerca de 4.500 Km, em busca de áreas distintas para a reprodução, alimentação e criação para completar seu ciclo de vida (BARTHEM, GOULGING, 1997). Na Amazônia, a espécie encontra-se principalmente nos tributários do sistema Solimões-Amazonas, mas distribui-se por toda bacia do rio Amazonas, Tocantins, Orinoco e Parnaíba (MEES, 1974; BARTHEM, GOULDING, 1997), onde é fortemente

explorado comercialmente desde a década de 70, tanto pela pesca artesanal quanto a industrial.

A espécie compreende uma única população geneticamente homogênea que se distribui no sistema Estuário-Amazonas-Solimões de acordo com dados genéticos, obtidos a partir dos estudos com indivíduos de cinco localidades da Amazônia brasileira: Belém, Santarém, Manaus, Tefé e Tabatinga (FORMIGA-AQUINO, 2004).

Segundo relatórios do Ministério de Pesca e Aquicultura (MINISTÉRIO DE PESCA E AQUICULTURA, 2010), a piramutaba é uma das espécies dentro da Ordem dos Siluriformes de maior importância econômica na região amazônica, mais a excessiva exploração, remete a espécie para um status de sobrepesca de crescimento, representada pela captura de um grande número de indivíduos antes da maturação sexual, podendo comprometer a variabilidade da espécie (DIAS-NETO, MESQUITA, 1988; RUFFINO, 2001; BARTHEM, FABRÉ, 2003; CHAVES et. al. 2003). A construção de hidrelétricas em rios que fazem parte do sistema migratório da espécie, também pode ser agravante para variabilidade da piramutaba no futuro. Neste cenário fez-se necessário o desenvolvimento de marcadores capazes de obter informações sobre a variabilidade genética das populações naturais de piramutaba do rio Madeira, a fim de gerar dados para utilização no manejo sustentável e planejamento de conservação. Foram desenvolvidos 15 locos microssatélites para piramutaba (*B. vaillantii*) (RODRIGUES et. al., 2009). No entanto, o desenvolvimento de novos locos microssatélites pode promover estudo da variabilidade genética da espécie no intuito de disponibilizar e melhor favorecer a escolha desses marcadores.

Nesse contexto foram isolados e caracterizados mais 22 marcadores microssatélites polimórficos para piramutaba e também foram testados em seis espécies do gênero *Brachyplatystoma*, em *Phractocephalus hemiliopterus* e em *Pseudoplatystoma punctifer*.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Os marcadores microssatélites foram desenvolvidos a partir da construção de uma biblioteca segundo o protocolo proposto por Billotte et. al. (1999), utilizando o DNA total de um indivíduo coletado do município de Tabatinga (Amazonas, Brasil) (SAMBROOK et. al. 1989). O DNA foi digerido com a enzima *RsaI* (Invitrogen) (10 u/ul) e ligado aos adaptadores *Rsa 21* 10U/μl (5' - CTCTTGCTTACGCGTGGACTA - 3') e *Rsa25* 10U/μl (5'-TAGTCCACGCGTAAGCAAGAGCACA - 3'). Os Fragmentos contendo regiões

microsatélites foram hibridizados com sondas (CT)₈ e (GT)₈, amplificados via Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), ligados ao vetor de clonagem pGEM-T (Promega) e eletrotransformados em células competentes *XLI-Blue* de *Escherichia coli*. As células competentes foram incubadas em placa contendo X-Gal/IPTG, meio sólido Luria-Bertani (LB) e ampicilina (100 mg/ml) por 22 horas a 37°C. Os clones positivos foram selecionados e cultivados em placas ELISA contendo meio de cultura 2YT-HMFM e ampicilina (100 mg/ml). O DNA recombinante de 240 clones foi extraído (SAMBROOK et. al. 1989), amplificado com os iniciadores de T7 (*forward*) e SP6 (*reverse*), Kit *Big Dye Terminator v3.1* kit (Life technologies) e eletroinjetado em analisador automatizado *ABI 3130xl* (*Life technologies*). As sequências foram alinhadas e editadas com os programas *CHROMAS 2.24* (*Technelisyum Pty Ltd*) e *BIOEDIT 7.0.9.0* (Hall, 1999). O desenho de 40 iniciadores foi realizado no *WEBSAT* (MARTINS et. al. 2009) e *PRIMER3* (ROZEN, SKALETSKY, 2000), e no início da extremidade 5' de cada *Primer forward* foi adicionado uma cauda M13, a fim de permitir a marcação por fluorescência segundo o protocolo econômico de Schuelke (2000).

Os fragmentos contendo microsatélites foram amplificados via PCR seguindo o parâmetro descrito por Batista et. al. (2010). Para um volume final de 10µl do amplificado foi utilizado 10 ng de DNA genômico, 0,4 µM de cada *primer forward* com cauda M13 marcado com a fluorescência (*FAM, HEX ou NED*), 0,4 µM do *primer* reverso, dNTPs (1nM), 25mM de MgCl₂, 10X de tampão (10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, pH 8,4) e 0,5 U de *goTaq* DNA Polymerase (Promega). A reação ocorreu em duas etapas: a primeira consistiu em desnaturação (68°C, 1 min; 92°C, 30s) seguida por 30 ciclos de 30s a 92°C, 35s na temperatura de anelamento do *primer* específico (Tabela 1), 35s a 72°C de extensão; a segunda consistiu no anelamento do *primer* M13F marcado com fluorescência e é composto por 20 ciclos com o seguinte tempo e perfil de temperatura: 20s a 92°C, 30s a 53°C e 30s a 72°C, e uma extensão final a 72°C 15 min e 68°C 15 min. O produto amplificado foi analisado por eletroforese em gel de agarose 1,5%, corado com *GelRed* (*Biotium*) e visualizado em fotodocumentador UVP Biodoc (*Imaging System*).

O produto de PCR dos locos amplificados foi submetido à eletroforese capilar em Analisador automático *ABI 3130xl* (*Life technologies*). Foi adicionado marcador de bandas conhecido *size ROX-labeled* (DEWOODY et. al. 2004) em cada amostra para estimativa do tamanho e padrão dos alelos dos indivíduos genotipados. As genotipagens foram analisadas com o auxílio do programa *GeneMarker 1.97* (*SoftGenetics*). Vinte e dois locos microsatélites foram caracterizados em 29-37 indivíduos de *B. vaillantii* de três localidades

do rio Madeira: Porto Velho-RO (N = 23), Cachoeira de Santo Antônio-RO (N = 8) e Humaitá-AM (N = 6).

Os parâmetros genéticos foram checados com auxílio dos programas: *MSTOOLS* 3 (PARK, 2001) para calcular o conteúdo de polimorfismo informativo (PIC), heterozigosidade esperada (H_E) e observada (H_O); *GENEPOP* 4 (RAYMOND, ROUSSET, 1995) para testar o equilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE) e o programa *FSTAT* 2.9.3.2 (GOUDET, 2002) para as estatísticas descritivas (F_{IS}) e desequilíbrio de ligação. A presença de alelos nulos, *dropout* e *stutters* foram checadas no *MICRO-CHECKER* (VAN OOSTERHOUT et. al. 2004).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dos 240 clones obtidos na construção da biblioteca genômica, 231 amplificaram via PCR e 211 apresentaram insertos. Após o seqüenciamento as sequencias foram conduzidas para a formação dos *contigs*, resultando em 139 *contigs* de tamanho médio de 653 pb. Foi observado redundância em 65,88% dos *contigs*. Foram desenhados 57 iniciadores dos 186 microssatélites observados, com uma média de 1,34 microssatélites por clone. Quarenta pares de *primers* foram sintetizados.

Os 40 locos microssatélites apresentaram a seguinte classificação quanto à composição nucleotídica: 25 perfeitos (62,5%), 1 imperfeito (2,5%), 4 interrompido (10,0%) e 10 composto (25,0%), e quanto ao motivo de repetição: 33 dinucleotídeos, 2 trinucleotídeos, 2 tetranucleotídeos e 3 pentanucleotídeos. Esses resultados coincidem com relatos de Brodani et. al. (2007), que relata grande quantidade de microssatélites perfeitos e dinucleotídeos em vertebrados em geral.

Foram otimizados e caracterizados 22 locos microssatélites polimórficos para *B. vaillantii* (Tabela 1). O número de alelos por locos variou de 2 a 14, com média de 10,45 por loco. As heterozigosidades observada e esperada variaram de 0,111 a 0,966 (média de 0,669) e 0,106 a 0,929 (média de 0,747) respectivamente. O PIC (BOTSTEIN et. al. 1980) variou entre 0,170 a 0,908, com a média de 0,763. Três locos (Bva21, Bva32 e Bva33) mostraram significativos desvios no equilíbrio de HWE após correção de Bonferroni ($P: (5\%) \leq 0,0022$) (Rice, 1989). O desequilíbrio de ligação foi observado entre os locos Bva05 e Bva06 ($P: (5\%) \leq 0,00021$). Quatro locos microssatélites (Bva07, Bva21, Bva32 e Bva33) foram estatisticamente significativos quanto a presença alelo nulo após a checagem no programa *MICRO-CHECKER* 2.2.3 (VAN OOSTERHOUT et. al. 2004).

Todos os locos foram testados na amplificação heteróloga para as demais espécies do gênero *Brachyplatystoma*, uma espécie do gênero *Phractocephalus* e de *Pseudoplatystoma* (Tabela 2). Os vinte e dois locos amplificaram em todos os indivíduos de *B. platynemum* enquanto que para *B. rousseauxii*, um menor número foi observado (5 locos). Os locos Bva04, Bva09, Bva11 e Bva24 amplificaram para cinco espécies de *Brachyplatystoma* e 11 locos amplificaram para pelo menos 4 espécies desse gênero. Dezesesseis locos amplificaram para *Phractocephalus hemiliopterus* e 19 para *Pseudoplatystoma punctifer*. O número de alelos variou entre 1 a 7 por loco entre os três gêneros. Batista et. al. (2010) e Saulo-Machado et al. (2011) em trabalhos de amplificação cruzadas com SSR em espécies dos gêneros *Brachyplatystoma* e *Pseudoplatystoma* respectivamente, mostraram eficiência nos ensaios realizados, demonstrando que há uma elevada taxa de amplificação cruzada para esse tipo de marcador entre táxons filogeneticamente relacionados, o que possibilita em uma alternativa na redução de custos no desenvolvimento de microssatélites para as espécies.

Os 22 locos microssatélites desenvolvidos neste estudo, somados aos 15 locos desenvolvidos por Rodrigues et. al. (2009), resultam em 37 locos espécie-específico e 50 locos heterólogos somados aos 18 locos desenvolvidos por Batista et. al. (2010) e 20 por Lira-Cordeiro, (2013) disponíveis para estudos populacionais de *B. vaillantii* e, também mais 36 locos heterólogos para estudos com *B. platynemum*, 18 para *B. rousseauxii* e 20 para *B. capapretum*.

Os locos desenvolvidos podem ser usados como importante ferramenta para estudos genéticos do gênero *Brachyplatystoma*.

Tabela 1. Características dos 22 microssatélites desenvolvidos para *Brachyplatystoma vaillantii* amostrada no rio Madeira

Loco	Repetição	T°C	Tamanho (pb)	N/A	H_O	H_E	P -HWE	PIC	F_{IS} (f)
Bva01	(TC) ₂₀ g(TC) ₆	60	285-299	35/8	0,686	0,763	0,1898	0,723	0,103
Bva02	(TC) ₂₁ gtgtgtctg(TC) ₇	62	288-322	36/11	0,778	0,866	0,1242	0,840	0,103
Bva04	(TC) ₁₄ gtctc(TG) ₁₂	58	172-202	33/12	0,909	0,903	0,4040	0,880	-0,006
Bva05	(AG) ₁₉	58	155-183	35/10	0,857	0,858	0,6471	0,827	0,001
Bva06	(CT) ₂₂	57	319-351	29/14	0,966	0,917	0,9464	0,893	-0,054
Bva07	(TC) ₂₉	61	316-346	37/11 ^a	0,703	0,867	0,1474	0,841	0,192
Bva09	(CT) ₁₈	60	317-349	31/13	0,903	0,929	0,2932	0,908	0,028
Bva10	(CT) ₁₆ tt(TC) ₇	60	213-263	37/14	0,757	0,877	0,0460	0,852	0,139
Bva11	(AG) ₂₀	60	191-221	37/10	0,757	0,877	0,1312	0,852	0,139
Bva15	(GA) ₁₁ aa(GA) ₁₀ a(AGGGT) ₃	60	276-320	34/13	0,824	0,885	0,0468	0,860	0,070
Bva16	(CT) ₂₃	56	266-290	36/11	0,806	0,879	0,0261	0,853	0,084
Bva18	(TC) ₃₃	62	307-339	32/11	0,813	0,895	0,6892	0,869	0,093
Bva19	(TG) ₁₀ (AG) ₁₁	60	131-179	33/14	0,879	0,907	0,7641	0,884	0,032
Bva21	(CT) ₁₆ (GT) ₁₇	59	302-342	35/14 ^a	0,657	0,904	0,000*	0,882	0,276
Bva24	(TC) ₂₀	60	196-236	37/14	0,811	0,900	0,4860	0,877	0,100
Bva29	(AG) ₈ gg(AG) ₉	59	315-347	34/14	0,941	0,921	0,8195	0,900	-0,022
Bva32	(TG) ₁₅	60	314-338	35/8 ^a	0,543	0,825	0,0008*	0,788	0,345
Bva33	(TC) ₆ c(CA) ₁₅	60	353-373	37/10 ^a	0,568	0,855	0,0006*	0,826	0,339
Bva35	(AGTTT) ₃	60	183-213	37/4	0,162	0,179	0,0568	0,170	0,094
Bva36	(TTTAT) ₃	60	243-263	36/2	0,111	0,106	1,000	0,099	-0,045
Bva37	(GT) ₈ (GA) ₁₁	64	235-263	36/10	0,889	0,865	0,7152	0,838	-0,028
Bva38	(AAGG) ₄	60	124-132	37/2	0,378	0,373	1,000	0,300	-0,014

T°C = temperatura anelamento; N = número de indivíduos genotipados; A = número de alelos; ^a = presença de alelo nulo; H_O = heterozigosidade observada; H_E = heterozigosidade esperada; P -HWE* locos que não se mostraram em equilíbrio Hardy-Weinberg após correção de Bonferroni, PIC = Conteúdo Informativo de Polimorfismo e índice de endogamia = F_{IS} (f).

Tabela 2. Amplificação Heteróloga de 22 marcadores microssatélites desenvolvidos para *Brachyplatystoma vaillantii*, em seis espécies do gênero *Brachyplatystoma* (N = 4 para cada espécie), *Phractocephalus hemiliopterus* (N = 1) e *Pseudoplatystoma punctifer* (N = 1)

Locos SSR	<i>B. capapretum</i>	A	<i>B. juruense</i>	A	<i>B. filamentosum</i>	A	<i>B. platynemum</i>	A	<i>B. rousseauxii</i>	A	<i>B. tigrinum</i>	A	<i>P. hemiliopterus</i>	A	<i>P. punctifer</i>	A
	Tamanho (pb)		Tamanho (pb)		Tamanho (pb)		Tamanho (pb)		Tamanho (pb)		Tamanho (pb)		Tamanho (pb)		Tamanho (pb)	
BVA1	-	-	294-300	2	287-300	2	285	1	-	-	290-296	3	299-301	2	296-298	2
BVA2	-	-	-	-	-	-	300-336	4	300-306	4	-	-	298-300	2	296-298	2
BVA4	215-241	3	150-170	4	186-200	4	218-260	4	-	-	163-173	3	-	-	240-258	2
BVA5	-	-	171-183	3	191-195	2	183-201	5	-	-	177-179	3	154-166	2	164-182	2
BVA6	319	1	-	-	-	-	341-351	4	346	1	-	-	348-358	2	-	-
BVA7	-	-	-	-	-	-	358-368	2	-	-	308	1	-	-	338-342	2
BVA9	347	1	348-350	2	343-351	4	339-357	4	-	-	322-336	2	361-363	2	331	-
BVA10	247-253	2	-	-	241-269	5	239-259	6	239-253	4	-	-	209-223	2	251-253	2
BVA11	201-215	3	-	-	195-209	2	199-201	3	209-211	2	195-209	2	203-211	2	246	1
BVA15	-	-	257-285	3	255	1	300-314	5	-	-	276-298	2	290	1	286-298	2
BVA16	-	-	-	-	-	-	282-284	2	-	-	-	-	286	1	272-284	2
BVA18	306	1	-	-	-	-	309-319	2	-	-	-	-	341-349	2	324	1
BVA19	-	-	142-160	3	-	-	137-155	3	-	-	159	1	160	1	-	-
BVA21	-	-	-	-	-	-	334-344	2	-	-	-	-	-	-	330	1
BVA24	230-232	2	226-252	3	228-246	2	234-306	9	-	-	194-268	2	226-234	2	222-258	2
BVA29	342-344	2	-	-	-	-	352-338	4	-	-	333	1	360-362	2	329	1
BVA32	364	1	-	-	347-351	4	346-372	7	-	-	354	1	-	-	-	-
BVA33	-	-	283	1	-	-	183	1	-	-	277	1	-	-	230-258	2
BVA35	180-198	2	147	1	-	-	180-208	3	208-224	2	-	-	207	1	207	1
BVA36	-	-	-	-	273	1	271-289	3	-	-	-	-	278	1	269	1
BVA37	-	-	-	-	-	-	253-281	3	-	-	-	-	-	-	263	1
BVA38	-	-	152-166	3	152-164	4	154-164	3	-	-	155-165	2	170-182	2	156	1

A = número de alelos. N = número de indivíduos genotipados. pb = pares de bases.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos a Universidade do Estado do Amazonas – UEA e ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia. À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão de bolsas de estudo. Ao Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA) e ao Laboratório Temático de Biologia Molecular (LTBM / INPA) pelas pela concessão da infraestrutura e logística para a execução desse trabalho. Ao CENBAM e CNPq pelo financiamento deste estudo.

4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BARTHEM R. B; GOULDING, M. **Os bagres balizadores: ecologia, migração e conservação de peixes amazônicos**. Brasília: Sociedade Civil Mamirauá CNPq. 1997.

BARTHEM, R. B; FABRÉ, N. N. **A pesca e os recursos pesqueiros na Amazônia**. Provárzea. Ibama. Manaus. Amazonas. p. 269. 2003.

BATISTA, J. S; FARIAS, I. P; FORMIGA-AQUINO, K; SOUZA, A. C. B; ALVES-GOMES, J. A. DNA microsatellite markers for “dourada” (*Brachyplatystoma rousseauxi*, Siluriformes: Pimelodidae), a migratory catfish of utmost importance for fisheries in the Amazon: development, characterization and inter-specific amplification. **Conservation Genetics Resources**. v. 2, p. 5-10, 2010.

BILLOTTE, N; LAGODA, P. J. L; RISTERUCCI, A. M; BAURENS, F. C. Microsatellite enriched libraries: applied methodology for the development of SSR markers in tropical crops. **Fruits**. v. 4, n. 54, p. 277-288, 1999.

BOTSTEIN, D. et al. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. **Am. J. Hum. Genet.** v. 32, p. 314–331, 1980.

BRODANI, R. P. V; BRODANI, C; GRATTAPLAGIA, D. **Manual prático para o desenvolvimento de marcadores microssatélites em plantas**. Embrapa. Brasília, DF. p. 9-12, 2007.

CHAVES, R. A; SILVA, K. C. A; IVO, C. T. C; CINTRA, I. H. A; AVIZ, J. S. Sobre a pesca da piramutaba, *Brachyplatystoma vaillantii* (Valenciennes, 1940) em pescarias das frotas industrial no estado do Pará. **Boletim Técnico Científico (CEPNOR)**, v. 3, n.1, Belém, 2003.

DEWOODY, J.A. et. al. Universal method for producing ROX-labeled size Standards suitable for automated genotyping. **Biotechniques** v. 37, p. 348-352, 2004.

DIAS-NETO, J; MESQUITA, J. X. Potencial e exploração dos recursos pesqueiros do Brasil. **Ciência e Cultura**, v. 40, n. 5, p. 427-441, 1988.

FORMIGA-AQUINO, K. **Variabilidade genética da piramutaba - *Brachyplatystoma vaillantii* (Velenciennes, 1840) (Siluriformes - Pimelodidae) no sistema Estuário-Amazonas-Solimões**. 2004. 76p. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2004.

GOUDET, J. FSTAT, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices version 2.9.3.2. Available from <http://www.unil.ch/izea/software/fstat.html>. Updated from Goudet (1995), 2002.

HALL, T. A. **BioEdit**: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucl. Acids. Symp. Ser. n. 41, p. 95-98, 1999.

MARTINS, W. S. WebSat - A web software for microsatellite marker development. **Bioinformatics**, v. 3, n. 6, p. 282-283, 2009.

MEES, R. The Auchenipteridae and Pimelodidae of Suriname (Pisces, Nematognathi). **Zool. Verh**, 132: 1-256, 1974.

MINISTÉRIO DA PESCA E AQUICULTURA. **Boletim Estatístico da Pesca e Aquicultura - Brasil - 2010**. Brasília, 2010.

NELSON, J. S. **Fishes of the world**. 4 ed. John Wiley e Sons, Inc. 2006.

PARK, S. D. E. **Trypanotolerance in west african cattle and population genetic effects of selection Ph. D. Thesis (in prep.)**. University of Dublin, 2001.

RAYMOND, M; ROUSSET, F. GENEPOP Version 1.2. Population Genetics Software for Exact Tests and Ecumenicism. **Journal of Heredity**, v. 86, p. 248-249, 1995.

RICE, W. R. Analyzing tables of statistical tests. **Evolution**, v. 43, p. 223-225, 1989.

RODRIGUES, F. C; FARIAS, I. P; BATISTA, J. S; ALVES-GOMES, J. 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.** v.1, p. 365-368, 2009.

ROZEN, S; SKALETSKY, H. J. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: Krawetz, S.; Misener, S., (Eds.), **Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology**. Humana Press, Totowa, NJ, p. 465-386, 2000.

RUFFINO, M. L. Strategies for Managing Biodiversity in Amazonian Fisheries. **Blue Millennium: Managing Global Fisheries for Biodiversity**. UNEP/BPSP. Mimeo. 2001.

SAMBROOK, J; FRITSCH, E. F; MANIATIS, T. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. New York: Cold Springs Harbor Laboratory Press, 1989.

SAULO-MACHADO, A. C; FORMIGA, K. M; ORTIZ, M. F; SOUZA, A. C. B; ALVES-GOMES, J. A; BATISTA, J. B. Polymorphic microsatellite markers for the Amazonian catfish *Pseudoplatystoma punctifer* (Siluriformes: Pimelodidae). **Conservation genetics resources**. p. 231-234, 2010.

SCHUELKE, M. An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. **Nature Biotech**, v.18, p. 233-234, 2000.

VAN OOSTERHOUT, C. et al. Microchecker: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. **Molecular Ecology Notes**, v. 4, p. 535-538, 2004.

CAPÍTULO II

Estimativa da variabilidade genética de
***Brachyplatystoma vaillantii* (Siluriformes: Pimelodidae) no**
Rio Madeira

Estimativa da variabilidade genética de *Brachyplatystoma vaillantii* (Siluriformes: Pimelodidae) no Rio Madeira

CARVALHO, K. C. G^{1,2}; BATISTA, J. S²; GUIMARÃES-MARQUES, G. M²;
FORMIGA, K, M²

1-Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia, Univ. do Estado do Amazonas, Brasil, Manaus.

2- Laboratório Temático de Biologia Molecular (LTBM), Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Brasil, Manaus.

RESUMO

A piramutaba é um dos peixes mais capturados e explorados na Amazônia, sendo a variabilidade genética um componente fundamental para a sobrevivência e adaptação desta espécie. No presente estudo a variabilidade genética da espécie foi estimada, com 10 locos microssatélites, em escala espacial (AE), amostrada em sete localidades ao longo do rio Madeira, e temporal (AT) em quatro anos intercalados em um intervalo de 3-4 anos entre 2003 a 2013 e avaliando se as cachoeiras de Santo Antonio e Teotônio foram barreira ao fluxo gênico da piramutaba. Os locos mostraram-se altamente polimórficos, com diversidade gênica média de 0,825 AE e 0,828 AT). Os valores de F_{ST} (0,013 AE e 0,077 AT) indicaram baixa diferenciação genética. As análises Bayesianas para estrutura populacional corroboraram com a hipótese de panmíxia de *B. vaillantii*, sendo observadas fortes tendências ao fluxo gênico entre as localidades. Os resultados obtidos no presente estudo apresentam evidência de panmíxia e baixa influência das cachoeiras de Teotônio e Santo Antônio para dispersão da espécie.

1 INTRODUÇÃO

Brachyplatystoma vaillantii (VALENCIENNES, 1840) também conhecida como piramutaba, é uma espécie de bagre de água doce pertencente à família Pimelodidae (NELSON, 2006). Amplamente distribuída nas bacias do Amazonas, Tocantins, Orinoco e Parnaíba (MEES, 1974; BARTHEM, GOULDING, 1997). A piramutaba realiza longas migrações, cerca de 4.500 Km, em busca de áreas distintas de alimentação, crescimento e reprodução. Esses peixes nascem e se reproduzem no alto das cabeceiras de vários afluentes do sistema Solimões-Amazonas, se alimentam até a fase jovem na região do estuário (Belém-PA,) crescem na Amazônia central até atingir a maturidade sexual por volta de três anos e seguem para o alto das cabeceiras iniciando um novo ciclo (BARTHEM, 1990; BARTHEM, GOULDING, 1997; FABRÉ e BARTHEM, 2005). A piramutaba está entre as duas espécies de bagres de maior importância para a pesca na Amazônia e principalmente para o mercado

exportador no Brasil. A exploração comercial da piramutaba foi impulsionada na década de 60 pelo Governo Federal que disponibilizou recursos financeiros para incentivar a pesca no país, através de frotas pesqueiras sofisticadas, impulsionando a atividade pesqueira na região do estuário Amazônico (CASTILLO, 1978), porém o aumento da exploração resultou em desequilíbrio no volume do pescado, levando à espécie a condição de sobrepesca de crescimento, com um grande número de indivíduos jovens capturados e impedidos de reproduzir (DIAS-NETO, MESQUITA, 1988; CHAVES et. al. 2003; MINISTÉRIO DA PESCA E AQUICULTURA, 2010). Esse desequilíbrio chama atenção para a necessidade da conservação da diversidade biológica dessa espécie (ARIAS et. al., 1995; AVISE, HAMRICK, 1996), porém antes de qualquer medida, é necessário verificar se a pesca é realizada em cima de um único estoque genético. Segundo alguns estudos, a piramutaba compõe um único estoque pesqueiro com alta variabilidade genética no Sistema Solimões-Amazonas (BARTHEM, GOULDING, 1997; FORMIGA-AQUINO, 2004), mas pouco se sabe sobre sua área de distribuição no rio Madeira e dentro dos demais tributários.

O rio Madeira é um dos tributários da bacia amazônica com grande importância para o ciclo de vida da piramutaba e para outras espécies de Pimelodidae. Somente no rio Madeira são conhecidas 49 espécies de Pimelodidae, representando mais de 80% das espécies da família conhecidas na Amazônia (ALBERT et. al., 2011). Antes da construção dos reservatórios Jirau e Santo Antônio, o rio Madeira possuía 18 cachoeiras/corredeiras, sendo as Cachoeiras de Jirau e Teotônio as de maior importância em queda d'água (GOULDING et. al. 2003; CELLA-RIBEIRO et. al. 2013). Há indícios de que as cachoeiras de Teotônio e Jirau atuaram como barreira seletiva para as espécies a montante e a jusante dessas cachoeiras (TORRENTE-VILARA et. al. 2011; MACHADO, 2013; GRAVENA et. al. 2014; OCHOA et. al. 2015).

Os estudos sobre a piramutaba no rio Madeira, limitaram-se a cidade de Porto Velho, sete km antes da Cachoeira de Santo Antônio, sugerindo que a piramutaba faça parte do estoque pesqueiro do sistema Amazonas - Solimões (RODRIGUES, 2009), mas dada a complexidade do rio Madeira, não se pode afirmar que existe apenas um estoque para a piramutaba.

Os marcadores moleculares microssatélites são ferramentas capazes de elucidar questões sobre distribuição populacional e têm sido amplamente utilizados em estudos de genética de população de peixes (MOREIRA et. al. 2007; ABREU et. al. 2009; OCHOA et. al. 2015), pois exibem vantagens como co-dominância, altos níveis de polimorfismo, ampla distribuição no genoma de eucariotos, entre outras características e são capazes de acessar a

variabilidade genética dentro e entre as populações, estimar o fluxo gênico e verificar a estrutura genética de uma espécie (FRANKHAM et. al. 1995; AVISE, 2004). As informações prestadas por esses marcadores podem contribuir para direcionar a tomada de decisões no que diz respeito ao manejo e conservação das espécies (SLATKIN, 1985).

Nesse contexto, considerando que a distribuição populacional da piramutaba no rio Madeira é pouco conhecida, fez-se necessário um estudo para estimar a variabilidade genética temporal e espacial em amostras coletadas ao longo de dez anos em sete localidades ao longo do rio Madeira e avaliar se as extintas cachoeiras de Santo Antônio e Teotônio foram potenciais barreiras ao fluxo gênico de *Brachyplatystoma vaillantii*, utilizando 10 locos microssatélites desenvolvidos para a espécie.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Nesse estudo foram utilizadas 96 amostras de piramutaba preservadas em álcool 95% de tecido muscular, nadadeira ou barbilhão de piramutaba, coletados entre os anos de 2003 a 2013, pelo grupo de pesquisa em Biologia Evolutiva de Peixes Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia (INPA), em feiras, mercados e desembarques pesqueiros, oriundas da pesca artesanal no rio Madeira e Amazonas (Figura 1, Tabela 1), sob licenças de coleta IBAMA nº. 14.278-1 e 40844-2.

Para a análise espacial foram coletadas entre seis e vinte e três amostras de piramutaba em sete localidades entre a Cachoeira de Jirau (rio Madeira) e a cidade de Itacoatiara (rio Amazonas). Para a análise temporal foram utilizados entre 13 a 25 exemplares em quatro tempos (anos) intercalados entre três a quatro anos em um intervalo total de 10 anos distribuídos nas localidades (Tabela 1).

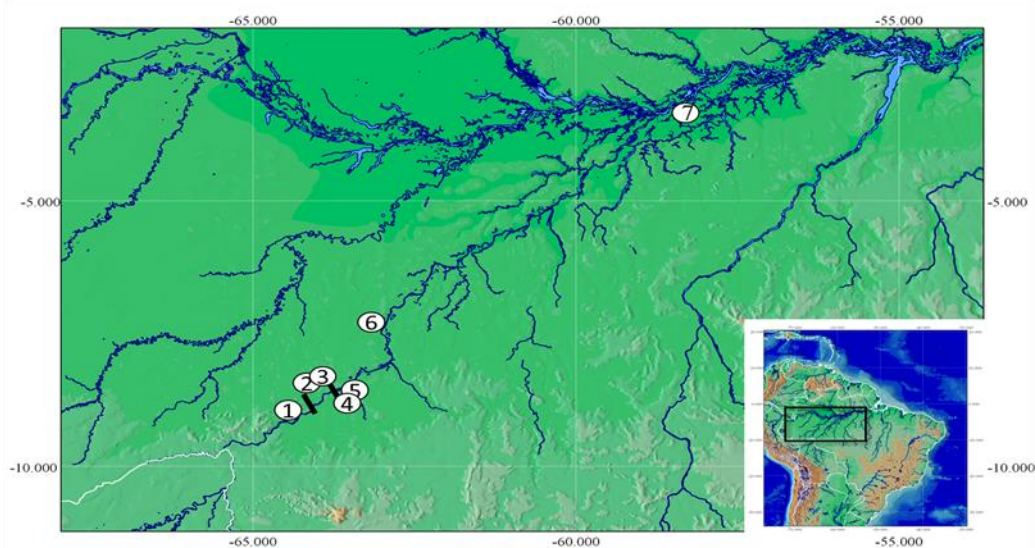


Figura 1. Localidades ao longo do rio Madeira onde amostras de piramutaba (*Brachyplatystoma vaillantii*) foram coletadas: 1. Cachoeira de Jirau, 2. Cachoeira de Teotônio, 3. Cachoeira do Macaco, 4. Cachoeira de Santo Antonio, 5. Porto Velho 6. Humaitá, 7. Itacoatiara. De 1 a 5 no Estado de Rondônia e 6 e 7 no Estado do Amazonas

Tabela 1. Locais de coleta, rios e números de indivíduos coletados (N) de *Brachyplatystoma vaillantii* em sete localidades e tamanho amostral o longo de 10 anos variando entre 3 e 4 anos.

Localidade	Sigla	Rio	Coordenadas	N	Anos	N
Cachoeira de Jirau-RO	C. Jirau	Madeira	9°19'46.25"S 64°43'54.33"O	07	2003	23
Cachoeira de Teotônio-RO	C. Teotônio	Madeira	8°51'27,36"S 64°3'50,16"O	21	2006	13
Cachoeira do Macaco-RO	C. Macaco	Madeira	8°50'55.73"S 64°01'03.17"O	21	2009	25
Cachoeira de Santo Antônio-RO	C. Santo Antônio	Madeira	8°48'08.58"S 63°57'01.65"O	09	2013	17
Porto Velho-RO	Porto Velho	Madeira	8°45'33.83"S 63°54'02.50"O	23		
Humaitá-AM	Humaitá	Madeira	7°32'01.00"S 63°03'02.00"O	06		
Itacoatiara-AM	Itacoatiara	Amazonas	3°08'06.08"SO 58°26'18.76"O	09		

O DNA total foi extraído de acordo com o protocolo Fenol-clorofórmio (SAMBROOK et. al., 1989). A integridade do DNA foi verificada em eletroforese em gel de agarose a 0,8%, conduzida em 90 V, 30 min., com tampão TAE 0,5X (Tris-acetato 0,04M e EDTA 1mM). O DNA foi quantificado por comparação de concentrações com DNA conhecido do bacteriófago fago *Lambda*.

Os 10 locos utilizados foram selecionados a partir da tabela de marcadores desenvolvidos para *B. vaillantii* (Capítulo I, Tabela 1). Os locos foram amplificados de acordo com Batista et al. (2010). O produto amplificado foi verificado por eletroforese em gel de agarose a 1,5%. De acordo com a intensidade das bandas de produtos amplificados foram feitas diluições 1:10 e 1:20 v/v.

Os produtos amplificados foram organizados em três sistemas multiplex para a checagem do tamanho dos alelos por genotipagem, considerando o tipo de fluorescência usada na marcação dos locos e tamanho dos fragmentos em pares de bases (pb) (Tabela 2). A genotipagem foi eletroinjetada em Analisador *ABI 3130xl* automatizado (LIFE TECHNOLOGIES) no LTBM/INPA (Laboratório Temático de Biologia Molecular/Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia), usando 1,0 μ L do produto da PCR diluído e 7,0 μ L *Tween20* 0,1%. O tamanho dos fragmentos foram estimados por comparação com o padrão *size ROX-labeled* (DEWOODY et. al., 2004) com auxílio do software *GeneMarker 1.97* (SOFTGENETICS).

Tabela 2. Organização do sistema multiplex contendo 10 locos microssatélites para a genotipagem de 96 amostras de piramutaba (*Brachyplatystoma vaillantii*) do rio Madeira.

Multiplex	Loco	T°C	Motivo de repetição	Tamanho (pb)	Fluorescência
1	Bva01	60	(TC) ₂₀ g(TC) ₆	303-317	FAM
	Bva07	61	(TC) ₂₉	334-364	FAM
	Bva37	64	(GT) ₈ (GA) ₁₁	253-281	HEX
	Bva38	60	(AAGG) ₄	142-150	NED
2	Bva02	62	(TC) ₂₁ tgtgtgtctg(TC) ₇	306-340	FAM
	Bva11	60	(AG) ₂₀	209-239	HEX
	Bva04	58	(TC) ₁₄ tgtctc(TG) ₁₂	190-220	FAM
3	Bva32	60	(TG) ₁₅	332-356	FAM
	Bva33	60	(TC) ₆ c(CA) ₁₅	271-308	FAM
	Bva16	56	(CT) ₂₃	284-308	HEX

Fonte: Capítulo I, Tabela 01.

Os dados foram organizados em duas matrizes de dados. A checagem quanto à presença de alelo nulos, *Stutters* e *large dropout* foi inferida com o auxílio do software MICRO-CHECKER 2.2.4 (VAN OOSTERHOUT et. al., 2004) para as análises. Os dados checados foram inseridos no programa MSTOOLS (PARK, 2001), para exclusão do tamanho em pb correspondente a cauda M13 (SCHUELKE, 2000) e a exclusão de indivíduos idênticos. Foram estimados parâmetros de diversidade genética (NEI, 1973) para a espécie. O número de alelos por loco (A), número de alelos exclusivos, heterozigosidade esperada (H_E), heterozigosidade observada (H_O) e coeficiente de endogamia (F_{IS}), foram calculados no programa *GENALEX 6.41* (PEAKALL, SMOUSE, 2006). O desvio do equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) e o desequilíbrio de ligação (DL) foram calculados nos programas *FSTAT* (GOUDET, 2001) e *ARLEQUIN 3.5.2.1* (EXCOFFIER, LISCHER, 2010) respectivamente. Os níveis de significância estatísticos foram ajustados através correção seqüencial de

Bonferroni (RICE, 1989). O Conteúdo de Polimorfismo Informativo (PIC) (BOTSTEIN et. al., 1980) e a riqueza alélica (A_R) também foram calculados com programa *FSTAT* (GOUDET, 2002).

A análise da estrutura genética foi testada usando a análise hierárquica de variância molecular (AMOVA) inferida no programa *ARLEQUIN 3.5.2.1* (EXCOFFIER, LISCHER 2010), a partir da matriz dos valores do índice de fixação (F_{ST}) (MICHALAKIS, EXCOFFIER, 1996) par a par. A análise foi conduzida com 10.000 permutações e intervalo de confiança de 95%. Os valores de probabilidade foram ajustados com a correção de Bonferroni ($P = 0,05/\text{número de combinações}$) (RICE, 1989). A AMOVA foi realizada de quatro formas e em níveis hierárquicos diferentes: (1) análises em dois níveis hierárquicos, sendo dois grupos: um com localidades a jusante e outro com as situadas a montante da Cachoeira de Teotônio; (2) dois níveis hierárquicos, com a mesma conformação da análise 1, porém considerando as localidades a jusante em um grupo e a montante da Cachoeira de Santo Antônio o outro grupo; (3) as sete localidades foram agrupadas em um único nível hierárquico (análise espacial); (4) os quatro anos (2003, 2006, 2009 e 2013) também agrupados em um único nível hierárquico (análise temporal).

A análise Bayesiana realizada no programa *STRUCTURE 2.3.1* (PRITCHARD et. al. 2000) foi feita para estimar o possível número de populações (K) e a existência de estruturação, utilizando o modelo ancestral de mistura com alelos relacionados. O modelo assume que cada indivíduo pode ter ancestrais oriundos de mais de uma população e as frequências alélicas correlacionadas favorecendo uma melhor identificação de sub-estruturas. Foram realizadas 10 corridas independentes para cada valor K variando entre um 1 a 10 com valores de corte (*burn in*) de 100.000 permutações e 1.000.000 de simulações em cadeias de Monte Carlo (MCMC). O número de populações esperado é o valor de K máximo estimado pelo modelo *log-likelihood* ($\log(P(X/K))$) (FALUSH et. al. 2003) realizado com o auxílio do programa *STRUCTURE HARVESTER* (EARL, JONHOLDT, 2012).

O fluxo gênico (taxa de migrações) foi estimado a partir dos valores de F_{ST} , em número de fêmeas migrantes reprodutivamente ativas por geração (Nm) onde $Nm = Y = (1 - F_{ST}) / (2F_{ST})$, implementado no programa *ARLEQUIN 3.5.2.1* (EXCOFFIER, LISCHER 2010).

A estimativa da variabilidade, da estrutura populacional e fluxo gênico foram utilizados nas análises para checar a variabilidade genética espacial e temporal.

3 RESULTADOS

Foram geradas duas matrizes, uma contendo os genótipos de 96 indivíduos utilizados para a análise espacial e outra contendo os dados de 73 amostras para a análise temporal. As matrizes foram checadas no programa *MICRO-CHECKER* 2.2.3 (VAN OOSTERHOUT et. al. 2004) observando a presença de alelo nulos em cinco dos 10 locos utilizados entre localidades de 1 a 7. A presença de alelos nulos pode ser explicada pela baixa eficiência de hibridação do *primer* e também pela possível amplificação de fragmentos preferenciais (WATTIER et. al., 1998; DARKIN, AVISE, 2004).

No estudo da diversidade genética espacial foi observado um total de 121 alelos (A), variando entre 9 a 18 (média de 12,10 alelos/loco), e na temporal 118 alelos (média de 11,80 alelos/loco), variando entre 4 a 18 alelos/loco distribuídos em 10 locos microssatélites. Os valores da heterozigosidade observada (H_O) na análise espacial variaram de 0,622 (Bva32) a 0,901 (Bva16) com média = 0,768 e heterozigosidade esperada (H_E) variou de 0,540 (Bva38) a 0,919 (Bva04) com média = 0,833. Na análise temporal a H_O variou de 0,531 (Bva38) a 0,917 (Bva04) com média = 0,829 e a H_E de 0,605 (Bva32) a 0,892 (Bva16) com média = 0,769. O Conteúdo Polimórfico Informativo (PIC) apresentou média de 0,807 (análise espacial) e 0,806 (análise temporal). As estimativas do coeficiente de endogamia (F_{IS}) para análise espacial variou de -0,374 a 0,214 e para análise temporal variou de - 0,295 a 0,256 (Tabela 3).

Tabela 3. Índices de diversidade genética para *Brachyplatystoma vallantii* amostrada em seis localidades ao longo do rio Madeira e uma no rio Amazonas, bem como em 4 anos intercalos ao longo de 10 anos (entre 2003 e 2013).

Loco	Sete localidades (N=96)						Quatro anos intercalodados (N=76)					
	A	Tamanho (bp)	H_E	H_O	PIC	F_{IS}	A	Tamanho (bp)	H_E	H_O	PIC	F_{IS}
BVA01	9	277-299	0,754	0,660	0,723	0,063	9	277-299	0,765	0,632	0,734	0,146
BVA02	14	288-322	0,865	0,890	0,848	-0,070	14	288-322	0,859	0,888	0,843	-0,063
BVA04	16	164-202	0,919	0,830	0,908	0,038	15	164-202	0,917	0,846	0,901	0,047
BVA07	18	308- 356	0,876	0,866	0,859	0,025	17	308- 346	0,868	0,860	0,848	-0,032
BVA11	12	191-225	0,880	0,759	0,862	0,045	12	191-225	0,887	0,776	0,868	0,091
BVA16	11	266-290	0,895	0,901	0,880	-0,025	11	266-290	0,897	0,892	0,881	-0,024
BVA32	13	314-338	0,854	0,622	0,833	0,200	12	314-338	0,845	0,605	0,829	0,256
BVA33	12	253-275	0,885	0,640	0,869	0,214	12	253-275	0,890	0,637	0,864	0,255
BVA37	12	235-263	0,860	0,849	0,841	-0,088	12	235-263	0,839	0,879	0,840	-0,076
BVA38	4	124-152	0,540	0,660	0,445	-0,374	4	124-152	0,531	0,673	0,456	-0,295
Total	121	124-356	0,833	0,768	0,807	0,003	118	124-346	0,829	0,769	0,806	0,0305

A = número de alelos; H_E = Heterozigosidade esperada; H_O = Heterozigosidade observada; PIC = Conteúdo Polimórfico Informativo e F_{IS} = Coeficiente de endogamia. Os valores máximos e mínimos estão destacados.

Foi observada a presença de 10 alelos privados nas localidades de C.Teotônio, C. Macaco, C. Santo Antônio, Porto Velho, Humaitá e Itacoatiara, sendo que o alelo 344

(Bva07) presente na localidade de C. Santo Antônio apresentou maior frequência (0,125). Entre os anos estudados foi observada a presença de 13 alelos privados, tendo como alelo mais frequente o 320 (0,114). O ano de 2009 apresentou o maior número de alelos privados (6) (Tabela 4).

Tabela 4. Alelos privados (pb) e suas frequências (entre parênteses) observados em 10 locos microssatélites de *Brachyplatystoma vaillantii* em 6 localidades e em 4 anos amostrados. Os valores máximos e mínimos estão destacados.

Loco	Localidades						Anos			
	C. Jirau	C. Macaco	C. Santo Antônio	Porto Velho	Humaitá	Itacoatiara	2003	2006	2009	2013
BVA01	277 (0,071)							277 (0,077)		
BVA02					288 (0,083)				312 (0,071)	288 (0,029)
BVA04										
BVA07	356 (0,028)		344 (0,125)		346 (0,100)				308 (0,024)	344 (0,067)
									340 (0,024)	346 (0,033)
BVA11				215 (0,065)			251 (0,065)			
BVA16										
BVA32		334 (0,053)				322 (0,111)			320 (0,114)	
									334 (0,045)	
BVA33								261 (0,42)		
BVA37		259 (0,050)		263 (0,045)			281 (0,045)		259 (0,042)	
BVA38										
Total	2	2	1	2	2	1	2	2	6	3

O número de alelos, as heterozigidade observada (H_O) e esperada (H_E), a probabilidade de (P) para o teste de Hardy-Weinberg (HWE) e o coeficiente de endogamia (F_{IS}) por loco em todas as localidades e a cada 3-4 anos foram estimados conforme dados na tabela 5.

A heterozigidade observada (H_O) por localidades variou de 0,111 a 1,000 (média = 0,763) e a heterozigidade esperada (H_E) de 0,0278 a 0,903 (média = 0,779). Entre os anos a H_O variou de 0,500 a 1,000 (média = 0,767) e a H_E de 0,430 a 0,905 (média = 0,803). Os valores do coeficiente de endogamia (F_{IS}) variaram de -1,000 (Bva38/CJI) a 0,714 (Bva07/HU) entre as localidades e de -0,625 (Bva38/2006) a 0,383 (Bva33/2003) entre os anos estudados. Após a correção do Bonferroni (Rice, 1989) ($P = 0,005$) foi observado o desvio do equilíbrio de Hardy-Weinberg em quatro localizadas (C. Teotônio/Bva38, C. Macaco/Bva01, C. Santo Antônio/Bva33 e Porto Velho/Bva33) e nos quatro anos em quatro locos (Bva01/2009; Bva32/2003/2009; Bva33/2003/2013; Bva38/2006). Esses resultados podem ser justificados pelo excesso de homozigotos observados entre as localidades e os

anos estudados ou também pela presença de alelo nulos observada em seis locos em 3 anos e 06 localidades na análise espacial. Não foi observado desequilíbrio de ligação entre todas as combinações par a par dos 10 locos nas duas análises.

Tabela 5. Índices de diversidade genética obtidos com 10 locos microssatélites em *Brachyplatystoma vaillantii* em sete localidades ao longo do rio Madeira e quatro anos entre 2003 e 2013.

Loco		Localidades							Anos			
		C. Jirau	C. Teotônio	C. Macaco	C. Santo Antonio	Porto Velho	Humaitá	Itacoatiara	2003	2006	2009	2013
Bva01	N	7	21	21	8	22	6	9	22	13	25	16
	A	6	8	7	6	8	6	6	8	8	7	7
	H_o	0,857	0,667	0,524	0,500	0,727	0,667	0,778	0,727	0,615	0,560	0,625
	H_e	0,735	0,684	0,773	0,641	0,747	0,778	0,679	0,747	0,707	0,786	0,721
	F_{IS}	-0,091	0,049	0,440	0,282	0,050	0,231	-0,087	0,026	0,130	0,287	0,133
	EHW	0,239	0,436	0,0004*	0,047	0,387	0,442	0,427	0,347	0,242	0,000*	0,030
Bva02	N	7	21	17	9	22	6	9	22	13	21	17
	A	7	10	9	10	10	9	8	10	10	12	12
	H_o	0,857	0,952	1,000	0,778	0,727	1,000	1,000	0,727	1,000	1,000	0,824
	H_e	0,837	0,833	0,830	0,870	0,799	0,875	0,858	0,799	0,822	0,848	0,872
	F_{IS}	0,053	-0,119	-0,175	0,164	0,112	-0,053	-0,108	0,089	-0,216	-0,179	0,056
	EHW	0,722	0,514	0,053	0,056	0,101	1,000	0,820	0,070	0,667	0,032	0,104
Bva04	N	7	20	18	6	22	6	9	22	13	19	17
	A	9	13	10	8	12	6	10	12	11	11	14
	H_o	0,857	0,800	0,667	0,833	0,955	0,833	0,889	0,955	0,923	0,684	0,824
	H_e	0,867	0,903	0,877	0,847	0,885	0,806	0,883	0,885	0,882	0,880	0,905
	F_{IS}	0,089	0,139	0,266	0,107	-0,055	0,057	0,052	-0,078	-0,047	0,222	0,090
	EHW	0,075	0,006	0,047	0,514	0,880	0,336	0,615	0,878	0,145	0,026	0,049
Bva07	N	6	18	17	8	23	5	5	23	12	21	15
	A	6	15	13	9	11	4	6	11	9	14	11
	H_o	0,833	1,000	1,000	0,750	0,870	0,200	0,800	0,870	1,000	0,905	0,667
	H_e	0,778	0,869	0,882	0,859	0,847	0,580	0,780	0,847	0,781	0,881	0,827
	F_{IS}	0,020	-0,123	-0,103	0,192	-0,005	0,714	0,086	-0,027	-0,280	-0,027	0,194
	EHW	0,910	0,033	0,386	0,271	0,938	0,017	0,790	0,950	0,129	0,127	0,042
Bva11	N	4	18	14	9	23	6	9	23	10	18	14
	A	5	10	10	6	10	7	6	10	8	11	10
	H_o	0,750	0,722	0,857	0,778	0,696	1,000	0,667	0,696	0,700	0,778	0,929
	H_e	0,750	0,853	0,847	0,784	0,884	0,819	0,790	0,884	0,845	0,847	0,837
	F_{IS}	0,143	0,181	0,025	0,067	0,234	-0,132	0,213	0,213	0,172	0,082	-0,110
	EHW	0,658	0,121	0,547	0,692	0,115	0,710	0,302	0,133	0,331	0,180	0,100
Bva16	N	7	19	20	8	23	6	8	23	12	23	17
	A	9	11	11	7	11	8	8	11	11	11	11
	H_o	1,000	0,947	1,000	0,750	0,870	0,667	0,875	0,870	0,917	0,957	0,824
	H_e	0,857	0,873	0,876	0,789	0,877	0,819	0,867	0,877	0,872	0,875	0,860
	F_{IS}	-0,091	-0,059	-0,116	0,116	0,031	0,273	0,058	0,009	-0,052	-0,093	0,042
	EHW	0,596	0,610	0,635	0,350	0,062	0,028	0,046	0,071	0,575	0,479	0,505

Bva32	N	7	19	19	8	22	6	9	22	11	22	17
	A	6	7	10	5	8	7	8	8	7	10	8
	H_O	0,857	0,684	0,632	0,625	0,500	0,500	0,667	0,500	0,636	0,636	0,647
	H_E	0,796	0,785	0,853	0,742	0,753	0,833	0,821	0,753	0,789	0,858	0,849
	F_{IS}	0,000	0,155	0,285	0,222	0,357	0,474	0,244	0,336	0,194	0,259	0,238
	EHW	0,929	0,504	0,002*	0,448	0,010	0,026	0,024	0,011*	0,394	0,002*	0,055
Bva33	N	6	19	17	9	23	6	9	23	12	21	16
	A	8	10	10	6	11	7	9	11	9	10	10
	H_O	0,667	0,632	0,765	0,444	0,522	0,667	0,889	0,522	0,750	0,714	0,563
	H_E	0,778	0,864	0,874	0,809	0,845	0,806	0,858	0,845	0,858	0,873	0,848
	F_{IS}	0,231	0,294	0,154	0,496	0,401	0,259	0,023	0,383	0,126	0,182	0,336
	EHW	0,112	0,018	0,344	0,004*	0,000*	0,208	0,102	0,000*	0,165	0,113	0,000*
Bva37	N	7	20	20	9	22	6	9	22	13	24	17
	A	5	9	10	7	10	7	8	10	7	10	9
	H_O	0,857	0,800	0,800	1,000	0,818	1,000	0,889	0,818	0,923	0,833	0,941
	H_E	0,724	0,775	0,850	0,790	0,852	0,833	0,840	0,852	0,757	0,859	0,798
	F_{IS}	-0,108	-0,007	0,084	-0,210	0,063	-0,111	0,000	0,040	-0,219	0,030	-0,180
	EHW	0,934	0,100	0,200	0,930	0,315	1,000	0,917	0,273	0,044	0,360	0,806
Bva38	N	6	21	21	9	22	6	9	22	13	25	16
	A	2	4	4	2	2	2	2	2	4	4	2
	H_O	1,000	0,857	0,762	0,111	0,591	0,333	0,667	0,591	0,923	0,680	0,500
	H_E	0,500	0,535	0,661	0,278	0,449	0,278	0,444	0,449	0,568	0,633	0,430
	F_{IS}	-1,000	-0,586	-0,129	0,636	-0,294	-0,111	-0,455	-0,315	-0,625	-0,075	-0,164
	EHW	0,930	0,000*	0,113	0,176	0,340	1,000	0,457	0,340	0,000*	0,402	1,000

N = Número de indivíduos; A = número de alelos; H_O = Heterozigosidade observada, H_E = Heterozigosidade esperada; F_{IS} = Coeficiente de endogamia; EHW = Probabilidade do teste de Equilíbrio de Hardy-Wienberg. Valores máximos e mínimos destacados. * resultados significativos. P = 0,005

A maior riqueza alélica foi observada na C. Macaco ($A_R = 5,183$) com o número total de 94 alelos (A_T) e menor na C. Santo Antônio ($A_R = 4,732$) com 66 alelos. Entre os anos, o maior índice foi 8,144 ($A_T = 100$) em 2009 e o menor 7,515 ($A_T = 93$) em 2003. Os índices com maior riqueza alélica possuíram o maior N amostral (21 e 25 respectivamente) e provavelmente por esse motivo apresentaram maior riqueza alélica. A C. Macaco também apresentou a maior diversidade genética (0,858) e média das diferenças par a par ($6,570 \pm 3,167$) e a C. Santo Antônio apresentou as menores estimativas (0,799 e $0,667 \pm 0,369$, respectivamente). Na localidade da C. Santo Antônio foi observada a menor heterozigosidade média observada e esperada (0,657- 0,741) e a maior em C. Jirau (0,854 - 0,836). No ano de 2003 foi observada a menor $H_O = 0,727$ e a maior em 2006 $H_O = 0,839$ e a menor heterozigosidade média esperada foi observada em 2003 (0,794) e maior foi em 2009 (0,834). O F_{IS} variou entre -0,032 a 0,168 entre C. Jirau e Humaitá e de -0,020 a 0,108 em 2003 e

2013, respectivamente. Foi observado um baixo coeficiente de endogamia (F_{IS}) tanto nas localidades quantos nos anos estudados (Tabela 6).

Tabela 6. Índices da diversidade genética obtidos com 10 locos microsatélites de *Brachyplatystoma vaillantii* em sete localidades e quatro anos distribuídos no rio Madeira e Amazonas

Localidades				Média da	Média das	Média	
Anos	N	A _T	A _R	Diversidade	Diferenças	$H_O - H_E$	F_{IS}
				Genética	par a par		
C. Jirau	07	63	4,909	0,827	7,077 ± 3,535	0,854 - 0,836	-0,032
C. Teotônio	21	97	4,893	0,819	7,072 ± 3,387	0,806 - 0,876	0,016
C. Macaco	21	94	5,183	0,858	6,570 ± 3,167	0,801 - 0,832	0,066
C. Santo Antonio	09	66	4,732	0,799	6,673 ± 3,303	0,657 - 0,741	0,178
Porto Velho	23	93	4,853	0,814	7,725 ± 3,665	0,728 - 0,794	0,106
Humaitá	06	63	5,057	0,825	7,909 ± 3,958	0,687 - 0,743	0,168
Itacoatiara	09	71	5,041	0,835	7,261 ± 3,567	0,812 - 0,782	0,027
2003	23	93	7,515	0,814	7,725 ± 3,659	0,727 - 0,794	0,106
2006	13	84	7,797	0,822	7,218 ± 3,484	0,839 - 0,788	-0,020
2009	25	100	8,144	0,856	6,082 ± 2,940	0,755 - 0,834	0,095
2013	17	94	7,868	0,823	7,485 ± 3,576	0,734 - 0,795	0,108

Média da riqueza alélica = A_R , diversidade genética média, número total de alelos = A_T , média da heterozigosidade observada e esperada = H_E . H_O e coeficiente de endogamia = F_{IS} . Os valores mais altos e mais baixos foram marcados em negrito

Com base nos valores de F_{ST} , não foi observada estrutura genética em nenhuma das quatro análises da AMOVA. O resultado da análise 1 (localidades a jusante e a montante da C. Teotônio), foi observado 0,01% de variação genética ($F_{CT} = 0,00013$, $P = 0,568$) entre os grupos, 0,73% entre as localidades dentro de cada grupo ($F_{ST} = 0,00453$, $P = 0,0663$) e 99,55% da variação dentro das localidades dos grupos. Na análise 2, considerando dois níveis hierárquicos (localidades a jusante e a monte da C. Santo Antônio), a variação genética foi de 0,01% ($F_{CT} = 0,00013$, $P = 0,462$) entre os grupos, 0,58% ($F_{ST} = 0,0056$; $P = 0,0600$) entre as localidades dentro dos grupos e 99,44% dentro das localidades. Esses dados não indicam diferenciação genética e nem que uma das duas cachoeiras eram barreiras ao fluxo gênico da espécie.

O resultado da análise 3, considerando as sete localidades em um único grupo hierárquico, revelou variação genética não significativa ($F_{ST} = 0,013$; $P = 0,010$). O resultado mostrou 1,29% de variabilidade genética entre as localidades, dentro das localidades 14,32% e entre os indivíduos 84,39% dentro das localidades. Os valores par a par de F_{ST} também não indicaram diferenciação genética significativa, os valores variaram entre de 0,000

(Humaitá/C. Teotônio) e 0,032 (C. Santo Antônio/C. Macaco) (Tabela 7). O resultado da análise 4, considerando os quatro anos em um único grupo hierárquico, não indica diferenciação genética significativa ($F_{ST} = 0,007$, $P = 0,013$). A variabilidade genética entre os anos foi de 0,08% ($F_{ST} = 0,00079$; $P = 0,369$) e dentro dos anos 99,92%. Os valores par a par de F_{ST} variaram entre 0,000 (2006/2013) e 0,014 (2003/2009) (Tabela 7). De acordo com os resultados obtidos com os 10 locos microssatélites, não houve segregação genética entre as sete localidades e entre os anos amostrados.

Tabela 7. Valores de F_{ST} (diagonal inferior) estimados entre indivíduos de *Brachyplatystoma vaillantii* em cada duas (par a par) das sete localidades e nos quatro anos amostrados. Valores máximos e mínimos estão em destaque. Os valores de P estão na diagonal superior

Localidades	C. Jirau	C. Teotônio	C. Macaco	C. Santo Antônio	Porto Velho	Humaitá	Itacoatiara	Anos	2003	2006	2009	2013
C. Jirau	-	0,210	0,284	0,026	0,011	0,157	0,038					
C. Teotônio	0,007	-	0,056	0,147	0,041	0,468	0,090					
C. Macaco	0,004	0,007	-	0,000	0,031	0,029	0,000					
C. Santo Antônio	0,026	0,008	0,032	-	0,205	0,480	0,007	2003	-	0,130	0,002	0,310
Porto Velho	0,024	0,008	0,020	0,006	-	0,468	0,004	2006	0,006	-	0,310	0,458
Humaitá	0,015	0,000	0,019	0,000	0,000	-	0,133	2009	0,014	0,002	-	0,021
Itacoatiara	0,023	0,011	0,015	0,033	0,025	0,015	-	2013	0,002	0,000	0,010	-

A análise Bayesiana implementada no programa STRUCTURE 2.3.1 (PRITCHARD et al., 2000) foi realizada para verificar estruturação genética utilizando 10 locos microssatélites em todos os indivíduos amostrados nas sete localidades. A distribuição de estimativas de probabilidades L (K) (-3776,8) resultou em $K = 1$ (Figura 2a). A figura 2b gerada pelo programa STRUCTURE 2.3.1 (PRITCHARD et al., 2000), mostrou o agrupamento dos indivíduos sobrepostos dentro do triângulo.

As taxas de fluxo gênico, em valores de Nm , estimadas a partir dos valores de F_{ST} par a par pelo programa ARLEQUIN 3.5.2.1 (EXCOFFIER, LISCHER 2010), e confirmado pela fórmula $(1 - F_{ST}) / (2F_{ST})$, variaram entre 7,215 (entre os indivíduos de Itacoatiara e C. Santo Antônio) a 6107,111 entre Humaitá/C. Teotônio. Na análise temporal os valores tiveram variação de 17,549 (2009/2013) e 2499,750 (2006/2013) (Tabela 8).

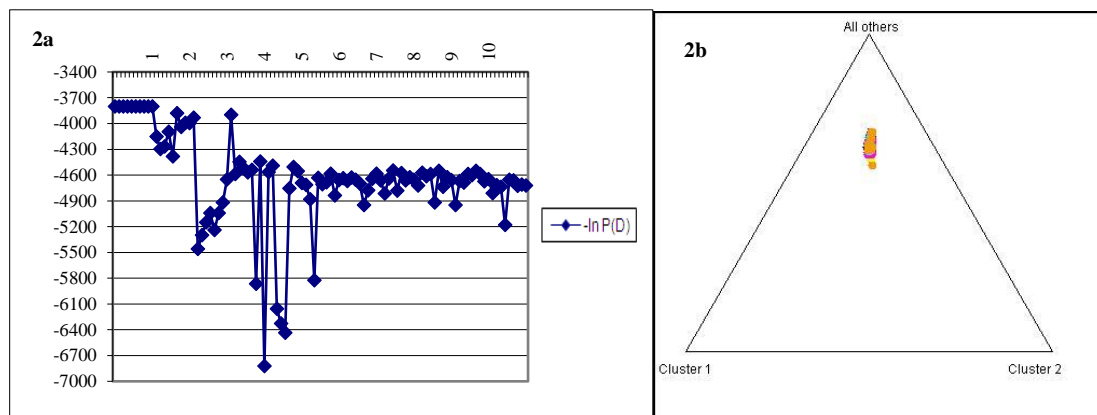


Figura 2. Única população ($K = 1$) estimada para *Brachyplatystoma vaillantii*, amostrada em sete localidades a partir de inferência Bayesiana implementado no programa *STRUCTURE 2.3.1*, para K variando entre 1 a 10. 2a – Valores da probabilidade a posteriori na vertical e na horizontal dos números de agrupamento (K) possíveis. 2b – Triângulo indicando que os indivíduos se encontram sobrepostos.

Tabela 8. Fluxo gênico (par a par) estimado entre as sete localidades e os quatro anos amostrados para *Brachyplatystoma vaillantii*, a partir dos valores de Nm (número de migrantes por geração baseado nos valores de F_{ST}), utilizando 10 microssatélites. Valores máximos e mínimos estão em destaque.

Locais	C. Jirau	C. Teotônio	C. Macaco	C. Santo Antônio	Porto Velho	Humaitá	Itacoatiara	Anos	2003	2006	2009	2013
C. Jirau	-											
C. Teotônio	37,334	-										
C. Macaco	61,734	34,673	-									
C. Santo Antônio	9,316	31,819	7,577	-				2003	-			
Porto Velho	10,181	30,208	12,319	43,509	-		2006	40,737	-			
Humaitá	16,386	6107,111	12,871	2499,750	2499,750	-	2009	17,549	102,352	-		
Itacoatiara	10,548	22,920	16,158	7,215	9,760	16,879	-	2013	124,846	2499,750	24,384	-

4 DISCUSSÃO

A conservação dos recursos genéticos das espécies é uma pauta de grande relevância na atualidade e razão do grande número de estudos que tem sido realizado em busca da quantificação da diversidade genética e no entendimento de sua amplitude, natureza e distribuição entre e dentro de populações. Pois o sucesso de qualquer programa que vise a conservação de espécies, depende do conhecimento da variabilidade genética presente na espécie de interesse (CRUZ et. al. 2011).

As espécies do gênero *Brachyplatystoma* são comumente exploradas na região Amazônica para fins comerciais, podendo acarretar uma considerável queda na diversidade genética dessas espécies e também redução de seus estoques naturais. A redução no estoque já

é observada para *Brachyplatystoma vaillantii* (MINISTÉRIO DA PASCAL E AQUICULTURA, 2010).

Diversidade genética da piramutaba

Os níveis de variação genética de uma população natural podem ser mensurados não somente pela heterozigosidade observada (H_O), mas também pela sua diversidade alélica (MOREIRA et. al. 2007) e conforme mostrado na tabela 3, foi observada alta variabilidade nas duas análises em todos os locos, com a menor variação observada no loco Bva38 que obteve 4 alelos nas duas análises e valores de PIC iguais a 0,445 e 0,456, respectivamente sugerindo portanto, que essas diferenças podem ser resultantes da amplitude nas variações do número das sequências repetidas em tandem nos locos. O número total de alelos foi igual a 118 (análise temporal) e 121 (análise espacial) com média por loco de 12,10 e 11,80, respectivamente. As H_E com a média por loco variando de 0,605 a 0,892 e H_O com a média variando de 0,531 a 0,917, mostraram-se próximo aos índices observados por Rodrigues (2009), em estudo com piramutaba na calha do rio solimões com 161 indivíduos (colocar aqui os valores encontrados por ela) e também com outras espécies como *Brachyplatystoma rousseauxii* (BATISTA, 2010). Esses resultados de certa forma são esperados em função do ciclo de vida da espécie e seu comportamento migratório. Peixes migradores geralmente têm taxas de metabolismo altas, fertilidade mais elevada, maiores números de descendentes, maior produção de gametas e, conseqüentemente, alta variabilidade genética (WINEMILLER, 1989; VAZZOLER, 1996; RUFFINO, ISAAC, 2000). As diferenças na variabilidade genética de *B. rousseauxii* e *B. vaillantii* pode representar o resultado de seus ciclos migratórios distintos e mecanismos metabólicos que também podem ter diferentes padrões.

Foi registrada a presença de alelos privados nas duas análises. A média variou de 1,42 por localidade e 3,25 por ano. O maior número de alelos privados foi observado no ano de 2009, seis alelos em 25 indivíduos (maior N amostral). O número desses alelos aumenta em função do tamanho da amostra, desta forma, quanto maior amostragem, maior são as chances de se detectar alelos privados (AVISE, 1994; WEIR, 1996). O número de alelos privados é uma estimativa indireta do fluxo gênico que quanto mais baixo, maior é presença desses alelos na população por meio de mutações (ALLENDORF, LUIKART, 2007), mas como a média entre as populações foi relativamente baixa e as taxas de fluxo gênico mostraram-se elevadas, reforça um intenso fluxo genético da piramutaba no rio Madeira.

Os desvios de valores de equilíbrio de Hardy-Weinberg foram observados de forma pontual em apenas quatro locos (Bva1/Bva32/Bva33/Bva38) nas duas análises (Tabela 5). O desvio de equilíbrio de Hardy-Weinberg é muito comum dentro de microssatélites (CHEVOLOT et. al., 2006). Pereira et. al. (2009) lista causas potenciais que induzem a esse fenômeno em uma dada população: alto número de alelos por loco, artefatos técnicos tal como a ocorrência de alelos nulos que podem surgir devido a baixa eficiência do *primer* na hibridização para amplificar alguns locos, *stutters* (também conhecidas como bandas inespecíficas) ou presença de *large dropout* (favorecimento de um dos alelos em um heterozigoto em uma reação de PCR, geralmente ocorrendo quando o tamanho de pares de bases entre estes são significativos), efeito Wahlund, seleção específica de alelos e endogamia. Desta forma os valores significativos do teste de EHW podem está relacionados à presença de alelos nulos, uma vez que estes foram observados nos locos com desvio.

Os índices da diversidade genética se mostraram altos e relativamente homogêneos tanto entre análises por localidades quanto nas análises por anos. Os valores de A_R , H_E e H_O mostram-se próximos aos valores encontrados em *Colossoma*. Altos níveis de diversidade genética parecem ser comuns em peixes de hábito migratório e com grandes populações panmíticas (SANTOS, 2010). Em contra partida os valores da diversidade alélica para *B. capapretum* exibem uma baixa variabilidade ($A_R = 4,91$), ainda que tenha ampla distribuição e possua hábito migratório como as demais espécies do gênero *Brachyplatystoma* (LIRA-CORDEIRO, 2013). Este pode ser um reflexo da ampla exploração comercial que está espécie vem sofrendo ao logo dos anos.

Do modo geral os resultados da variabilidade genética obtidos para *Brachyplatystoma vaillantii*, observados tanto nas análises espaciais como nas análises temporais com os 10 locos microssatélites, refletem não somente a importância do rio Madeira para manutenção da variabilidade genética da piramutaba, mas também do seu ciclo de vida.

Análise de estrutura populacional de *Brachyplatystoma vaillantii* no rio Madeira

A estrutura genética das populações foi verificada em termos da composição da diversidade genética total em seus componentes inter e intrapopulacionais em análises espaciais e temporais conforme Nei (1987), e seus resultados mostraram-se significativos em estudos de diversidade genética nas populações naturais de *Brachyplatystoma vaillantii*. O teste AMOVA foi realizado para estimar a variação genética dentro e entre as amostras

populacionais. Com os 10 locos microssatélites foi detectada a ausência de diferenciação genética entre as localidades e entre os anos estudados. A análise espacial mostrou variação entre populações de 1,29%, dentro das populações de 14,32% e entre os indivíduos 84,39%. Nas análises temporais apresentou variação entre populações de 0,68%, dentro das populações de 15,49% e entre os indivíduos 83,83%.

A análise Bayesiana inferida pelo programa STRUCTURE 2.3.1 (PRITCHARD et. al. 2000) foi realizada somente para a análise espacial, a fim de compor as análises de diferenciação genética da AMOVA. A análise usando In(P)D corroborou o padrão observado na AMOVA, indicando que *B. vaillantii* não apresentar estrutura genética entre as localidades no rio, sugerindo um padrão de panmixia, que também é observado para outras espécies de peixes amazônicos (GALLETII, 2009; SANTOS et. al. 2007; MACHADO, 2013).

O resultado da AMOVA mostrou baixa variação genética entre as cachoeiras de Teotônio e Santo Antônio indicando que as cachoeiras não impediam o fluxo gênico de *B. vaillantii* na região. As corredeiras do rio Madeira foram alvo de estudos para várias espécies para avaliar a diferenciação populacional, mas as corredeiras do rio Madeira parecem atuar de forma não seletivas sobre as algumas espécies aquáticas (TORRENTE-VILARA et al. 2011). O fato pode ser observado em vários estudos: como no estudo de Lira-Cordeiro (2013) com a espécie *B. capapretum* cujos dados também não evidenciaram diferenciação genética entre as cachoeiras; para *B. platynemum*, Ochoa et. al. (2015) verificaram que a Cachoeira de Teotônio apresentara-se como barreira ao fluxo gênico, delimitando as populações à montante e à jusante. A migração de *B. rousseauxii* no rio Madeira ocorre normalmente sem interrupções do fluxo gênico desde sua desembocadura, próximo da cidade de Itacoatiara (AM) até a cabeceira, próximo da cidade de Pucalpa (Peru) (BATISTA, 2010). Para *B. filamentosum* (HUERGO, 2009) as cachoeiras parecem não atuar como barreira, mas o que prevalece é a tendência da espécie pela segregação genética associada ao tipo de água dos rios na Amazonia.

Fluxo gênico

As taxas de fluxo gênico, baseado nos valores de Nm apresentaram-se acima de 4,0. Segundo Kimura, Mauama (1971) resultados acima desse valor indicam a formação de uma unidade panmítica quando estimadas em valores de Nm . Os valores de Nm nesse estudo por ser maior de que 4,0 indica forte evento de mistura resultando em fluxo gênico intenso. O estudo par a par entre as localidades mostrou o fluxo de gênico entre Itacoatiara e C. Santo

Antônio ($Nm = 2499,750$) menor que o entre Humaitá e C. Teotônio ($Nm = 6107,111$) (Tabela 8).

Na análise temporal os valores de Nm tiveram variação entre 17,549 (2009/2013) a 2499,750 (2006/2013). Os valores de Nm se mostraram elevados em todos os anos, porém entre os anos de 2009/2013, ainda que tenha indicado um valor elevado para fluxo gênico, mostrou-se relativamente menor se comparado com as demais análises anuais. Entre os anos de 2008 e 2009 teve início da construção da enxadaeira e desvio do rio Madeira para construção da Usina Hidrelétrica de Santo Antônio. As obras tiveram grande impacto sobre o pescado, levando a morte de várias espécies de peixes, incluindo os Siluriformes, fato observado também durante a construção da hidrelétrica de Samuel (SANTOS, 1995). A morte de vários indivíduos pode refletir na redução da diversidade gênica da espécie. Em populações com ampla distribuição panmítica como a da piramutaba, a variabilidade genética pode ser equilibrada em uma próxima geração, mas em populações pequenas, o risco de extinção deve ser considerado (FRANKHAM, 1995).

Neste estudo, foi observado que a piramutaba possui alta variabilidade genética e alto fluxo gênico sem diferenciação genética entre sete localidades amostradas entre Itacoatiara (na boca do rio Madeira) até Jirau (o ponto distante da boca do rio). Também não foi observada diferenciação genética significativa entre localidades a jusante e a montante das cachoeiras de Teotônio e Santo Antônio. Em vista dos resultados, recomenda-se que seja realizado um monitoramento da espécie ao longo do tempo para se estabelecer medidas mitigadoras visando garantir o ciclo de migração ao longo do rio Madeira, a fim de evitar o isolamento populacional e declínio da diversidade da espécie.

Agradecimentos

Agradecemos a Universidade do Estado do Amazonas – UEA e ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia. À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão de bolsas de estudo. Ao Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA) e ao Laboratório Temático de Biologia Molecular (LTBM / INPA) pela concessão da infraestrutura e logística para a execução desse trabalho. Ao CNPq e FAPEAM (projeto Pirada – Genética, manejo e conservação dos grandes bagras migradores na Amazônia) pelo financiamento deste estudo.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABREU, M. M; PEREIRA, L. H. G; VILA, V. B; FORESTI, F; OLIVEIRA, C. Genetic variability of two populations of *Pseudoplatystoma reticulatum* from the Upper Paraguay River Basin. **Genetics and Molecular Biology**. v. 32, n. 4, p. 868-873, 2009.
- ALBERT, J. S; PETRY, P; REIS, R. E. Major Biogeographic and Phylogenetic Patterns. In: ALBERT, J. S; REIS, R. E. (ed.). Historical biogeographical of neotropical freshwater fishes. Berkeley, Los Angeles, London: **University of California Press**. 2011.
- ALLENDORF, F. W; RYMAN, N; UTTER, F. **Genetics and Fishery Management: Past, Present, and Future**. In: RYMAN, N; UTTER, F. (Eds.) Population genetics and Fishery Management. Universidade de Washington. Washington. p. 18, 1987.
- ARIAS, J; SANCHEZ, L; MARTINEZ, P. Low stocking incidence in brown trout populations from northwestern Spain monitored by LDH-5* diagnostic marker. **J. Fish Biol.** v. 47, p. 170-176, 1995.
- AVISE, J. C. **Molecular markers, natural history and evolution**. Chapman & Hall, New York, 511 pp. 1994.
- AVISE, J. C; HAMRICK, J. L; **Conservation genetics. Case histories from nature**. Chapman e Hall, New York, p. 512, 1996.
- AVISE, J. C. **Molecular Markers, Natural History and Evolution**, 2 ed. Sinauer Associates, Sunderland, MA. p. 684, 2004.
- BARTHEM R. B. **Ecologia e pesca da piramutaba (*Brachyplatystoma vaillantii*)**. 1990. 268 f. Tese (Doutorado em Ciências) Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1990.
- BARTHEM R. B; GOULDING, M. **Os bagres balizadores: Ecologia, Migração e Conservação de peixes amazônicos**. Brasília: Sociedade Civil Mamirauá CNPq. 1997.
- BATISTA, J. S. **Caracterização genética da dourada – *Brachyplatystoma rousseauxii*, Castelnau, 1855 (Siluriformes: Pimelodidae) na Amazônia por meio de marcadores mitocondriais e microssatélites: subsídios para conservação e manejo**. 2010. 148 f. Tese (Doutorado em Genética, Conservação e Biologia Evolutiva) Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia, Manaus, 2010.
- BOTSTEIN, D; WHITE, R. L; SKOLNICK, M. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. **Amazon Journal Human Genetics**, v. 32, p. 314-331, 1980.
- CASTILLO, O. R. G. Pesca: artes e métodos de captura industrial no estuário do Pará, Brasil. B. **FCAP**. v. 10, p. 93-112, Belém, 1978.
- CELLA-RIBEIRO, A; TORRENTE-VILARA, G; HUNGRIA, D. B. D. B; DE OLIVEIRA, M. As corredeiras do rio Madeira. In: QUEIROZ, L. J, TORRENTE-VILARA, G; OHARA,

W. M; PIRES, T; ZUANON J; DORIA, C. R. C. **Peixes do rio Madeira**. Editora Diaeto, p. 56-63, São Paulo, Brasil, 2013.

CHAVES, R. A; SILVA, K. C. A; IVO, C. T. C; CINTRA, I. H. A; AVIZ, J. S. Sobre a pesca da piramutaba, *Brachyplatystoma vaillantii* (Valenciennes, 1940) em pescarias das frotas industrial no estado do Pará. **Boletim Técnico Científico (CEPNOR)**, v. 3, n.1, Belém, 2003.

CHEVOLOT, M; ELLIS, J. R; HOARAU, G; RIJNSDORP, A. D; STA, W. T; OLSEN, J. L. Population structure of the thornback ray (*Raja clavata* L.) in British waters. **J Sea Res**, v. 56, p. 305-316, 2006.

CRUZ, C. D. et al. **Biometria aplicada ao estudo da diversidade genética**. Visconde do Rio Branco, MG: Suplema, 2011. 620p.

DAKIN, E. E; AVISE, J. C. Microsatellite null alleles in parentage analysis. **Heredity**. v. 93, p. 504–509, 2004.

DEWOODY, J. A; SCHUP, J; KENEFIC, L; BUSCH, J; MURFITT L; KEIM P. Universal method for producing ROX-labeled size Standards suitable for automated genotyping. **Biotechniques**. v. 37, p. 348-352, 2004.

DIAS-NETO, J; MESQUITA, J. X. Potencial e exploração dos recursos pesqueiros do Brasil. **Ciência e Cultura**, v. 40, n. 5, p. 427-441, 1988.

EARL, D. A; JONHOLDT, B. M. Structure Harvester: a website and program for visualizing structure output and implement the Evanno method. **Conservation Genetics Resources**. vol. 4, v. 2, p. 359-361, 2012.

EXCOFFIER, L; H.E. L. LISCHER. Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. **Molecular Ecology Resources**. v. 10, p. 564-567, 2010.

FABRÉ, N. N; BARTHEM, R. B. (org.). **O manejo da pesca dos grandes bagres migradores: piramutaba e dourada no eixo Solimões-Amazonas**. Manaus: IBAMA/PROVÁRZEA, p. 49-73, 2005.

FALUSH, D; STEPHENS, M; PRITCHARD, J. K. Inference of Population Structure Using Multilocus Genotype Data: linked Loci and Correlated Allele Frequencies. **Genetics**, v. 164, p. 1567-1587, 2003.

FORMIGA-AQUINO, K. **Variabilidade genética da piramutaba - *Brachyplatystoma vaillantii* (Valenciennes, 1840) (Siluriformes - Pimelodidae) no sistema Estuário-Amazonas-Solimões**. 2004. 76p. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2004.

FRANKHAM, R. Conservation genetics. **Annual Review of Genetics**, v. 29, p. 305-27, 1995.

GALLETTI, E. S. **Distribuição da variabilidade genética da pescada, *Plagioscion squamosissimus* (HECKEL, 1840) na calha do Rio Amazonas.** Dissertação de mestrado. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia. Manaus. Amazonas. Brasil. p. 67, 2009.

GOUDET, J. FSTAT, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices version 2.9.3.2. Available from <http://www.unil.ch/izea/software/fstat.html>. Updated from **Goudet (1995)**, 2002.

GOULDING, M; BARTHEM, R. B; FERREIRA, E. J. G. **The Smithsonian Atlas of the Amazon.** Smithsonian Institution Press, Washington, DC. 2003.

GRAVENA, W; FARIAS, I. P; SILVA, M. N. F; SILVA, V. M. F; HRBEK, T. Looking to the past and the future: were the Madeira River rapids a geographical barrier to the boto (Cetacea: Iniidae)? **Conserv Genetics**. v. 15, p. 619-629, 2014.

HUERGO, G. P. C. M. **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 em Ciências Biológicas). INPA- Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia. Manaus. Amazonas. p. 116, 2005.

KIMURA, M; MARUYAMA, T. Pattern of neutral polymorphism in a geographically structure population. **Genet. Res.**, v.1, n. 9, 1971.

LIRA-CORDEIRO, A. **Estimativa da variabilidade genética da piraíba negra *Brachyplatystomacapapretum* (Siluriformes: Pimelodidae), por meio de marcadores mitocondriais e microssatélites.** 2013. 120p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia- Área de Concentração: Conservação e Uso dos Recursos Genéticos Animais da Amazônia). Instituto de Ciências Biológicas. Universidade Federal do Amazonas. 2013.

MACHADO, S. C. M. **Genética populacional do bagre amazônico *Pseudoplatystoma punctifer* (Siluriformes: Pimelodidae) nas sub-bacias dos rios Madeira e Mamoré/Guaporé.** 2013. p. 89. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia/PPGBIOTEC). Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2013.

MEES, R. The Auchenipteridae and Pimelodidae of Surinames (Pisces, Nematognathi). **Zool. Verh**, 132: p. 1-256, 1974.

MICHALAKIS, Y; EXCOFFIER, L. A Generic estimation of Population subdivision using distances between alleles with special reference for microsatellite loci. **Genetics**, v. 142, p. 1061-1064, 1996.

MINISTÉRIO DA PESCA E AQUICULTURA. **Boletim Estatístico da Pesca e Aquicultura Brasil - 2010.** Brasília, 2010.

MOREIRA, A. A; HILSDORF, A. W. S; SILVA, J. V; SOUZA, V. R. Variabilidade de tilápia nítótica por meio de marcadores microssatélites. **Pesq. agropec.**, Brasília, v. 42, n. 4, p. 521-526, 2007.

NEI, M. **Molecular Evolutionary Genetics**. Columbia University Press. New York. p. 512, 1987.

NELSON, J. S. **Fishes of the world**. 4 ed. John Wiley & Sons, Inc. 2006.

OCHOA, L. E; PEREIRA, L. H. G; COSTA-SILVA, G. J; ROXO, F. F; BATISTA, J. S; FORMIGA, K; FORESTI, F; OLIVEIRA, C. Genetic structure and historical diversification of catfish *Brachyplatystoma platynemum* (Siluriformes: Pimelodidae) in the Amazon basin with implications for its conservation. **Ecology and Evolution**. v. 5, n. 10, 2015.

PARK, S. D. E. Trypanotolerance in West African Cattle and Population Genetic Effects of Selection Ph. D. Thesis (in prep.), University of Dublin, 2001.

PEAKALL, R; SMOUSE, P. E. Genalex analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. **Molecular Ecology Notes**, v. 6, p. 288-295, 2006.

PEREIRA, L. H. G; FORESTI F; OLIVERIA, C. Genetic structure of the migratory catfish *Pseudoplatystoma corruscans* (Siluriformes, Pimelodidae) suggests homing behavior. **Ecol Freshw Fish**. v. 18, p. 215-225, 2009.

PRITCHARD, J. K.; STEPHEENS, M.; DONNELLY, P. Interference of population structure using multilocus genotype data. **Genetics**, v. 155, p. 945-959, 2000.

RICE, W.R. Analyzing tables of statistical tests. **Evolution**, v. 43, p. 223-225, 1989.

RODRIGUES, F. C. **Estimativa da variabilidade genética da piramutaba (*Brachyplatystoma vaillantii*) por meio de marcadores moleculares microssatélites e D-loop de quatro localidades da Amazônia diferenças entre calha e tributário**. 2009. 96p. Dissertação (Mestrado em Genética, Conservação e Biologia Evolutiva) Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2009.

RUFFINO, M.L, ISAAC, V. J. Ciclo de vida e parâmetros biológicos de algumas espécies de peixes da Amazônia. In: Recursos pesqueiros do médio Amazonas: biologia e estatística pesqueira. **Edições IBAMA. Coleção Meio Ambiente. Série estudos da pesca**, Brasília, pp 11-30, 2000.

SAMBROOK, J; FRITSCH, E. F; MANIATIS, T. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. New York: Cold Springs Harbor Laboratory Press, 1989.

SANTOS, G. M. Impactos da Hidrelétrica Samuel Sobre as comunidades de peixes do Rio Jamari (Rondônia, Brasil). **ACTA AMAZÔNICA**, v. 25, n. 3/4, p. 247-280, 1995.

SANTOS, M. C. F. **Caracterização da diversidade genética de populações naturais de tambaqui (*Colossoma macropomum*) através de marcadores moleculares: uma contribuição para conservação da espécie**. 2010. 176p. Tese (Doutorado em Biotecnologia - Área de Concentração: Conservação e Uso dos Recursos Genéticos Animais da Amazônia). Instituto de Ciências Biológicas. Universidade Federal do Amazonas. 2010.

SANTOS, M. C. F; RUFFINO, M. L; FARIAS, I. P. 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.** n. 71, p. 33-44, 2007.

SCHUELKE, M. An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. **Nature Biotech**, v.18, p. 233-4, 2000.

SLATKIN, M. Gene flow in natural populations. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v. 16, p. 393-430, 1985.

TORRENTE-VILARA, G; ZUANON, J; LEPRIEUR, F; OBERDORFF, T; TEDESCO P. A. Effects of natural rapids and waterfalls on fish assemblage structure in the Madeira River (Amazon Basin). **Ecology of Freshwater Fish**: v. 20, p. 588–597, 2011.

VAN OOSTERHOUT, C; HUTCHINSON, DEREK, P. M. W; SHIPLEY, P. Microchecker: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. **Molecular Ecology Notes**, v. 4, p. 535-538, 2004.

VAZZOLER, A. **Biologia da reprodução de peixes teleósteos: Teoria e prática** São Paulo. 1996

WATTIER, R; ENGEL, C. R; SAUMITOU-LAPRADE, P; VALERO, M. Short allele dominance as a source of heterozygote deficiency at microsatellite loci: experimental evidence at the dinucleotide locus Gv1CT in *Gracilaria gracilis* (Rhodophyta). **Molecular Ecology**, v. 7, p. 1569-1573, 1998.

WEIR, B. S. **Genetic Data Analysis II: Methods for Discrete Population Genetic Data**. Sinauer Associates. Inc. Sunderland, MA. p. 376, 1996.

WINEMILLER K. O. Patterns of variation in life history among South American fishes in seasonal environments. **Oecologia**: vol.81, 2. p. 225-241, 1989.

4 DISCUSSÃO GERAL

Os vinte e dois locos microssatélites desenvolvidos para piramutaba apresentaram amplificação satisfatória e alto grau de polimorfismo para a espécie. A transferibilidade foi eficiente para as demais espécies do gênero *Brachyplatystoma* e também para as espécies de *Phractocephalus hemiliopterus* e *Pseudoplatystoma punctifer*, mostrando-se boas ferramentas para estudos genéticos populacionais. Dez locos foram selecionados e aplicados no estudo para avaliar a variabilidade genética populacional da piramutaba no rio Madeira. Os locos mostraram-se altamente polimórficos em duas análises (espacial e temporal), indicando um alto grau de polimorfismo, ausência de estruturação genética e alto fluxo gênico entre as Localidades estudadas. Os resultados obtidos indicam que a piramutaba possui distribuição homogênea entre as localidades das cachoeiras de Teotônio e Santo Antônio, não indicando estruturação genética na região das corredeiras. De modo geral, há evidência de panmixia para a piramutaba. Considerando a estrutura genética identificada para *Brachyplatystoma vaillantii* e a sua alta variabilidade genética na região do rio Madeira, a realização do monitoramento da espécie será de grande importância, uma vez que se trata de uma área altamente modificada, sendo possível promover medidas de manejo para fins de conservação desse recurso visando garantir o ciclo de migração da espécie ao longo do rio Madeira.

5 CONCLUSÃO

- Este trabalho disponibilizou como produto biotecnológico, 22 locos microsatélites espécie-específicos altamente polimórficos para *Brachyplatystoma vaillantii*.
- A transferibilidade dos locos foi eficiente para outras espécies do gênero *Brachyplatystoma* além das espécies *Phractocephalus hemiliopterus* e *Pseudoplatystoma punctifer*, relacionadas filogeneticamente com *B. vaillantii*, também se mostrando polimórficos.
- Não foi observada diferenciação genética significativa espacial, entre as sete localidades amostradas.
- Também não houve diferenciação genética temporal significativa, ao comparar quatro anos entre 2003 a 2013 no intervalo entre 3-4 anos.
- Alto fluxo gênico foi observado entre as sete localidades amostradas inclusive entre as cachoeiras de Teotônio e de Santo Antônio, que não representam barreiras ao fluxo gênico.
- A piramutaba compõe uma única população panmítica entre Itacoatiara e a Cachoeira de Jirau no rio Madeira, podendo ser considerada com um único estoque genético para fins de conservação e manejo.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABREU, M. M; PEREIRA, L. H. G; VILA, V. B; FORESTI, F; OLIVEIRA, C. Genetic variability of two populations of *Pseudoplatystoma reticulatum* from the Upper Paraguay River Basin. **Genetics and Molecular Biology**, v. 32, n. 4, p. 868-873, 2009.
- AGRA, K. L. O. Porto Velho e as usinas Hidrelétricas de Santo Antônio e Jirau: riscos e vulnerabilidades Socioambientais. **Revista Geonorte**, [S.I], v. 2, n. 5, p. 565-572, 2012.
- AIDA - Asociación Interamericana para la Defensa del Ambiente Grandes Represas. **B. Complexo Hidrelétrico do Rio Madeira**. 2009. Disponível em: <http://www.aida-americas.org/sites/default/files/refDocuments/Estudo_de_caso_Madeira_portuguese_0.pdf>. Acesso em: 10 dez. 2013.
- ALMEIDA, O. T. **A indústria pesqueira na Amazônia**. Manaus: Ibama/Provarzea. p. 110, 2006.
- AGÊNCIA NACIONAL DE ÁGUAS (Brasil). Região Hidrográfica Amazônica. Brasília, [2011]. Disponível em: <<http://www2.ana.gov.br/Paginas/portais/bacias/amazonica.aspx>>. Acesso em: 07 abr. 2015.
- AGÊNCIA NACIONAL DE TRANSPORTES AQUARIÁRIOS-ANTAQ. **Transporte de cargas nas hidrovias Brasileiras 2010**. Brasília, 2011.
- ARCOT, S. S. WANG, Z; WEBER, J. L; DEININGER, P. L; BATZER, M. A. Alu repeats: a source for the genesis of primate microsatellites. **Genomics**, v. 29, p. 136-144, 1995.
- AVISE, J. C. **Molecular Markers, Natural History and Evolution**. Sinauer Associates, 2 ed. p. 684, Sunderland, MA, 2004.
- BARTHEM, R. B. **Ecologia e pesca da piramutaba (*Brachyplatystoma vaillantii*)**. 1990. 268 f. Tese (Doutorado em Ciências) Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas, 1990.
- BARTHEM, R. B; GOULDING, M. **Os bagres balizadores: Ecologia, Migração e Conservação de peixes amazônicos**. Brasília: Sociedade Civil Mamirauá CNPq. 1997.
- BARTHEM, R. B; GOULDING, M. **An unexpected ecosystem: the Amazon revealed by the fisheries**. Gráfica Biblos, Lima/Botanical Gardem Press, 2007.
- BATISTA, J. S; FORMIGA, K; FARIAS, I. P; ALVES-GOMES, J. A. Variabilidade genética da dourada e da piramutaba na bacia amazônica. In: Fabr , N. N; Barthem, R. B. O manejo da pesca dos grandes bagres migradores: piramutaba e dourada no eixo Solimões-Amazonas. **IBAMA, Pr V rzea, Cole o de Documentos Técnicos**, p. 114, Manaus, 2005.
- BATISTA, J. S; FARIAS, I. P; FORMIGA-AQUINO, K; SOUZA, A. C. B; ALVES-GOMES, J. A. DNA microsatellite markers for "dourada" (*Brachyplatystoma rousseauxi*, Siluriformes: Pimelodidae), a migratory catfish of utmost importance for fisheries in the Amazon: development, characterization and inter-specific amplification. **Conservation Genetics Resources**. v. 2, p. 5-10, 2010.

BEHEREGARAY L. B; MOLLER, L. M; SCHWARTZ, T. S; CHAO, N. L; CACCONE, A. Microsatellite markers for the cardinal tetra *Paracheirodon axelrodi*, a commercially important fish from central Amazonia. **Molecular Ecology**. v. 4, p. 330-332, 2004.

CABRAL JR, W; ALMEIDA, O.T. **Avaliação do mercado da indústria pesqueira na Amazônia**. In: Almeida, O.T. (ed.) A indústria pesqueira na Amazônia. Ibama/Provarzea, Manaus. p. 17-39. 2006.

CARRILLO-AVILA, M; REZENDE, E; MARQUES, D; GALETTI, P. Isolation and characterization of polymorphic microsatellites in the threatened catfish jaú, *Zungaro jahu* (Siluriforme, Pimelodidae). **Conservation**, v. 10, p. 1597-1599, 2009.

CARVALHO, G. R. Evolutionary aspects of fish distribution: genetic variability and adaptation. **Journal of Fish Biology**. v. 43, p. 53-73, 1993.

CASTILLO, O. R. G. Pesca: artes e métodos de captura industrial no estuário do Pará, Brasil. B. **FCAP**. v. 10, p. 93-112, Belém, 1978.

CELLA-RIBEIRO, A; TORRENTE-VILARA, G; HUNGRIA, D. B. D. B; DE OLIVEIRA, M. As corredeiras do rio Madeira. In: QUEIROZ, L. J, TORRENTE-VILARA, G; OHARA, W. M; PIRES, T; ZUANON J; DORIA, C. R. C. **Peixes do rio Madeira**. Editora Dialetto, p. 56-63, São Paulo, Brasil, 2013.

CERVIGÓN, F; CIPRIANI, R; FISCHER, W; GARIBALDI, L; HENDRICKX, M. **Guia de campo de las especies comerciales marinas y de aguas salobras de la costa septentrional de sur américa**. 513p, Roma, FAO, 1992.

CHASE, M; KESSELY, R; BAWA, K. Microsatellite markers for population and conservation genetics of tropical trees. **American Journal of Botany**, v. 83, n.1, p. 51-57, 1996.

CHAVES, R.A; SILVA, K. C. A; IVO, C. T. C; CINTRA, I. H. A; AVIZ, J. S. Sobre a pesca da piramutaba, *Brachyplatystoma vaillantii* (Valenciennes, 1940) em pescarias das frotas industrial no estado do Pará. **Boletim Técnico Científico (CEPNOR)**, v. 3, n.1, Belém, 2003.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO CONAB. Corredores de escoamento da Produção Agrícola, 2006.

COSTELLO, A. B; DOWN T. E; POLLARD, S. M; PACAS, C. J; TAYLOR, E. B. 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, 2003.

COSTA, L. S. S. As Hidrovias Interiores no Brasil. Rio de Janeiro: Serviço de Documentação da Marinha, 1998.

DI RIENZO, A. PETERSON, A. C; GARZA, J. C; VALDES, A. M; SLATKIN, M; FREIMER, N. B. Mutation processes of simple-sequence repeat loci in human populations.

Proceeding of the National Academy of Sciences of the United of America, v. 91, p. 3166-3170, 1994.

DIAS-NETO, J; MESQUITA, J. X. Potencial e exploração dos recursos pesqueiros do Brasil. **Ciência e Cultura**, v. 40, n.5, p. 427-441, 1988.

ELETROBRAS - CENTRAIS ELÉTRICAS BRASILEIRAS. Sistema de informação do potencial hidrelétrico brasileiro - SIPOT. Rio de Janeiro, abr. 2003. Disponível em: http://www.aneel.gov.br/aplicacoes/atlas/energia_hidraulica/4_3.htm> Acessado em: 14 jan. 2014.

ENERGIA SUSTENTÁVEL DO BRASIL. Características. Brasil, 2013. Disponível em: <<http://www.energiasustentaveldobrasil>>. Acesso em: 16 jan. 2014.

ESGUÍCERO, A; ARCIFA, M. Fragmentation of a Neotropical migratory fish population by a century-old dam. **Hydrobiologia**, v. 638, n. 1, p. 41-53, 2010.

FABRÉ, N. N; BARTHEM, R. B. (org.) **O manejo da pesca dos grandes bagres migradores: piramutaba e dourada no eixo Solimões-Amazonas**. Manaus: IBAMA/PROVÁRZEA, p. 49-73, 2005.

FARIAS, I. P; HRBEK, T; BRINKMANN, H; SAMPAIO, I; MEYER, A. Characterization and isolation of DNA microsatellite primers for *Arapaima gigas*, an economically important but severely over-exploited fish species of the Amazon basin. **Molecular Ecology Notes**, v. 3, p. 128-130, 2003.

FEARNSIDE, P.M. A hidrelétrica de Balbina: o faraonismo irreversível versus o meio ambiente na Amazônia. Instituto de Antropologia e Meio Ambiente, São Paulo, 1990

FEARNSIDE, P. M. Environmental impacts of Brazil's Tucuruí Dam: Unlearned lessons for hydroelectric development in Amazonia. **Environmental Management**, [S.I.], v. 27, n. 3, p. 377-396, 2001.

FERREIRA, M. E; GRATTAPAGLIA, D. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. 2. ed. Brasília: Embrapa, p. 220. 1996.

FORMIGA-AQUINO, K. Variabilidade genética da piramutaba - *Brachyplatystoma vaillantii* (Valenciennes, 1840) (Siluriformes - Pimelodidae) no sistema Estuário-Amazonas-Solimões. 2004. 76p. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2004.

FRANKHAM, R. Conservation genetics. **Annual Review of Genetics**, v. 29, p. 305-27, 1995.

GODOY, M. P. Marcação e migração de piramutaba *Brachyplatystoma vaillantii* (Val., 1840) na bacia amazônica (Pará e Amazonas, Brasil) (Pisces, Nematognathi, Pimelodidae). **Bol. FCAP**, v. 11, p. 23-21, 1979.

GOLDSTEIN, D. B; POLLOCK, D. D. Launching microsatellites: a review of mutation processes and methods of phylogenetic inference. **Journal of Heredity**, v. 88, n. 8, 1997.

GOLDSTEIN, D. B; SCHÖLTTERER, C. Microsatellites: evolution and applications. Oxford University Press, **Oxford**, p. 352, 1999.

GOULDING, M; BARTHEM, R. B; FERREIRA, E. J. G. **The Smithsonian Atlas of the Amazon**. Smithsonian Institution Press, Washington, DC. 2003.

INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS. **Relatório estatístico da pesca – 2007**. Brasil – Grandes Regiões e Unidades da Federação. Brasília – DF: IBAMA, p. 151. 2007.

JIMENEZ, E. A; FILHO, M. A; FRÉDOU, F. L. Fish bycatch of the laulao catfish *Brachyplatystoma vaillantii* (Valenciennes, 1840) trawl fishery in the amazon estuary. **Brazilian Journal of Oceanography**, v. 61, n. 2, p. 129-140, 2013.

KIMURA, M; CROW, J. F. The number of alleles that can be maintained in a finite population. **Genetics**, v. 49, p.725-738, 1064, 1964.

KNAEPKENS, G. VERHEYEN, E; GALBUSERA, P; EENS, M. He use of genetic tools for the evaluation of a potential migration barrier for the bullhead. **Journal of Fish Biology**, v. 64, p. 1737-1744, 2004.

LAATS, H. **El Dilema Amazónico: La Construcción de Meda-represas em El Río Madeira**. Editora El País, Santa Crus de La Sierra, Bolivia, 2010.

LANZARO, G. C; ZHENG, L; TOURE, Y. T; TRAORE, S. F; KAFATOS, F. C; VERNICK, K. D. Microsatelite DNA and isoenzyme variability in a west African population of *Anopheles gambiae*. **Insect Molecular Biology**, v. 4, n. 2, p. 105-112, 1995.

LIRA-CORDEIRO, A. FORMIGA, K. M. SOUSA, A. C. B., ALVES-GOMES, J. BATISTA, J. S. Isolation and characterization of 24 microsatellite loci for the commercial Amazonian freshwater catfish *Brachyplatystoma capapretum* (Siluriformes: Pimelodidae). **Conservation Genetics Resources**, 2014.

LUNDBERG, J. G; AKAMA, A. *Brachyplatystoma capapretum*: New Speceis of Goliath Catfish from the Amazon Basin, with a Reclassification of Allied Catfishes (Siluriformes: Pimelodidae). **Copeia**, p. 492-516, 2005.

MATSUMOTO, C. K; HILSDORF, A. W. S. Microsatellite variation and population genetic structure of a neotropical endangered Bryconinae species *Brycon insignis* Steindachner, 1877: implications for its conservation and sustainable management. **Neotropical Ichthyology**, v. 7, n. 3, p. 395-402, 2009.

MCCOUCH, S. R. CHEN, X; PANAUD, O; TEMYKH, S; XU, Y; CHO, Y. G; HUANG, N; ISHII, T; BLAIR, M. Microsatellite marker development, mapping and application in rice genetics and breeding. **Plant Molecular Biology**, v. 35, p. 89-99, 1997.

MEES, R. **The Auchenipteridae and Pimelodidae of Suriname (Pisce, Nematognathi)**. Zool. Verh, 132: 1-256, 1974.

MINISTÉRIO DA PESCA E AQUICULTURA.

Boletim Estatístico da Pesca e Aquicultura - Brasil - 2010. Brasília, 2010.

MOESER, A. A; BERMINGHAM, E. Isolation and characterization of eight microsatellite loci for the neotropical freshwater catfish (*Pimelodella Chagresi*) (Teleostei: Pimelodidae). **Molecular Ecology Notes**, v. 5, p. 363-365, 2005.

MONTOYA-BURGOS, J. I. Historical biogeography of the catfish genus *Hypostomus* (Siluriformes: Loricariidae), with implications on the diversification of Neotropical ichthyofauna. **Molecular Ecology** v. 12, p. 1855–1867, 2003.

MOREIRA, A. A; HILSDORF, A. W. S; SILVA, J. V; SOUZA, V. R. Variabilidade de tilápia nítótica por meio de marcadores microssatélites. **Pesq. agropec.**, Brasília, v. 42, n. 4, p. 521-526, 2007.

MORET, A. S; GUERRA, M. G. Hidrelétricas no rio Madeira: reflexões sobre impactos ambientais e sociais. **UMED.NET**. v. 3, n. 7, 2009.

NEHLSSEN, W; WILLIAMS, J. E; LICHTATOWICH. J. A. Pacific salmon at the crossroads: stocks risk from California, Oregon, Idaho and Washington. **Fisheries**, v. 16, p. 4-21, 1991.

NELSON, J. S. **Fishes of the world**. 4 ed. USA: John Wiley & Sons, Inc. 1994.

NELSON, J. S. **Fishes of the world**. 4 ed. John Wiley & Sons, Inc., 2006.

NERAAS, L. P; SPRUELL, P. Fragmentation of riverine systems: the genetic effects of dams on bull trout (*Salvelinus confluentus*) in Clark Fork River system. **Molecular Ecology Notes**, v. 10, p. 1153-1164, 2001.

NGAMSIRI, T; OHASHI, Y; SUKUMASAVIN, N; NAKAJIMA, M; NANAKORN, U; TANIGUCHI, N. Characterization of microsatellite DNA markers in a critically endangered species, Mekong giant catfish, *Pangasianodon gigas*. **Molecular Ecology Notes**, v. 6, p. 313-315, 2006.

OCHOA, L. E; PEREIRA, L. H. G; COSTA-SILVA, G. J; ROXO, F. F; BATISTA, J. S; FORMIGA, K; FORESTI, F; OLIVEIRA, C. Genetic structure and historical diversification of catfish *Brachyplatystoma platynemum* (Siluriformes: Pimelodidae) in the Amazon basin with implications for its conservation. **Ecology and Evolution**. v. 5 n. 10, 2015.

OLIVEIRA, A; CAMARGO, M. **Diferença no tamanho médio da espécie *Brachyplatystoma vaillantii* capturada em julho de 2008 e julho de 2009.** In: IV Congresso de Pesquisa e Inovação da Rede Norte e Nordeste de Educação Tecnológica, Belém, PA, 2009.

PAIVA, M. P. **Recursos Pesqueiros Estuarinos e Marinhos do Brasil.** Fortaleza: Universidade Federal do Ceará, 1997.

REVALDAVES, E; PEREIRA, L. H. G; OLIVEIRA, C. Isolation and characterization of microsatellite loci in *Pseudoplatystoma corruscans* (Siluriforme: Pimelodidae) and cross-species amplification. **Molecular Ecology Notes**, v. 5, p. 463-465, 2005.

RODRIGUES, C; FARIAS, I. P; BATISTA, J. S; ALVES-GOMES, J. Isolation and characterization of microsatellites loci for “piramutaba” (*Brachyplatystoma vaillantii*, Siluriformes: Pimelodidae), one of the commercially most import migratory catfishes in the Amazon Basin. **Conservation Genet Resour**, v. 1, n. 1, p. 365-368, 2009.

RYMAN, N. Conservation genetic considerations in fishery management. **Journal of Fish Biology**. v.3, p. 211-224, 1991.

SANTOS, G. M. Impactos da Hidrelétrica Samuel Sobre as comunidades de peixes do Rio Jamari (Rondônia, Brasil). **ACTA AMAZÔNICA**, v. 25, n. 3/4, p. 247-280, 1995.

SANTOS, M. D. C. F; HRBEK, T; FARIAIS, I. P. Microsatellite markers for the tambaqui (*Colossoma macropomum*, Serrasalminidae, Characiformes), na economically important keystone species of the Amazon River floodplain. **Molecular Ecology Resources**, v. 9, p. 874-876, 2009.

SAULO-MACHADO, A. C; FORMIGA, K. M; ORTIZ, M. F; SOUZA, A. C. B; ALVESGOMES, J. A; BATISTA, J. B. Polymorphic microsatellite markers for the Amazonian catfish *Pseudoplatystoma punctifer* (Siluriformes: Pimelodidae). Conservation genetics resources. p. 231-234, 2010.

SERRA, M. A; FERNANDEZ, R, G. Perspectivas de desenvolvimento da Amazônia: motivos para o otimismo e para o pessimismo. **Economia e Sociedade**. v. 13, Np. 2 (23), p. 107-131, 2004.

SHÖTTERER, C. Microsatellit analysis indicates genetic differentiation of the neo-sex chromosomes in *Drosophila Americana Americana*. **Heredity**, v. 85, p. 610-616, 2000.

SILVA, T. D. J. D; HRBERK, T; FARIAS, I. P. Microsatellites markers for the silver arowana *Osteoglossum bicirrhosum* (Osteoglossidae, Osteoglossiformes). **Molecular Ecology Resources**, v. 9, p. 1019-1022, 2009.

SIQUEIRA, T. M. Estimativa da variabilidade genética da piramutaba (*Brachyplatystoma vaillantii* – Valenciennes 1840) do rio Madeira. 2003. 48 f. Monografia (Graduação em Ciências Biológicas). Centro Universitário Nilton Lins. Manaus, 2003.

SLATKIN, M. Gene flow in natural populations. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v. 16, p. 393-430, 1985.

SOUSA, W. L. Pacific salmon at the crossroads: stocks risk from California, Oregon, Idaho and Washington. 2000. 154 f. Tese (Doutorado em Engenharia) Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro 2000.

SUNNUCKS, P. Efficient genetic markers for population biology. **Tree** v. 15, p. 199-203, 2000.

SZPILMAN, M. **Peixes marinhos do Brasil: Guia prático de identificação**. 288p. Rio de Janeiro, Instituto Ecológico Aqualung, 2000.

TAVARES, R. A; NUNES, M. D; ALMEIDA, D. B; SILVA, J. C; VAZ, B. S; MOREIRA, C. G. A; DIONELLO, N. J. L; PIEDRAS, S. R. N; MOREIRA, H. L. M. Utilization of microsatellite markers to form families of "pejerrey" *Odontesthes bonariensis* in a genetic breeding program. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.63, n.5, p.1263-1267, 2011.

TAYLOR, E. B; STAMFORD, M. D; BAXTER, J. S. Population subdivision in westslope cutthroat trout (*Oncorhynchus clarki lewisi*) at the northern periphery of its range: evolutionary inferences and conservation implications. **Molecular Ecology Notes**, v. 12, p. 2609-2622, 2003.

THUESEN, P. A. PUSEY, B. J; PECK, D. R; PEARSON, R; CONGDON, B. C. Genetic differentiation over small spatial scales in the absence of physical barriers in an Australian rainforest stream fish. **Journal of Fish Biology**. v. 72, p. 1174-1187, 2008.

TORRENTE-VILARA, G; ZUANON, J; LEPRIEUR, F; OBERDORFF, T; TEDESCO, P. A. Effects of natural rapids and waterfalls on fish assemblage structure in the Madeira River (Amazon Basin). **Ecology of Freshwater Fish**, v. 20, p. 588-597, 2011.

TORRENTE-VILARA, G; QUEIROZ, L. J; OHARA, W. M. Um breve histórico sobre o conhecimento da fauna de peixes do Rio Madeira. In: TORRENTE-VILARA, G; QUEIROZ, L. J; OHARA, W. M. **Peixes do rio Madeira III**. Editora Dialeto, p. 19-25, São Paulo, Brasil, 2013.