

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU**

**LUZ ENEIDA OCHOA ORREGO**

**ANÁLISE FILOGEOGRÁFICA DE  
*Brachyplatystoma platynemum* (Siluriformes: Pimelodidae)**

**BOTUCATU  
FEVEREIRO/2012**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**  
**INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS DE BOTUCATU**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**  
**(ZOOLOGIA)**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**Análise filogeográfica de *Brachyplatystoma platynemum* (Siluriformes:  
Pimelodidae)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Zoologia) do Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, como requisito para a obtenção do título de Mestre.

Aluna: **Luz Eneida Ochoa Orrego**

Orientador: **Prof. Dr. Claudio de Oliveira**

**Botucatu**

**Fevereiro / 2012**

## **Agradecimentos**

São muitas as pessoas que contribuíram com este trabalho à quais agradeço de coração todo seu apoio e ajuda muito obrigada:

A meu pai Deus e a virgem Maria pela força e acompanhamento nestes dois anos de mestrado, sem eles nada fosse possível;

- Ao Prof. Dr. Claudio Oliveira, meu orientador. Agradeço por permitir me fazer parte de sua equipe, pelos ensinamentos e sugestões e pela ajuda na redação do escrito, muito obrigada;
- À professora Jacqueline Batista, do Instituto nacional de pesquisa da Amazônia (INPA) pelo fornecimento das amostras e ajuda com os microssatélites. Obrigada professora pelos ensinamentos e sugestões durante minha estadia em Manaus;
- Ao professor Fausto Foresti, pela ajuda e colaboração,
- Ao todo o pessoal do Laboratório Temático de Biologia Molecular do INPA, especialmente a Saulo, Luciana, Adriel, pela ajuda e compreensão durante minha estadia em Manaus, muito obrigada,
- Ao programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Zoologia) e ao Instituto de Biociências da UNESP-Botucatu, pela formação acadêmica;
- A todo o pessoal do Laboratorio de Biologia e Genética de Peixes pela acolhida, os ensinamentos e ajuda durante estes dois anos;
- A os amigos que levo no coração e que fizeram minha vida mais feliz: Kelly, Millke, Amanda, Vanessa, Bruno Melo, Zeca, Yuldi, Jefferson e Konrado, muito obrigado por todo o apoio e as incontáveis risadas;
- Os Luiz Henrique e Guilherme por seus ensinamentos e ajuda na redação do escrito, pelas muitas sugestões e a força, obrigada;
- A Tatiane Mariguela e a Diogo Cabral, pela ajuda na etapa inicial de meu mestrado, que Deus os abençoe!!!
- A meu namorado Geysson por ser minha força e minha inspiração... pela paciência, pela companhia e por toda a ajuda (moral e intelectual) neste tempo. Agradeço a Deus que você este a meu lado, muito obrigado meu Coração!!
- A meus amigos da Colômbia, Patricia, Mery, Alexandra, Maria Isabel, Cintia, Aleja, Francho, Ariel, Tatiana Mira por lembrar-se de me e pelos bate-papos que sempre tiveram palavras de força e carinho!!!! Eu os adoro!!!! Muito obrigada!!!!
- A meu chefe por sempre Oscar Vargas, pelo apoio e ajuda neste tempo, muito obrigada!!!
- A minha família, meus pais, Maria Melba e Pascual, pelo amor e educação; a todos meus irmãos em especial a Jose Luis e Claudia, pelo apoio e ajuda incondicional.... e especialmente a meus sobrinhos Laura, Lucas e Cindy por ser minha outra inspiração.... Adoro vocês...
- A minha grande amiga Margarita Garcia, por escutar-me, pelos conselhos e pela grande pessoa que representa pra me.....muito obrigada
- A empresa Santo Antonio Energia, pelo auxílio financeiro;
- À CNPq, pela bolsa de estudos, muito obrigada!!!

## Resumo

*Brachyplatystoma platynemum* é uma espécie de bagre amplamente distribuída no eixo Amazonas/Solimões e muitos de seus tributários e, apesar de ser considerado de baixo valor comercial, o declive do estoque de outras espécies de grandes bagres de interesse comercial tem levado ao incremento na captura desta espécie. Por outro lado, o estado atual da estrutura e variabilidade genética das populações desta espécie são desconhecidos. Neste sentido foi realizada uma análise filogeográfica através do sequenciamento de dois genes do DNA mitocondrial (região controle e o gene citocromo *b*) e de marcadores nucleares microssatélites, com o objetivo de determinar se a espécie esta composta de um único estoque geneticamente homogêneo ou se existe algum tipo de segregação genética associada com o espaço e o tempo, que possa ser relacionada com o comportamento de *homing*. Foi analisado um total de 216 indivíduos para a região controle, 140 para o gene citocromo *b* e 169 para seis locus microssatélites, em sete localidades. Os resultados indicam altos níveis de diversidade haplotípica e evidenciam estrutura genética dos indivíduos desta espécie em duas populações: rio Madeira e demais pontos de coleta, no entanto, a estrutura observada não constitui suficiente evidência para ser associada ao comportamento de *homing*. Estimativas do tempo de divergência baseadas no mtDNA indicam que as populações divergiram entre 1,0 a 1,5 Ma, tempo durante o qual a influencia das mudanças climáticas podem ter contribuído para a estrutura atual das populações de *B. platynemum*. Embora o padrão filogeográfico concorde com as predições da hipótese dos refúgios do Pleistoceno, a influência de eventos paleogeográficos e hidrológicos não pode ser descartada. Nossos resultados mostram a interação das mudanças climáticas e hidrológicas como resultado dos processos geológicos no Plio-Pleistoceno, na diversificação de populações na região amazônica. Além disso, nossos resultados sugerem que a existência de pelo menos duas populações de *B. platynemum* (rio Madeira e demais pontos amostrados) sejam consideradas como unidades independentes na elaboração de medidas de manejo e conservação para que se possa manter o tamanho e a variabilidade genética das populações naturais.

**Palavras-chaves:** Filogeografia, mtDNA, diversificação, rio Madeira

## Abstract

*Brachyplatystoma platynemum* is a catfish species widely distributed in the Amazonas / Solimões basin, despite being considered of little commercial interest, the decline of fish stock of other species has contributed to the increase in the catch of this species. However, the current state of the structure and genetic variability of populations of this species are unknown. In this sense a phylogeographic analysis was performed through sequencing of two mitochondrial molecular markers (control region and cytochrome *b* gene) and nuclear microsatellites. In order to determine whether the species is composed of a single genetic unit, or if there is any genetic segregation associated with space and time, which may be related to homing behavior. It was analyzed a total of 216 individuals in the control region, 140 for the gene cytochrome *b* and 169 individuals for six microsatellite loci in seven locations in the Amazon/Solimões basin. The results show high levels of haplotype diversity and evidence genetic structure in two populations (Amazon river channel and the Madeira River). However, the observed structure is not indicated of homing behavior. Divergence time estimates based on mtDNA indicated that the populations diverged between 1.5 to 1.0 Ma, during this time the influence of climate change may have contributed to the current structure of populations of *B. platynemum*. Although the phylogeographic patterns is consistent with the hypothesis of Pleistocene refuges, the influence of paleogeographic and hydrological events as a result of geological process in the Plio-Pleistocene, are important in the diversification of populations. Our results show the interaction of climate change as a result of hydrological and geological processes in the Plio-Pleistocene in the diversification of fish populations in the Amazon region. Finally, these results contribute with information to develop management and conservation measure that can contribute to maintaining the size and genetic variability of natural populations.

**Keywords:** Catfish, phylogeography, DNAmt, diversification, Madeira river

## **Epigrafe**

*A meus amores eternos, minha Mai, meu Pai  
e o presente de Deus meu  
coração.....Geysson.*

## Sumário

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
1.1 <i>BRACHYPLATYSTOMA PLATYNEMUM</i> , UM BAGRE POUCO CONHECIDO .....	2
1.2 A FILOGEOGRAFIA E ESTUDOS GENÉTICOS POPULACIONAIS DE PEIXES NEOTROPICAIS.....	4
1.3 MARCADORES MOLECULARES UTILIZADOS EM ANÁLISES FILOGEOGRÁFICAS E POPULACIONAIS .....	7
1.3.1 <i>DNA mitocondrial e região controle</i> .....	7
1.3.2 <i>Citocromo b (cytb)</i> .....	9
1.3.3 <i>Marcadores Microsatélites</i> .....	10
<b>2. OBJETIVO GERAL .....</b>	<b>13</b>
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	13
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>14</b>
3.1 ÁREA DE ESTUDO .....	14
3.2 REGIÃO CONTROLE E CITOCROMO <i>B</i> (DNA MITOCONDRIAL) .....	16
3.2.1 <i>Amplificação e sequenciamento do DNA mitocondrial</i> .....	16
3.2.2 <i>Análise das sequências nucleotídicas da Região Controle e do gene citocromo b</i> .....	17
3.3 MARCADORES MICROSATÉLITES .....	19
3.3.1 AMPLIFICAÇÃO E GENOTIPAGEM DOS MICROSATÉLITES .....	19
3.3.2 ESTIMATIVA DO TAMANHO DOS ALELOS E ANÁLISES DOS GENÓTIPOS .....	21
<b>4. RESULTADOS .....</b>	<b>23</b>
4.1 DNA MITOCONDRIAL .....	23
4.1.1 <i>Região Controle</i> .....	23
4.1.2 <i>Citocromo b</i> .....	31
4.2 MICROSATÉLITES .....	40
<b>5. DISCUSSÃO .....</b>	<b>49</b>
5.1 IMPLICAÇÕES PARA CONSERVAÇÃO E MANEJO DAS POPULAÇÕES DE <i>BRACHYPLATYSTOMA PLATYNEMUM</i> .....	61
<b>6. CONCLUSÕES GERAIS .....</b>	<b>63</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>64</b>

## Lista de Tabelas

Tabela 3.1 Localidades de coleta de <i>Brachyplatystoma platynemum</i> na Amazônia brasileira e peruana .....	15
Tabela 3.2 <i>Primers</i> utilizados na amplificação da região controle (D-loop) e do gene citocromo <i>b</i>	16
Tabela 3.3 Características dos <i>loci</i> microssatélites desenvolvidos por Batista <i>et al.</i> (2010) e utilizados no presente estudo.....	19
Tabela 3.4 Multiplex de genotipagem para os <i>loci</i> analisados .....	21
Tabela 4.1 Polimorfismos de DNA da região controle (D-loop) para os indivíduos de <i>Brachyplatystoma platynemum</i> para as localidades amostradas. N= número amostral; H=número de haplótipos; HU= haplótipos únicos; S= sítios polimórficos; ETA= número de mutações; HD= diversidade haplotípica; PI= diversidade nucleotídica .....	25
Tabela 4.2 Análise de variância para as sete localidades amostradas de <i>Brachyplatystoma platynemum</i> .....	26
Tabela 4.3 Análise de variância molecular para os dois grupos formados. Calha e tributários na área de estudo.....	26
Tabela 4.4 Análise de variância molecular para três grupos conformados pelas localidades amostradas no rio Madeira (CJ, TE e JT),e as localidades da calha (IP, B, M) e o rio Purus (RP)...	27
Tabela 4.5 Valores de $\Phi_{ST}$ par a par entre as localidades. <i>Números em negrito representam valores significativos (<math>P &lt; 0,002</math>)</i> .....	28
Tabela 4.6 Matriz do número de migrantes entre as localidades amostradas segundo Slatkin (1995) onde $M=N$ para dados haplóides.....	28
Tabela 4.7 Polimorfismos de DNA do gene citocromo <i>b</i> para os indivíduos de <i>Brachyplatystoma platynemum</i> para as localidades amostradas. N= número amostral; H=número de haplótipos; HU= haplótipos únicos; S= sítios polimórficos; ETA= número de mutações; HD= diversidade haplotípica; PI= diversidade nucleotídica.....	32
Tabela 4.8 Análise de variância para as sete localidades amostradas de <i>Brachyplatystoma platynemum</i> usando sequências do gene citocromo <i>b</i> .....	34
Tabela 4.9 Análise de variância molecular para os dois grupos formados. Calha e tributários na área de estudo.....	35
Tabela 4.10 Análise de variância molecular para três grupos conformados pelas localidades amostradas no rio Madeira (CJ, TE e JT), as localidades da calha (IP, B, M) e o rio Purus (RP) ....	36

Tabela 4.11 Valores de $\Phi_{ST}$ par a par entre as localidades amostradas para o gene citocromo <i>b</i> . Valor significativo de $P < 0,002$ em negrito. ....	36
Tabela 4.12 Valores de Nm segundo Slatkin (1995) para as localidades amostradas usando o gene citocromo <i>b</i> . ....	37
Tabela 4.13 Análise intrapopulacional de “ <i>Brachyplatystoma platynemum</i> ”. <i>n</i> , número de espécimes; <i>A</i> , número de alelos; $H_O$ , heterozigosidade observada; $H_E$ , heterozigosidade esperada; $F_{IS}$ , índice de endogamia. No equilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE) ( $P < 0.007$ ) após correção de Bonferroni e <i>R</i> , frequência de alelos nulos por loco.....	41
Tabela 4.14 Índices para as localidades amostradas. $N_{TOTAL}$ , número total de indivíduos; $A_T$ número total de alelos; $A_R$ , riqueza alélica; média da diversidade gênica e média das diferenças par a par..	44
Tabela 4.15 Análise AMOVA considerando todas as localidades amostradas para <i>Brachyplatystoma platynemum</i> em um mesmo grupo utilizando os índices $\Phi_{ST}$ e $R_{ST}$ . ....	45
Tabela 4.16 Índices de fixação $\Phi_{ST}$ (acima) e $R_{ST}$ (abaixo) par a par entre as localidades amostradas para <i>Brachyplatystoma platynemum</i> . <i>Números em negrito representam valores significativos</i> ( $P < 0,002$ ). ....	47

## Lista de Figuras

Figura 1.1 Fotografia de <i>Brachyplatystoma platynemum</i> .....	3
Figura 3.1 Localização dos pontos de coleta das amostras de <i>Brachyplatystoma platynemum</i> . IP=Iquitos, Perú; RP=Rio Purus, AM; CJ=Montante da cachoeira, Rio Madeira, AM; TE=Cachoeira de Teotônio, rio Madeira, AM; JT=Jusante da cachoeira, rio Madeira, AM; M=Manaus, AM; B=Belém, PA.....	15
Figura 4.1 Grafico de substituições nucleotídicas versus a distância genética para a região controle de <i>Brachyplatystoma platynemum</i> .....	24
Figura 4.2 Rede de haplótipos para <i>Brachyplatystoma platynemum</i> obtida de sequências parciais de DNA da região controle (D-loop). Os traços ligando os haplótipos representam uma única mutação, sendo as exceções assinaladas (!).....	29
Figura 4.3 Distribucion Mismatch usando a informação da região controle para os filogrupos encontrados. O primeiro gráfico corresponde ao filogrupos da Calha e o segundo ao filogrupo do rio Madeira.....	30
Figura 4.4 Tempo de divergência dos filogrupos estimado no BEAST, usando a região controle do mtDNA. Tempo em milhões de anos (Ma) antes do presente. Calha em verde e rio Madeira em azul. ....	31
Figura 4.5 Grafico de substituições nucleotídicas versus a distância genética para o gene citocromo <i>b</i> de <i>Brachyplatystoma platynemum</i> .....	32
Figura 4.6 Rede para 21 haplótipos de <i>Brachyplatystoma platynemum</i> usando o gene citocromo <i>b</i> . ....	38
Figura 4.7 Distribucion Mismatch usando a informação do gene citocromo <i>b</i> . Primeiro gráfico corresponde aos filogrupos da Calha e o segundo ao filogrupo do rio Madeira. ....	39
Figura 4.8 Tempo de divergencia dos filogrupos estimado no BEAST usando o gene citocromo <i>b</i> . Tempo em milhoes de anos (Ma) antes do presente. Calha em verde e rio Madeira em azul.....	39
Figura 4.9 Estimções de LnP(D) e delta (K) dos resultados da análise bayesiana, baixo o modelo Admixture, com K=1-8. ....	47
Figura 4.10 Gráfico obtido com o programa STRUCTURE evidenciando estrutura genética entre as seis localidades amostradas de <i>Brachyplatystoma platynemum</i> , formando dois grupos. Em verde as localidades da calha (Manaus e Iquitos) e o rio Purus, em vermelho as localidades amostradas no rio Madeira.....	48

## 1. Introdução

A Amazônia, com uma área geográfica de cerca de 6.500 km<sup>2</sup>, tem uma incomparável rede de rios e habitats aquáticos, os quais congregam a maior riqueza ictiológica do planeta. Aproximadamente 2.416 espécies (2.072 endêmicas) de peixes estão descritas, entretanto estima-se que este número pode ultrapassar 5.000 espécies (Lévêque *et al.*, 2008).

Diante desta diversidade, existe uma grande variedade de espécies apropriadas para o consumo humano. Os peixes representam não só uma fonte de proteína, mas também uma importante fonte de renda (Fabr e e Barges, 2005) sustentando uma captura anual de milhares de toneladas de pescado para a alimenta o, além de muitas espécies de peixes ornamentais que são comercializadas nos mercados da Ásia, Europa e América do Norte (Renno *et al.*, 2005). Tendo em conta esta diversidade, a pesca na região amazônica constitui uma das principais atividades econ micas, a qual   realizada nos níveis industrial e artesanal pelas popula es locais.

Na década de 1970, a abertura de novas rotas de transporte, a cria o de incentivos para a abertura de frigoríficos e a amplia o da frota pesqueira intensificou as atividades de explora o deste recurso. Paulatinamente, os pescadores artesanais também incrementaram as atividades de pesca, passando a representar uma das principais fontes de renda para as popula es ribeirinhas na Amazônia Ocidental (Fabr e e Borges, 2005).

Um grupo aproximado de 30 espécies de peixes são comercialmente capturados. Deste conjunto destacam-se os peixes sem escamas (grandes bagres da ordem Siluriformes), principalmente da família Pimelodidae, um clado com aproximadamente 300 espécies distribuídas nos rios na América do Sul e Central, ilhas do Caribe e sul do México (Nelson, 2006; De Pinna, 1998; Lundberg e Littman, 2003). Aproximadamente, 95% da captura referem-se a cinco espécies desta família, desta porcentagem, quase 80%   representada pela captura de quatro espécies de um mesmo gênero: *Brachyplatystoma rousseauxi* (dourada) *B. vaillantii* (piramutaba), *B. filamentosum* (piraiba clara) e *B. capapretum* (piraiba escura ou filhote capapreta) (Barthem e Goulding, 1997). Estima-se que a captura total dos grandes bagres migradores, compartilhada entre o Brasil, Colômbia, Peru e Bolívia, seja de 30.000 t/ano. No entanto, a estimativa mais próxima do real pode chegar a ser três vezes maior, visto que boa parte do que   capturado não   registrado pela sistemática de monitoramento pesqueiro atualmente disponível na região (FAO-COPESCAL,

2000). Além disso, devido a exploração dessas espécies e conseqüentemente à redução nas capturas, outras espécies têm sido incluídas na pesca tal como o *B. platynemum*. Embora não se tenha registros oficiais de sua captura, Petrere *et al.* (2004) apontam que a sobre-exploração e o declínio de *B. filamentosum* levou a sua inclusão no estoque pesqueiro, cuja captura tem aumentado desde 1990.

A pesar da importância atual da pesca dos bagres na região amazônica e de sua importância como espécies migradoras e predadoras, o conhecimento de aspectos biológicos, genéticos e populacionais, bem como sobre o estado atual da pesca desses bagres no eixo Solimões-Amazonas é ainda insuficiente (Batista, 2010). Diante do decréscimo dos desembarques pesqueiros, um aumento na conscientização geral sobre a necessidade de conservação da diversidade biológica tem surgido (Avisé e Hamrick, 1996). O futuro das populações selvagens depende grandemente da variabilidade genética das populações naturais (Ryman, 1991). O estudo dessa variabilidade é, assim, fundamental para o desenvolvimento de projetos de manejo sustentável. Desta forma, a informação da variabilidade genética dentro e entre populações são parâmetros essenciais nos estudos de biologia evolutiva e conservação. Altos níveis de variabilidade genética podem aumentar o potencial das populações em responder à seleção, acentuar a adaptação dentro de um habitat particular e também ampliar os limites de colonização e distribuição, possibilitando a sobrevivência em uma grande variedade de ambientes (Carvalho, 1993; Kalinowski, 2004). Além disso, as pesquisas em filogeografia e genética de populações podem elucidar várias questões relativas à estruturação de populações selvagens ou cultivadas de diversas espécies, tais como origem, sucesso reprodutivo, taxas de divergências genéticas, migração, tamanhos da população, seleção natural e eventos históricos (Sunnucks, 2000).

### **1.1 *Brachyplatystoma platynemum*, um bagre pouco conhecido**

*Brachyplatystoma platynemum*, conhecido como babão, xeréu e barba chata no Brasil possui uma ampla distribuição nas bacias do Amazonas e Orinoco, tendo sido descrito em países vizinhos, como a Colômbia, onde é conhecido como 'baboso' ou 'saliboro' e também acredita-se que ocorra no Peru, Venezuela, Bolívia e Equador (Barthem e Goulding, 1997) (Figura 1.1)

Após a revisão de Lundberg e Akama (2005), a classificação taxonômica de *B. platynemum* ficou assim estabelecida:

Ordem: Siluriformes,

Família: Pimelodidae

Tribo: Brachyplatystomatini,

Gênero: *Brachyplatystoma*

Espécie: *Brachyplatystoma platynemum*



**Figura 1.1** Fotografia de *Brachyplatystoma platynemum*, tomado de [amazonpredators.wordpress.com](http://amazonpredators.wordpress.com)

Apesar de ser uma espécie de baixo valor comercial no Brasil, a sobre-exploração de outras espécies do gênero tem levado ao incremento em sua captura. Além disso, em algumas áreas da região Amazônica, essa espécie já representa uma parte importante da pesca artesanal (ex.: Leticia, Colômbia, 10%) e tem sido identificada como espécie em perigo.

Dentro dos registros para esta espécie Barthem *et al.* (1991), reportam várias classes de tamanhos de babão capturados nas águas do estuário da Baía de Marajó, confirmando as observações de Goulding (1979, 1980) e Smith (1979).

Segundo Barthem e Goulding (1997), o padrão de migração da dourada, *B. rousseaxii*, é compartilhado com indivíduos de *B. platynemum*, os quais iniciam a migração 3 a 5 semanas depois da dourada. As primeiras observações de migração reprodutiva foram realizadas no rio Madeira, Amazônia central, devido a este ser um canal menor em comparação com o rio Amazonas, além de apresentar uma série de corredeiras aproximadamente a 800 km acima de Porto Velho onde os movimentos de peixes podem ser facilmente registrados em diferentes momentos do ano (Barthem e Goulding, 1997).

De forma geral, o processo de migração inicia quando indivíduos adultos e pré-adultos que habitam as águas perto do estuário, entre os meses de agosto e outubro, começam a viagem para a zona ocidental da bacia amazônica, percorrendo uma distância de até 5.500 km, viajando aproximadamente de 15 a 19 km por dia, constituindo, assim, a mais rápida migração de peixes de água doce na América do sul (Barthem e Goulding, 1997).

Os peixes levam de 4 a 5 meses para chegar aos tributários e alcançarem as cabeceiras dos rios, região onde desovam. Depois das desovas, as larvas são levadas passivamente pela corrente de volta ao canal principal do sistema fluvial Amazonas-Solimões, levando de 13 a 20 dias para chegar ao estuário, onde permaneceram por 2 ou 3 anos, tempo durante o qual os indivíduos alimentam-se e crescem. Após o período de crescimento, os peixes formam novos grupos para iniciar a migração até as cabeceiras e afluentes do sistema Amazonas-Solimões e completar o ciclo (Barthem e Goulding, 1997).

Um aspecto importante no ciclo de vida de espécies migratórias é a condição de *homing* avaliada principalmente em Salmonídeos (Sutterlin e Gray, 1973) e recentemente em bagres amazônicos (Batista e Alves-Gomez, 2006). Este comportamento implica no retorno às áreas de nascimento para a reprodução, maximizando o sucesso reprodutivo pela sincronia dos animais maduros às zonas de desova quando as condições são ótimas para o desenvolvimento de ovos e larvas, além de contribuir na regulação do número de indivíduos adultos que utilizam uma mesma área, evitando a sobre utilização dos habitat. O isolamento reprodutivo causado pelo comportamento de *homing*, também facilita a seleção de adaptações específicas ao habitat particular ocupado, gerando estruturação nas populações (Leggett, 1977).

Para os grandes bagres amazônicos foi sugerida uma tendência ao comportamento de *homing* em *B. rousseauxii* devido à redução de variabilidade genética nas populações no sentido da região de estuário à zona leste do sistema Amazonas-Solimões (Batista e Alves-Gomez, 2006). No entanto, ainda faltam informações relacionadas com as demais espécies que fazem parte da pesca artesanal e das quais se desconhece o estado atual das populações naturais.

## **1.2 A Filogeografia e estudos genéticos populacionais de peixes neotropicais**

A filogeografia é uma disciplina nova, relacionada com a distribuição espacial de linhagens, especialmente dentro e entre espécies relacionadas, baseada em componentes históricos e filogenéticos (Avice, 2009). Em outras palavras, tempo e espaço são conjuntamente considerados

como eixos da filogeografia, dentro dos quais são mapeados genealogias de interesse. Ela pode ser considerada como uma subdisciplina da biogeografia histórica, cujo objetivo principal é colocar dentro de um contexto temporal a tradicional perspectiva ecogeográfica que enfatiza o papel das pressões ecológicas na configuração da distribuição espacial das linhagens (traços) de organismos (Avise, 2000).

Esta disciplina aplicou, pela primeira vez, a análise de genealogias gênicas ao estudo da evolução das populações, permitindo obter conclusões a respeito das sequências de colonização, diversificação e extinção de linhagens gênicas em determinadas áreas. Além disso, o estudo comparado dos padrões filogeográficos de diversas espécies codistribuídas contribui na geração de hipóteses relacionadas com eventos de vicariância ou dispersão e auxiliam na identificação das possíveis causas geológicas, ecológicas ou etológicas que podem ter influenciado nesses padrões (Arbouh e Kenagy, 2001; Zink, 2002; Lanteri e Confalonieri, 2003).

Apesar da filogeografia ter sido usada comumente como uma ferramenta para esclarecer padrões históricos e evolutivos entre populações de uma espécie, as aproximações filogeográficas também podem ser úteis em conjunto com estudos genéticos populacionais, para inferir processos demográficos históricos como fluxo gênico, tamanho efetivo populacional, sequências de colonização, gargalhos de garrafa e também para determinar os limites entre espécies e identificar unidades de conservação (Avise *et al.*, 1987; Avise, 2000, 2009; Freeland, 2005; Vazquez-Dominguez, 2002, 2007). Desta forma, o estudo da distribuição geográfica de linhagens genealógicas tem sido amplamente usado para descrever eventos históricos, como fragmentação de habitats ou expansão da área de distribuição de espécies e populações, eventos de migração, vicariância ou extinção de linhagens gênicas, também como outros processos que afetam a estrutura das populações ou que geram especiação em um contexto espacial e temporal (Hardy *et al.*, 2002).

As pesquisas pioneiras mais importantes baseadas em mtDNA foram aquelas dirigidas a reconstruir as relações filogenéticas da espécie *Homo sapiens*, para testar a hipótese principal de sua origem e provar diferentes modelos de evolução para as populações humanas durante o pleistoceno (Ayala, 1995, Ayala *et al.*, 1994; Brown *et al.*, 1982; Cavalli-Sforza *et al.*, 1994; Li e Sadler, 1992; Nei, 1985). Um dos aportes mais importante destes estudos tem sido a hipótese de que os humanos descendem de uma única mulher a “Eva mitocondrial” que viveu na África entre 100,000 e 200,000

anos atrás. Dados moleculares favorecem esta teoria, mais existem evidências contra, fundamentadas em gargalos de garrafa das populações humanas antes do surgimento (Ayala, 1995). Estes estudos foram os pioneiros e tem colaborado para a utilização desta metodologia nos demais grupos animais.

No caso dos peixes, os estudos em filogeografia têm sido realizados em sua grande maioria nas regiões temperadas, no hemisfério norte, principalmente nos Estados Unidos e Europa (Beheregaray, 2008). Na região neotropical, apesar de possuir aproximadamente um quarto de todas as espécies do mundo, com até 8000 espécies de peixes (Schaefer, 1998), pouco é conhecido em relação aos padrões que determinaram a distribuição espacial e temporal das linhagens, e mesmo assim, até o momento não se tem clareza dos eventos históricos que tem dirigido a extraordinária diversificação existente na região neotropical (Montoya-Burgos, 2003). As hipóteses em relação aos padrões e processos que tem gerado tal diversificação diferem na ênfase de processos geológicos ou ecológicos. Os peixes de água doce não podem sobreviver fora de seu ambiente aquático devido a limitações morfológicas e fisiológicas, portanto poucas barreiras terrestres isolam populações dentro de suas drenagens (Vari, 1988). Estas propriedades os tornam organismos ideais para pesquisar o passado geológico e as modificações ambientais, devido ao fato de que sua dispersão esta intimamente ligada a eventos de capturas de cabeceira entre drenagens adjacentes, os quais refletem mudanças geomorfológicas e climáticas (Lundberg 1993; Bermingham e Martin 1998). Por esta razão, tanto no nível intra como interespecífico, a ictiofauna neotropical é reconhecida como um importante material para testar hipóteses de biogeografia histórica, contudo uma das razões para o escasso conhecimento da distribuição geográfica das espécies é o fato que muitos táxons não representam grupos naturais (Vari e Weitzman, 1990).

Atualmente a filogeografia é fundamentada na análise do DNA mitocondrial (mtDNA) em espécies animais. Há aproximadamente uma década, o DNA mitocondrial (mt) tem sido usado para compreender como os indivíduos de uma mesma espécie são genealogicamente ligados através de ancestrais comuns (Avice, 2000). Pesquisas genéticas realizadas em várias espécies, registraram padrões marcantes nos arranjos de linhagens de mtDNA (Brown e Wright, 1975; Wright *et al.*, 1983; Desmore *et al.*, 1989; Echelle *et al.*, 1989; Moritz, 1991, Moritz e Heideman, 1993).

Segundo Avise (2000), aproximadamente 70% dos estudos filogeográficos no século 20 envolveram análises de DNA mitocondrial devido a suas propriedades filogenéticas favoráveis como a transmissão materna, a extensa variação intraespecífica e a usual ausência de introns e recombinação genética intermolecular. Além disso, o DNA mitocondrial, dentre outros marcadores moleculares, como os microssatélites, são utilizados em estudos de genética populacional devido ao seu alto conteúdo informativo e acessibilidade, sendo os marcadores moleculares preferenciais na obtenção de informação essencial para conservação e manejo dos mais variados organismos.

### **1.3 Marcadores moleculares utilizados em análises filogeográficas e populacionais**

As espécies não são geneticamente homogêneas, mas estruturadas em grupos de indivíduos geneticamente mais semelhantes, estando o grau de isolamento diretamente relacionado à dispersão de indivíduos entre estes grupos (Balloux e Lugon-Moulin, 2002; Laikre *et al.*, 2005). Mecanismos que promovem o isolamento das populações incluem separação geográfica, capacidade de dispersão restrita dos indivíduos e comportamento de *homing* ou filopatria (tendência de retornar ao local de nascimento para reprodução) (Council, 1996). Uma troca limitada de indivíduos reprodutores entre os grupos resulta em uma diferenciação genética entre eles. O padrão de distribuição da variação genética dentro e entre populações é referido como “estrutura genética populacional” de uma espécie (Laikre *et al.*, 2005). A identificação desta estrutura e diversos outros parâmetros é possível mediante a utilização de técnicas morfológicas (Esguícero e Arcifa, *no prelo*) e moleculares (Thuesen *et al.*, 2008). Dentre as técnicas moleculares utilizadas nos estudos filogeográficos e de genética de populações, as mais utilizadas, recentemente, são as de sequenciamento de segmentos do DNA mitocondrial, como o D-loop (Thuesen *et al.*, 2008) e a técnica de microssatélites (Keeney *et al.*, 2005).

#### **1.3.1 DNA mitocondrial e região controle**

O DNA mitocondrial dos vertebrados é uma molécula circular com 16 a 20 quilobases, com 13 genes codificadores de proteínas, que representam 90% desse genoma, dois RNAs ribossômicos (12S e 16S rRNA), e 22 RNAs transportadores (tRNAs). Além desses 37 genes, há também uma região conhecida como “D-loop” (em vertebrados e equinodermos) por sua abreviatura em inglês de “displacement loop” ou região controle (Avise, 1986; Meyer, 1993). Essa região é responsável pela regulação da replicação e da transcrição de todo o mtDNA. Este segmento é o mais utilizado em estudos populacionais, possuindo em torno de 1.100 pares de bases (pb) em peixes localiza-se entre

as regiões codificadoras de dois RNAs transportadores (tRNA), o tRNA da prolina e o tRNA da fenilalanina. Estima-se que a sua taxa de evolução é de 2 a 5 vezes maior comparada aos demais genes mitocondriais codificadores de proteínas (Aquadro e Greenberg, 1983).

Introns, DNA repetitivos, pseudogenes, e mesmo sequências espaçadoras estão ausentes. A molécula de mtDNA não possui histonas associadas, característica que provavelmente favorece sua alta taxa de mutação e justifica seu uso em escala microevolutiva em comparação com os genes nucleares (Brown *et al.*, 1979; Wolfe *et al.*, 1987). Na maioria dos animais o mtDNA é herdado por via materna, todas as mitocôndrias são carregadas pelo gameta feminino, tendo sido detectado transmissão de mtDNA através do espermatozóide em poucas espécies (Anderson *et al.*, 1995).

Várias hipóteses tem surgido para explicar a rápida evolução do mtDNA em animais (Wilson *et al.*, 1985; Gillespie, 1986; Richter, 1992; Li, 1997; Nedbal e Flynn, 1998): relaxamento das limitações funcionais (porque o mtDNA não codifica proteínas implicadas em sua replicação e transcrição, e porque uma molécula que produz só 13 tipos de polipeptídeos pode tolerar menos precisão na tradução); uma alta taxa de mutação devido a ineficiência dos mecanismos reparadores e alta exposição a radicais livres mutagênicos no ambiente oxidativo da mitocôndria e finalmente o fato do mtDNA não possuir histonas associadas, que são evolutivamente conservadas e podem limitar as taxas de evolução nuclear. Todas estas possibilidades não são mutuamente excludentes. Outra característica importante é que as células somáticas típicas possuem centenas a milhares de mitocôndrias, cada uma com várias cópias de mtDNA. Geralmente existe um haplótipo mitocondrial dominante por cada indivíduo, característica denominada como homoplasmia, resultado provavelmente da fixação de mutações dentro de cada população intracelular de mtDNA por um processo análogo à deriva genética. Esta característica é fundamental nas análises filogeográficas onde as unidades de estudo são os indivíduos (Avise, 2000)

Apesar do extenso uso de filogenias baseadas no uso de mtDNA para a reconstrução de padrões filogeográficos (Avise, 2000), poucos estudos em filogeografia de peixes neotropicais tem sido realizados usando mtDNA. Neste contexto, destacam-se os trabalhos de: Hrbek e Larson (1999), Lovejoy e De Araujo (2000), Bermingham e Martin (1998), Martin e Bermingham (2000), Sivasundar *et al.* (2001) e Montoya-Burgos (2003). Para a bacia do rio Amazonas, uma das regiões mais diversas em relação a peixes de água doce, poucos estudos em filogeografia foram realizados,

destacando-se os trabalhos de Schmitt (2005) com *Hypopygus lepturus*; Batista e Alves-Gomez (2006) com *Brachyplatystoma rousseauxii*; Hubert *et al.* (2007), com o gênero *Serrasalmus*; Farias e Hrbek (2008) com *Symphysodon* e Rodriguez de Souza (2008) com o gênero *Fluviphylax*.

No que diz respeito a estudos relacionados com a variabilidade e estrutura genéticas em populações naturais de diferentes espécies de peixes amazônicos usando mtDNA, também, poucos trabalhos tem sido realizados, destacando-se os estudos de: Porto (1999) com *Mylesinus paraschomburgkii*; Machado (2009) com *Prochilodus nigricans*; Santos *et al.* (2007) com *Colossoma macropomum*; Batalha (2009) com *Semaprochilodus insignis*; Terêncio (2009) com *Nannostomus eques*; Galetti (2009) com *Plagioscion squamosissimus*; Formiga-Aquino (2004), Rodrigues *et al.*, 2009) com *Brachyplatystoma vaillantii* e Huergo (2009) com *Brachyplatystoma filamentosum* e *B. capapretum*.

### 1.3.2 Citocromo *b* (cytb)

O citocromo *b* é a subunidade catalítica central da ubiquinol citocromo *c* reductase, uma enzima que está presente na cadeia respiratória da mitocôndria e na cadeia respiratória do ciclo foto-redox de muitas bactérias (Meyer, 1994), todos os organismos eucariotos necessitam desta classe de enzima redox, e conseqüentemente do citocromo *b* para a conversão de energia (Farias *et al.*, 2001).

O gene citocromo *b* é considerado um excelente marcador, amplamente usado como ferramenta em filogenias moleculares e é provavelmente o gene mitocondrial melhor conhecido em relação à estrutura e função de seu produto protéico (Esposti *et al.*, 1993). Seu uso se justifica pela presença de regiões conservadas e variáveis, as quais contem sinais que podem ser utilizados em análises filogenéticas em diferentes níveis taxonômicos. No entanto, muitos problemas têm sido identificados no uso do gene citocromo *b* em análises filogenéticas, dentre os quais está a composição de bases, a taxa de variação entre linhagens, a saturação na terceira base do códon e a limitada variação nas primeiras e segundas bases do códon, resultando em pouca informação para problemas evolutivos, e poucos sítios informativos na terceira posição do códon no nível populacional (Meyer, 1994). No entanto, um grande número de trabalhos com animais tem usado o DNA mitocondrial para avaliar populações ou relações em baixos níveis taxonômicos (Meyer, 1993; Rocha-Olivares *et al.*, 1999; Lovejoy e de Araújo, 2000; Tsigenopoulos e Berrebi, 2000).

Porém, poucos trabalhos filogeográficos têm usado este marcador em peixes neotropicais, não obstante se tem observado padrões importantes no nível biogeográfico através das análises de genealogias intraespecíficas para algumas espécies (Lovejoy e De Araujo, 2000).

### 1.3.3 Marcadores Microsatélites

Os microsatélites (SSR – “*simple sequence repeat*”) são sequências curtas de DNA, com um a seis pares de bases repetidas em cadeia. A maioria dos microsatélites (30-67%) são dinucleotídeos e geralmente encontram-se em regiões não codificantes do genoma (Metzgar *et al.*, 2000). Suas principais características como marcador molecular são sua alta taxa de mutação e variabilidade em espécies e populações. A taxa de mutação para os microsatélites é estimada em  $10^{-2}$ - $10^{-6}$  por locus por geração (Ellegren, 2000). Atualmente os modelos evolutivos de deslizamento da DNA polimerase (*slippage*) e *crossing-over* desigual têm sido sugeridos para explicar a evolução dos microsatélites, destes o *slippage* representa o mecanismo mutacional predominante (Schlotterer e Tautz, 1992). No entanto, este mecanismo gera altos níveis de homoplasia, que podem violar as assertivas básicas nas análises de marcadores genéticos, nos quais as variações de fenótipos similares são assumidas como derivadas de um ancestral comum (Sanderson e Hufford, 1996).

Assume-se que os microsatélites são marcadores de seletividade neutra, permitindo que alguns modelos de evolução sejam aplicáveis. Três modelos são discutidos, o modelo mutacional *stepwise* (SMM) assume que a mutação em um determinado alelo pode dar-se pelo ganho ou perda de uma unidade de repetição de cada vez (Kimura e Otha, 1978; Bell e Jurka, 1997), o índice  $R_{ST}$  de diferenciação genética é baseado nesse modelo. O modelo IAM (*infinite allele model*), ou modelo de alelos infinitos, considera que mutações nas sequências de microsatélites resultam em perda ou ganho de uma ou mais unidades de repetição, de forma que cada mutação resulta em um novo alelo de forma aleatória (Kimura e Crow, 1964), as estatísticas F (Wright, 1931) são baseadas nesse modelo. Finalmente, o modelo de TPM (*two phase model*), ou modelo de duas fases, baseado na teoria de coalescência, assume diferentes processos mutacionais e a história demográfica na estimativa da variância do número de repetições de um microsatélite.

As unidades repetitivas que caracterizam os microsatélites variam entre cinco a 40 repetições. Estes podem ser classificados em relação ao motivo de repetição como perfeitos, quando a sequência de DNA repetida não é interrompida por qualquer outra base nucleotídica que não

pertença ao motivo de repetição, imperfeitos, quando possuem bases que não correspondem ao motivo de repetição da sequência de DNA do microsatélite, compostos, quando são formados por dois ou mais tipos de repetições distintas e adjacentes, e finalmente como interrompidos, se ocorre uma inserção de um pequeno número de bases que não encaixam na estrutura repetitiva do microsatélite (Weber, 1990; Goldstein e Schlotterer, 1999). No genoma de vertebrados os microsatélites do tipo dinucleotídeo são os mais abundantes, sendo o motivo (AC)<sub>n</sub> duas a três vezes mais frequentes que o motivo (AT)<sub>n</sub>, o segundo tipo mais comum de dinucleotídeo (Toth *et al.*, 2000).

Os microsatélites têm sido considerados marcadores adequados em estudos de variabilidade genética aplicados à pesca e piscicultura por serem altamente polimórficos; serem marcadores codominantes, ou seja, ambos os alelos de um indivíduo heterozigoto podem ser visualizados e detectados; podem ser amplificados por PCR (*polymerase chain reaction*), onde são necessárias pequenas quantidades de DNA inicial (Wright e Bentzen, 1994); além de poderem ser utilizados em estudos de diferentes espécies, ainda que sejam de natureza espécie-específica (Batista, 2010). Apesar das vantagens apresentadas, este tipo de marcador apresenta também algumas desvantagens como: a demanda de tempo e complexidade metodológica necessárias para o desenvolvimento prévio dos marcadores microsatélites (localização e desenho de *primers* específicos); o alto custo para a síntese de *primers* específicos; o modelo de evolução não ser totalmente esclarecido; e a possível presença de homoplasia e a possibilidade de ocorrência de alelos nulos e *stutters* (bandas fantasma) (McCouch *et al.*, 1997; Ferreira e Grattapaglia, 1998; Selkoe e Toonen, 2006). Porém, os marcadores microsatélites tem sido amplamente utilizados em estudos populacionais, obtendo informações importantes para o manejo e conservação de populações naturais sob processos de sobre-exploração (Batista, 2010).

Estudos extensivos, utilizando microsatélites foram realizados para algumas espécies de peixes da ordem Siluriformes. Pereira *et al.* (2009), estudaram populações de pintado, *Pseudoplatystoma corruscans*, da bacia do Prata encontrando padrões de alta estruturação genética. Para espécies como *Pimelodella chagresi* (Moeser e Bermingham, 2005) foram caracterizados oito loci microsatélites contribuindo na identificação de uma espécie críptica dentro do clado de *P. chagresi*; para o bagre do Mekong (*Pangasiandon gigas*) (Ngamsiri *et al.*, 2006) análises de microsatélites foram usados para avaliar o estado de divergência genética desta espécie no rio Menkong, registrando que a população desta espécie se encontra altamente ameaçada; para o jau

(*Zungaro jahu*) foram caracterizados oito loci microssatélites, com o objetivo de estabelecer medidas de conservação para a espécie (Carrillo-Avila *et al.*, 2009), finalmente para a piramutaba (*Brachyplatystoma vaillanti*) foram caracterizados loci microssatélites para determinar o estado das populações, baseados na premissa da depleção do estoque na bacia amazônica (Rodrigues *et al.*, 2009)

Neste contexto, a utilização de marcadores mitocondriais e microssatélites constituem uma fonte importante de informação para testar hipóteses sobre a estruturação genética de populações naturais. Considerando a necessidade de levantamentos de dados sobre a composição e estruturação genética de espécies de grandes bagres amazônicos, principalmente das espécies pouco estudadas como *Brachyplatystoma platynemum* (babão), o presente trabalho realizou uma análise filogeográfica desta espécie na bacia amazônica, utilizando sequências da região controle D-loop e do gene citocromo *b* do DNA mitocondrial, além de uma análise exploratória da estrutura genética desta espécie com marcadores microssatélites, ambos como ferramenta para testar hipóteses de estruturação populacional e comportamento de *homing*.

## 2. Objetivo Geral

Avaliar a variabilidade genética de *Brachyplatystoma platynemum* e sua relação com a distribuição geográfica através de marcadores moleculares (mitocondriais e microssatélites) visando testar as hipóteses de existência de estruturação populacional e comportamento de *homing*.

### 2.1 Objetivos específicos

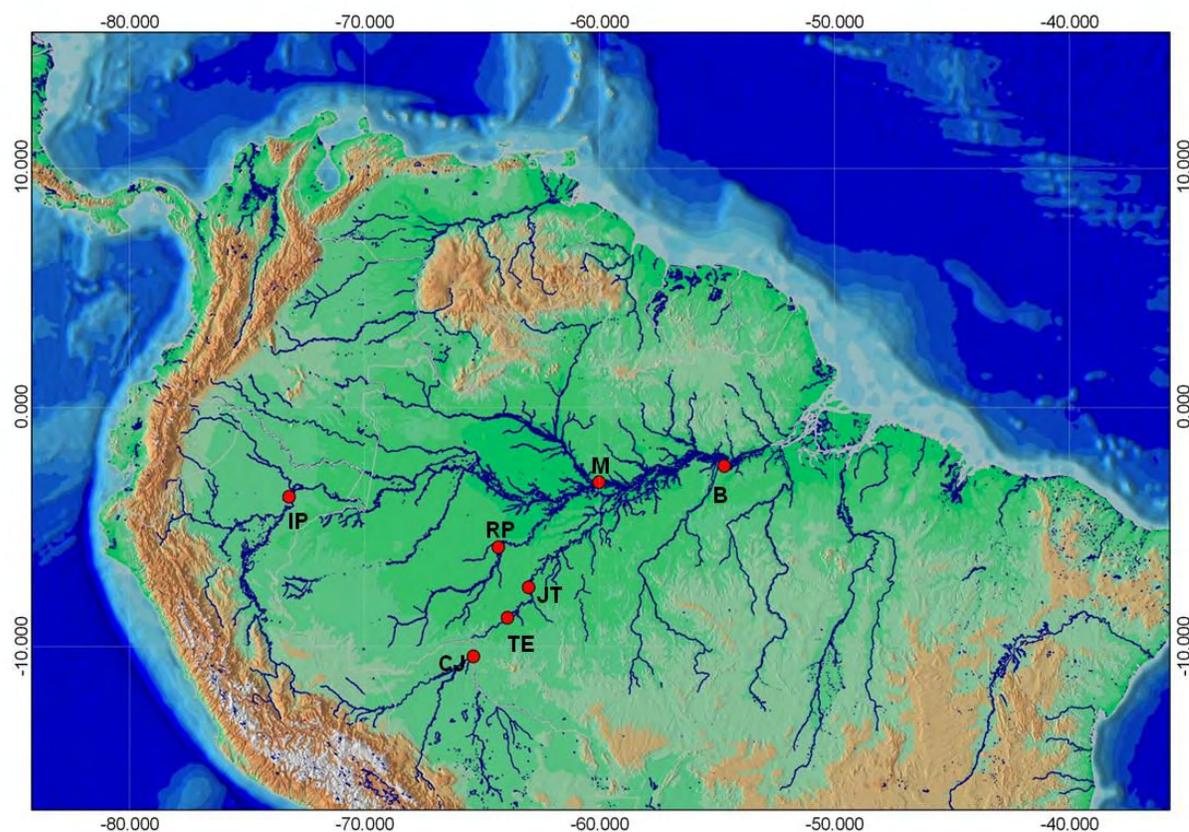
- Estimar as frequências de haplótipos das populações locais, pela análise de sequências da região controle (D-loop) e do gene citocromo *b* do DNA mitocondrial.
- Estimar as frequências gênicas das populações locais, pela análise de locus microssatélites.
- Comparar geneticamente as populações de bagres para checar a existência de estruturação populacional e comportamento de *homing*.
- Propor medidas de conservação genética para que as populações possam manter, tanto quanto possível, suas frequências gênicas estáveis, considerando os impactos sofridos pela ação antrópica.

### 3. Materiais e métodos

#### 3.1 Área de estudo

As amostras de *Brachyplatystoma platynemum* foram coletadas em sete localidades da Amazônia brasileira e peruana, que compreendem três pontos na calha principal do rio Amazonas (Iquitos, Manaus e Belém), além de dois tributários de sua margem direita (rio Madeira e o rio Purus) (Figura 3.1).

As amostras foram obtidas em colaboração com o Laboratório Temático de Biologia Molecular (LTBM) do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), dentro do projeto “PIRADA” (Genética, manejo e conservação dos grandes bagres migradores na Amazônia); a Universidade Estadual de Rondônia e a empresa Santo Antonio Energia S/A, este último, principalmente na coleta das amostras do rio Madeira, as quais foram obtidas em três pontos correspondentes à montante, jusante e cachoeira de Teotônio (Figura 3.1). Foram retiradas amostras de tecido muscular, nadadeira e barbilhão dos espécimes coletados, os quais foram preservados em etanol 96% para seu posterior processamento no laboratório de Biologia e Genética de Peixes da Universidade Estadual Paulista.



**Figura 3.1** Localização dos pontos de coleta das amostras de *Brachyplatystoma platynemum*. IP=Iquitos, Perú; RP=Rio Purus, AM; CJ=Montante da cachoeira, Rio Madeira, AM; TE=Cachoeira de Teotônio, rio Madeira, AM; JT=Jusante da cachoeira, rio Madeira, AM; M=Manaus, AM; B=Belém, PA.

**Tabela 3.1** Localidades de coleta de *Brachyplatystoma platynemum* na Amazônia brasileira e peruana

Localidade	Sigla	Bacia	N	N <sub>RC</sub>	N <sub>Cytb</sub>	N <sub>SSR</sub>
Iquitos	IP	Amazonas	30	27	27	30
Manaus	M	Amazonas	32	32	22	30
Rio Purus	RP	Purus	38	31	30	38
Montante da	CJ	Madeira	22	22	8	20

Localidade	Sigla	Bacia	N	N <sub>RC</sub>	N <sub>Cytb</sub>	N <sub>SSR</sub>
Cachoeira						
Cachoeira	TE	Madeira	40	35	24	33
Jusante a Cachoeira	JT	Madeira	34	34	12	18
Belém	B	Amazonas	35	35	17	0

### 3.2 Região controle e citocromo *b* (DNA mitocondrial)

#### 3.2.1 Amplificação e sequenciamento do DNA mitocondrial

O DNA total foi extraído de amostras de tecido muscular, nadadeira e barbilhão usando o método de extração salina descrito por Aljanabi e Martinez (1997) ou pelo método de fenol-clorofórmio descrito por Sambrook *et al.* (1989). O DNA extraído foi diluído em água ultrapura autoclavada. A avaliação quantitativa e qualitativa do DNA foi realizada em espectrofotômetro.

Posteriormente foi realizada a amplificação por PCR da região controle (D-loop) e do gene citocromo *b* utilizando termocicladores modelo Veriti96, Applied Biosystems, utilizando os *primers* descritos na Tabela 3.2.

**Tabela 3.2** *Primers* utilizados na amplificação da região controle (D-loop) e do gene citocromo *b*

Gene	<i>Primers</i>	Referência
Região controle	F-TTF:5'-GCCTAAGAGCATCGGTCTTGTA-3' R:3'TGGTAGCATGCGGGAAGAATGTCA5'	Sivasundar <i>et al.</i> (2000)
Citocromo <i>b</i>	NovoF:5'-GACTTGAAAAACCAAYCGTTGT-3' O8R2:3'GCTTTGGGAGTTAGDGGTGGGAGTTA-5'	Dados não publicados

A amplificação do fragmento de DNA da região controle e do gene citocromo *b* foi realizada em um volume final de 12,5 µl contendo 7,25 µl de H<sub>2</sub>O ultrapura, 1,25 µl de tampão 10X, 0,65 µl de MgCl<sub>2</sub> (50mM), 1,25 µl de dNTP (2mM), 0,5 µl de cada *primer* (10mM para região controle e 5mM para o gene citocromo *b*), 0,1 µl de Taq DNA polimerase e 1 µl de DNA genômico (10-40 ng/ µl). As condições de termociclagem para a região controle foi estabelecido por Batista e Alves-Gomez (2006) para *B. rousseauxii* consistindo em 30 ciclos, sendo os primeiros cinco ciclos com temperatura de desnaturação inicial de 94°C por 1 min, seguidos por 1,5 min a 53°C para anelamento dos *primers* e 1,5 min a 72°C para a extensão; os 25 ciclos restantes foram realizados com uma temperatura de 54°C de anelamento mantendo-se os demais parâmetros. Para o gene citocromo *b* foi utilizado as seguintes condições de termociclagem, 94°C por 1 min de desnaturação inicial, seguido de 30 ciclos à 94°C por 1 min de desnaturação, temperatura de anelamento de 50°C por 1 min, extensão à 72°C por 1,5 min, além de uma extensão final de 72°C por 10 min.

A verificação do produto de PCR foi realizada em géis de agarose à 1%. Posteriormente foi realizada a purificação do produto de PCR usando o *kit* Exosap I (USB Corporation), seguindo as recomendações do fabricante. Desta reação foi utilizado 1 µl da solução para a realização da reação de sequenciamento (Sanger *et al.*, 1977), seguindo o protocolo do *kit* de sequenciamento *DYEEamic ET dye terminator* (Applied Biosystems). A reação foi realizada em um volume final de 10 µl, utilizando entre 30-40 ng/µl do material amplificado e limpo para cada um dos dois *primers* (F ou R). O produto da reação de sequenciamento foi purificado utilizando-se EDTA (0,5Mm) como agente quelante para a eliminação dos *primers*, dNTPs e ddNTPs não incorporados durante a amplificação de sequenciamento e acetato de sódio como agente protetor do produto amplificado, o protocolo utilizado foi o recomendado e constante do manual do *kit* de sequenciamento *DYEEamic ET dye terminator* (Applied Biosystems). A leitura dos fragmentos de DNA sequenciados foi realizada em um sequenciador automático, modelo ABI 3130 (APPLIED BIOSYSTEMS).

### **3.2.2 Análise das sequências nucleotídicas da Região Controle e do gene citocromo *b***

Foram obtidas duas matrizes de sequências nucleotídicas, uma composta de 216 indivíduos para a região controle e a segunda com 140 sequências para o gene citocromo *b*. O tamanho final dos fragmentos após a edição e alinhamento no programa *Clustal W* (Thompson *et al.*, 1994), incluso no programa BIOEDIT 7.0.5 (Hall, 1999) foi de 663 pb e 1040 pb, respectivamente.

Para cada uma das matrizes foram calculados os seguintes índices de diversidade molecular: número de haplótipos (H), número de haplótipos únicos (HU), número total de mutações (ETA), número de sítios polimórficos (S), média das diferenças nucleotídicas par a par (K), diversidade nucleotídica (Pi; indica o número médio de diferenças nucleotídicas por sítio entre duas sequências de DNA (Li e Graur, 1991), através dos programas ALEQUIN 3.11 (Excoffier *et al.*, 2005) e DNAsp 5.10 (Librado e Rozas, 2009).

Testes de neutralidade seletiva D de Tajima (Tajima, 1989) e  $F_s$  de Fu (Fu, 1997) foram realizados no programa ALEQUIN 3.11 (Excoffier *et al.*, 2005) para determinar se as amostras das diferentes localidades estão em equilíbrio com relação ao DNA mitocondrial, considerando que um desvio significativo do equilíbrio no mtDNA corresponde provavelmente a um resultado de recente expansão populacional ou gargalo, no caso em que nenhuma vantagem seletiva exista entre os haplótipos (Rand, *et al.* 1998). Informações adicionais sobre o tamanho das populações no passado e do presente foram derivadas da análise de Mismatch (Roger e Harpending, 1992). O parâmetro de expansão demográfica tau ( $\tau$ ), foi estimado no programa Arlequin e usado para calcular o tempo de expansão (t) usando a fórmula  $\tau=2ut$ , onde  $u=\mu k$ , onde  $\mu$  é a taxa de mutação por sítio por ano e K é a longitude da sequência (Pickles, 2011). A taxa de mutação usada para foi de  $3,6\pm 0,46\%$  (Donaldson e Wilson, 1999) por milhão de anos para a região controle e de 1,5% (Zardoya e Doadrio, 1999) para o gene citocromo *b*.

Para testar a hipótese nula de panmixia entre os grupos naturais de *Brachyplatystoma platynemum* foi realizada uma Análise de Variância Molecular (AMOVA) (Excoffier *et al.*, 1992) para verificar a existência de populações geneticamente diferenciadas entre os pontos de coleta da calha do rio Amazonas e seus tributários. Foi construída uma matriz de distância genética baseada nos valores de comparação par a par de  $\Phi_{ST}$  (Weir e Cockerman, 1984) modificação do  $F$  (Wright, 1969), com os valores par a par de distância geográfica para verificar se existe associação entre estas duas variáveis, a qual foi estimada pelo teste de Mantel (Mantel, 1967) implementado no programa GENEPOP 4.0 (Raymond e Rousset, 1995). O número de migrantes por geração ( $Nm$ ), como fonte de informação do fluxo gênico entre as localidades amostradas, foi estimado de forma linear a partir dos valores de  $F_{ST}$  com auxílio do programa ARLEQUIN 3.11 (Excoffier *et al.*, 2005) onde  $Nm = Y = (1 - F_{ST}) / (2F_{ST})$ . Para a AMOVA e o Teste de Mantel foram simuladas 16.000 permutações. A correção de Bonferroni (Rice, 1989) foi utilizada para todas as comparações múltiplas, como a razão entre o valor de  $P=0,05$  e o número de combinações.

Adicionalmente foi construída uma rede de haplótipos no programa NETWORK 4.6 (Polzin e Vahdati, 2004). Para determinar a relação entre os haplótipos e o tempo de divergência entre os filogrupos foi realizada uma Análise Bayesiana Coalescente no programa BEAST 1.5.3 (Drumond e Rambaut, 2007) usando o modelo de relógio molecular relaxado (Drumond *et al.*, 2006). Para calibrar o tempo de divergência foi usada uma taxa molecular baseada em estimativas publicadas de divergência da região controle e o gene citocromo *b* em peixes de  $3,6\pm 0,46$  (Donaldson e Wilson, 1999) e 1,5% (Zardoya e Doadrio, 1999) por milhão de anos respectivamente.

### 3.3 Marcadores microssatélites

#### 3.3.1 Amplificação e genotipagem dos microssatélites

Foi realizada a amplificação heteróloga utilizando-se os marcadores microssatélites desenvolvidos por Batista *et al.* (2010) para a espécie *Brachyplatystoma rousseauxii*. Foram amplificados 14 *loci*, dos quais foram selecionados sete que apresentaram polimorfismo e padrão claro no processo de genotipagem. A Tabela 3.3 sumariza as principais características dos *loci* utilizados.

**Tabela 3.3** Características dos *loci* microssatélites desenvolvidos por Batista *et al.* (2010) e utilizados no presente estudo.

Locos SSR	Motivo de Repetição	Primers	Ta (°C)	Tamanho (pb)
BR43	(AC) <sub>25</sub>	F: <sup>FAM</sup> CCCAGAAAAGAATCCAGCAG R:CGCCAAATGAACAACACC	62	143-161
BR49	(TC) <sub>17</sub>	F: <sup>HEX</sup> GAGTGGTTTGACTCTCCAGAC R:GGACTGCATAGGTTGTTGTC	60	306-321
BR51	(AC) <sub>18</sub>	F: <sup>NED</sup> GTTACACATGGTCGCTGGTG R:GTTCAATTCTCTTCGGCTTCG	60	296-304
BR53	(AC) <sub>15</sub>	F: <sup>HEX</sup> TTTATGAGTGTGTTATCCGGCA R:TGAGAGTGCTGTTCACTTCCA	60	159-169
BR61	(TG) <sub>23</sub>	F: <sup>FAM</sup> CTGTGCGAAAACATGAGGCAG	65	261-271

Locos SSR	Motivo de Repetição	Primers	Ta (°C)	Tamanho (pb)
		R:GACATCAGAGCGAAGCACAC		
BR70	(GA) <sub>8</sub> A(AG) <sub>8</sub>	F: <sup>FAM</sup> ACTGGGTCCGGTGTCTATAAA R:AACGTGCAGTCATGGTGTAGC	60	207-215

Uma cauda M13 foi adicionada na extremidade 5' de cada *primer forward* dos sete *loci* microssatélites selecionados para análise, para permitir a marcação com fluorescência de acordo com o protocolo descrito por Schuelke (2000).

Os *loci* microssatélites foram amplificados conforme descrito por Batista (2009). Cada reação foi feita em um volume final de 10 µl, contendo: 2µl de DNA genômico (10-50ng/µl), 1,0 µl de tampão 10x (10mM tris-HCl, 50mM KCl, pH 8.4), 0,5µl de *primer* F (5µM), 1,0µl de *primer* R (5µM) e 0,5µl de *primer* M13 marcado com a fluorescência FAM, HEX ou NED), 0,8µM do *primer* reverso, 2,1µl de dNTPs (1mM), 0,30 µl de MgCl<sub>2</sub> (50mM), e 0,21µl de Taq DNA polimerase 1U/ µl.

A amplificação dos *loci* foi realizada com as seguintes condições de termociclagem: desnaturação inicial à 92°C por 1min, seguidos de 25 ciclos a 94°C por 20 seg; 60-62°C por 40seg; 68°C por 35seg, seguido do anelamento do *primer* com fluorescência com 20 ciclos a 93°C por 20 seg; 53°C por 30 seg e uma extensão para este ciclo a 72°C por 35seg. A extensão final para todo o processo de amplificação foi de 72°C por 30 min.

Os produtos amplificados foram verificados em géis de agarose (1,5%). De acordo com a intensidade das bandas dos produtos amplificados foram feitas diluições entre 1:10 a 1:40. 1 µl da diluição foi utilizada para a genotipagem junto com uma solução contendo 7,93 µl de *Tween* 20 (0,1%) e 0,07 µl do padrão de tamanho de alelos (ET 500) completando um volume final de 10 µl.

Foram desenvolvidos dois sistemas multiplex para a genotipagem das amostras a partir da combinação de três fluorescências (FAM, HEX e NED) e do tamanho dos alelos de cada *locus* (Tabela 3.4). Estes sistemas permitiram a análise de três locos em cada poço para cada amostra de DNA.

**Tabela 3.4** Multiplex de genotipagem para os *loci* analisados

<b>Multiplex</b>	<b>Locos</b>	<b>Tamanho (pb)</b>	<b>Fluorescência</b>
<b>Multiplex 1</b>	BR43	143-161	FAM
	BR53	159-169	HEX
	BR70	207-215	FAM
<b>Multiplex 2</b>	BR49	306-321	HEX
	BR51	296-304	NED
	BR61	261-271	FAM

### 3.3.2 Estimativa do tamanho dos alelos e análises dos genótipos

Os genótipos foram checados e no programa GeneMapper *IDS*Software versão 4.0 (Applied Biosystem) usando o padrão de genotipagem ET-500. Após a genotipagem, foi construída uma matriz para os seis *loci* estudados. O programa GENEALEX 6.1 (Peakall e Smouse, 2006) foi utilizado na conversão dos diferentes arquivos de entrada, utilizados nos diferentes programas e análises descritas a seguir.

Foram calculados diferentes índices de diversidade gênica como: número total de alelos (Na), número de alelos privados (Np) e desequilíbrio de ligação com o programa POPGENE 1.32 (Yeh e Boyle, 1997); heterozigosidade observada ( $H_o$ ) e esperada ( $H_e$ ), riqueza alélica, índice de fixação  $F_{IS}$  (Wright 1951), teste exato de desequilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE) e número de migrantes (Nm) com o programa ARLEQUIN 3.11 (Excoffier *et al.*, 2005). Para inferir a causa mais provável dos desvios do HWE foi utilizado o software MICROCHECKER 2.2.1 (van Oosterhout *et al.*, 2004) para a estimativa de alelos nulos segundo a equação 1 de Brookfield (1996). As análises realizadas no MICROCHECKER podem indicar também a presença de *stutters* (Schlotterer e Tautz, 1992; Hauge e Lit, 1993), *dropout*, alelos menores amplificados em maior frequência em relação aos alelos de maior tamanho, explicados pela amplificação preferencial destes (Banks *et al.*, 1999) e alelos nulos, resultantes da não amplificação de alguns alelos devido à substituições, inserções ou deleções no sítio de anelamento dos *primers* (Callen *et al.*, 1993).

Posteriormente foi realizada uma análise de variância molecular (AMOVA) (Michalakis e Excoffier, 1996) usando o programa ARLEQUIN 3.11 (Excoffier *et al.*, 2005) para verificar o grau de diferenciação genética a partir dos valores de  $\Phi_{ST}$  e  $R_{ST}$  (Slatkin, 1995), os quais assumem modelos mutacionais diferentes (Modelo de alelos infinitos, IAM e Stepwise Mutation Model, SMM, respectivamente). Para estas análises foi assumido o nível de dados estranhos de 1, o qual significa que todos os sítios são considerados na análise. Os níveis de significância para os testes de HWE,  $\Phi_{ST}$  e  $R_{ST}$  foram ajustados usando as correções de Bonferroni ( $P=0,05/\text{número de combinações}$ ) (Rice, 1989).

A estimativa do número possível de populações (K) foi realizada no programa STRUCTURE 2.3.1 (Pritchard *et al.*, 2000) através de uma análise bayesiana. Foi utilizado o modelo de mistura (*admixture model*), que assume que cada indivíduo pode ter ancestrais oriundos de mais de uma população, e frequência alélicas correlacionadas, favorecendo a melhor identificação de populações subestruturadas (Falush *et al.*, 2003). Foram realizadas 10 corridas (réplicas) independentes para cada valor de K (K=1 a 8). Todas as corridas consistiram de um valor de corte (*burnin*) de 100.000 permutações, seguidas por 500.000 MCMC (simulações de cadeias de Monte Carlo). A partir dos dados obtidos foi estimado o número de populações K esperadas e o valor de K máximo estimado pelo modelo *log-likelihood* ( $\log(P(X/K))$ ) (Falush *et al.*, 2003) e pelo método proposto por Evanno *et al.* (2005).

## 4. Resultados

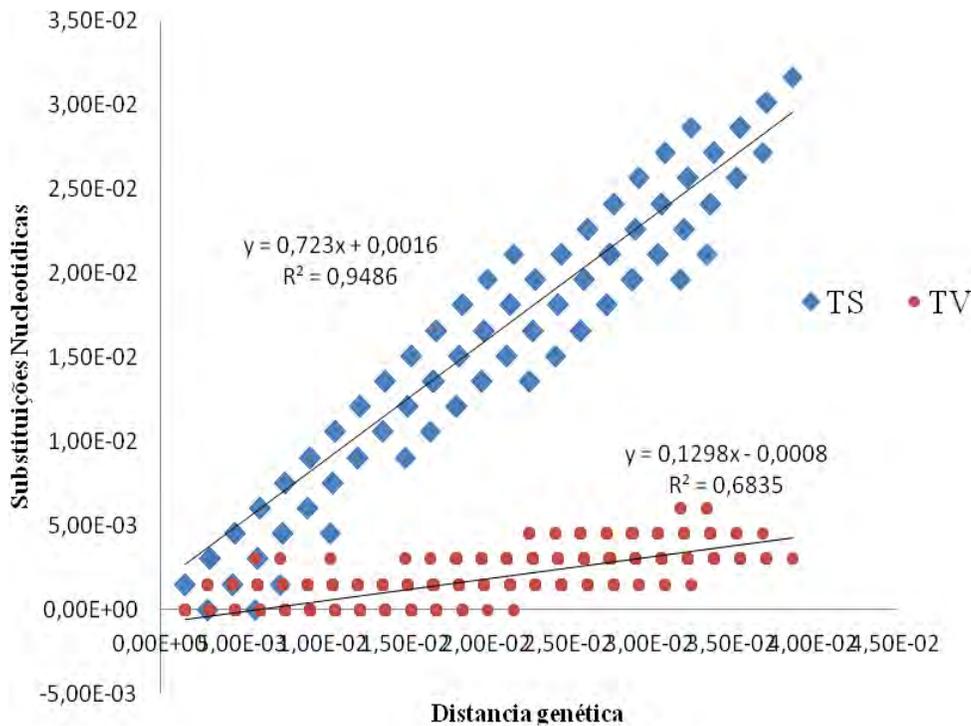
### 4.1 DNA mitocondrial

#### 4.1.1 Região Controle

- **Análise da diversidade molecular e genética de *Brachyplatystoma platynemum***

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

Foi observado um total de 66 haplótipos registrando uma diversidade haplotípica total  $Hd=0,931\pm 0,00010$  para os 216 indivíduos analisados. Em relação aos sítios, 618 foram invariáveis, 45 sítios foram polimórficos e 37 sítios foram informativos para parcimônia. Um total de 48 mutações foram registradas com valor médio para as transições de  $25\pm 3,266$  e para as transversões de  $1\pm 1,574$  entre as localidades amostradas, não foi observada saturação entre as substituições nucleotídicas com a distancia genética (Figura 4.1).



**Figura 4.1** Gráfico de substituições nucleotídicas versus a distância genética (Kimura-2-parâmetros) para a região controle de *Brachyplatystoma platynemum*.

O número total de haplótipos entre as localidades variou de  $H=11$  (Montante da Cachoeira, CJ) a  $H=18$  (Iquitos, IP), com frequências absolutas para cada haplótipo de um a 21 ( $H_{51}$ ).

Do total de haplótipos registrados, 47 correspondem a haplótipos únicos distribuídos diferencialmente entre todas as localidades e 19 foram haplótipos compartilhados. Os valores de diversidade haplotípica variaram entre  $H_d=0,6353$  a  $H_d=0,9153$ , registrada para a localidade de Manaus. O maior número de haplótipos únicos foi registrado na calha principal do sistema Amazonas-Solimões para a localidade de Iquitos ( $H_U=13$ ,  $N=27$ ), a qual também apresentou os maiores números de sítios polimórficos ( $S=30$ ) e de total de mutações ( $ETA=31$ ). Dos tributários amostrados, as localidades do rio Madeira apresentaram os menores valores de diversidade haplotípica ( $H_d= 0,6353$ ) e de haplótipos únicos ( $CJ=3$ ,  $TE=4$ ,  $JT=4$ ) representando em conjunto cerca do 22,92% dos haplótipos únicos observados. Para o rio Purus ( $N=31$ ) foi registrado um número total de haplótipos  $H=14$ , com um porcentual de haplótipos únicos de 17,02% ( $H_U=8$ ). Para esta localidade a diversidade haplotípica foi de  $H_d=0,892$ , com 17 sítios polimórficos e número total de mutações de  $ETA=17$ .

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

**Tabela 4.1** Polimorfismos de DNA da região controle (D-loop) para os indivíduos de *Brachyplatystoma platynemum* para as localidades amostradas. N= número amostral; H=número de haplótipos; HU= haplótipos únicos; S= sítios polimórficos; ETA= número de mutações; HD= diversidade haplotípica; PI= diversidade nucleotídica

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

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

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

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

Inicialmente foi realizada uma análise entre as sete localidades, como um único grupo hierárquico, visando determinar os níveis de diferenciação genética entre todas as localidades amostradas. Os resultados obtidos indicam que existe uma diferenciação intermediária, segundo Wright (1978) com valor para  $\Phi_{ST} = 0,09775$ , com maior variabilidade genética dentro (90,23%) que entre as localidades (9,77%) (Tabela 4.2).

**Tabela 4.2** Análise de variância para as sete localidades amostradas de *Brachyplatystoma platynemum*

Fonte da variação	Grau de Liberdade	Soma dos quadrados	Componentes de variação	Porcentagem de variação
Entre localidades	6	11.071	0,04615 Va	9,77
Dentro das localidades	209	89,035	0,42601 Vb	90,23
Total	215	100,106	0,47216	
Índice de Fixação $\Phi_{ST} = 0,09775$				

Dado que se têm amostras da calha do rio Amazonas e de dois afluentes da sua margem direita, foram feitas análises de variância realizando diferentes agrupamentos entre as localidades amostradas. O primeiro agrupamento foi realizado para dois grupos, o primeiro formado pelas localidades da calha e o segundo grupo pelos tributários que correspondem aos rios Purus e Madeira. Os resultados obtidos para este agrupamento mostram uma mudança na porcentagem de variação em relação à análise anterior, indicando uma porcentagem de variação entre as localidades de 5,91% (Tabela 4.3).

**Tabela 4.3** Análise de variância molecular para os dois grupos formados. Calha e tributários na área de estudo.

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

Total	215	100,106	0,48431
Índices de Fixação			
$\Phi_{SC}=0,06514$			
$\Phi_{ST}=0,12038$			
$\Phi_{CT}=0,05909$			

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

**Tabela 4.4** Análise de variância molecular para três grupos conformados pelas localidades amostradas no rio Madeira (CJ, TE e JT), e as localidades da calha (IP, B, M) e o rio Purus (RP).

Fonte da variação	Grau de Liberdade	Soma dos quadrados	Componentes de variação	Porcentagem de variação
Entre localidades	2	8,156	0,05050 Va	10,38
Entre localidades dentro dos grupos	4	2,915	0,00994 Vb	2,04
Dentro das localidades	209	89,035	0,42601 Vc	87,58
Total	215	100,106	0,48644	
Índices de Fixação				
$\Phi_{SC}=0,02281$				
$\Phi_{ST}=0,12424$				
$\Phi_{CT}=0,10381$				

Estes resultados mostram que existe uma diferença genética importante entre as localidades amostradas no rio Madeira e as demais localidades analisadas. Os resultados anteriores são

corroborados pelas estimativas par a par para o  $\Phi_{ST}$ , após correção de Bonferroni, onde os valores de  $P$  foram significativos entre as localidades do rio Madeira e as demais (Tabela 4.5).

**Tabela 4.5** Valores de  $\Phi_{ST}$  par a par entre as localidades. *Números em negrito representam valores significativos ( $P < 0,002$ ).*

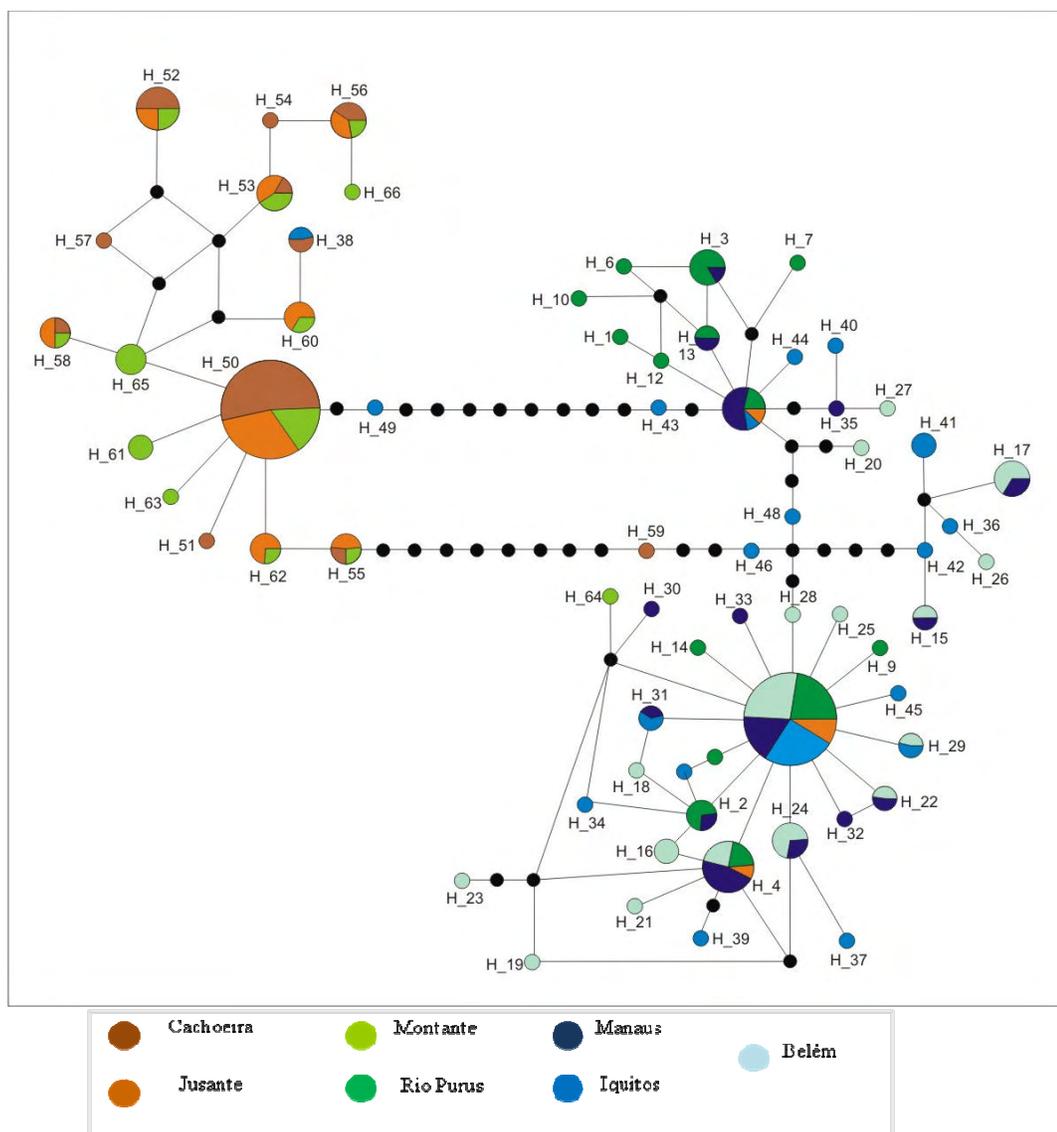
	<b>Iquitos</b>	<b>Rio Purus</b>	<b>Montante</b>	<b>Cachoeira</b>	<b>Jusante</b>	<b>Belém</b>
<b>Manaus</b>	0,02742	0,01029	<b>0,08410</b>	<b>0,22645</b>	<b>0,09372</b>	0,00792
<b>Iquitos</b>		0,01982	<b>0,10254</b>	<b>0,23924</b>	<b>0,09586</b>	0,01416
<b>Rio Purus</b>			<b>0,09970</b>	<b>0,23840</b>	<b>0,10215</b>	0,02824
<b>Montante</b>				0,06665	-0,00129	<b>0,09321</b>
<b>Cachoeira</b>					0,03366	<b>0,22941</b>
<b>Jusante</b>						<b>0,09693</b>
<b>Belém</b>						

**Tabela 4.6** Matriz do número de migrantes entre as localidades amostradas segundo Slatkin (1995) onde  $M=N$  para dados haplóides.

	<b>Iquitos</b>	<b>Rio Purus</b>	<b>Montante</b>	<b>Cachoeira</b>	<b>Jusante</b>	<b>Belém</b>
<b>Manaus</b>	17,7343	48,1055	5,4455	1,7080	4,8350	62,6338
<b>Iquitos</b>		24,7300	4,37593	1,5899	4,7157	34,8025
<b>Rio Purus</b>			4,5148	1,5973	4,3948	17,2054
<b>Montante</b>				7,0016	inf	4,8644
<b>Cachoeira</b>					14,3557	1,6794
<b>Jusante</b>						4,6585
<b>Belém</b>						

Os valores registrados para o número de migrantes variou de 1,5899 a 48,1055, apresentando também valores infinitos entre duas localidades (Tabela 4.6). Valores baixos de  $Nm$  foram registrados principalmente entre as localidades amostradas no rio Madeira e as localidades da calha do rio Amazonas. Os maiores valores foram registrados entre as localidades da calha, o que pode ser indicativo de maior fluxo gênico entre estas localidades (Tabela 4.6).

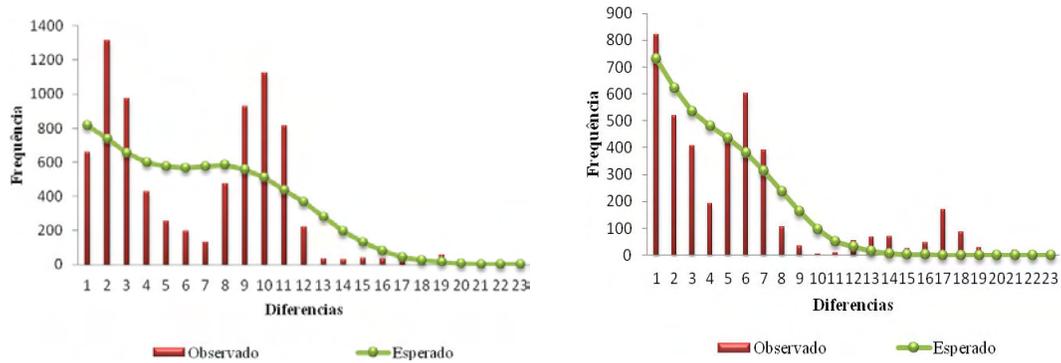
A rede para os 66 haplótipos registrados mostra a formação de dois grupos, um grupo formado pelas localidades amostradas no rio Madeira e outro grupo formado pelas localidades da calha e o rio Purus. Um aspecto importante corresponde à conexão, entre os dois grupos formados, por haplótipos únicos da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



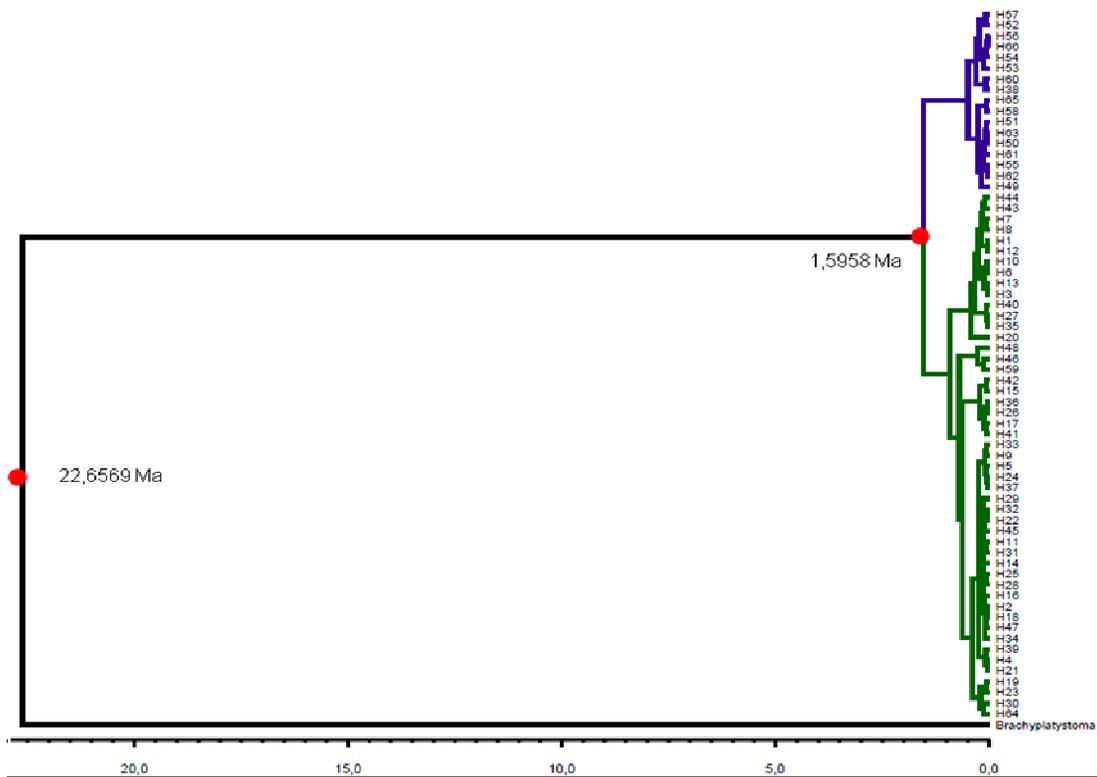
**Figura 4.2** Rede de haplótipos para *Brachyplatystoma platynemum* obtida de seqüências parciais de DNA da região controle (D-loop).

Os resultados obtidos para o teste de Mantel, mostram uma débil relação entre a distância geográfica e os valores para o índice de fixação ( $R^2=0,0539$ ) com valor de  $P=0,06$ , não significativo, indicando que isolamento por distancia é improvável de ter gerado o padrão de estrutura observado. As análises de divergência indicam que os dois filogrupos (Calha e rio Madeira) divergiram aproximadamente 1,5 Ma (Figura 4.4). A caracterização da expansão populacional com a análise de distribuição Mismatch, mostra que os filogrupos apresentam uma distribuição multimodal, característica de populações em equilíbrio demográfico (Schneider *et al.*,

2000), no entanto os valores estimados de  $F_s = -25,2422$  com  $P < 0,05$  para o filogrupos da Calha são indicativos de recente expansão populacional, entretanto para o filogrupos do rio Madeira os valores ( $F_s = -3,52218$ ,  $P = 0,147$ ) sustentam a distribuição registrada, provavelmente esta população passa por um momento de estabilidade em seu tamanho populacional (Figura 4.3).



**Figura 4.3** Distribuição Mismatch usando a informação da região controle para os filogrupos encontrados. O primeiro gráfico corresponde ao filogrupos da Calha e o segundo ao filogrupos do rio Madeira.



**Figura 4.4** Tempo de divergência dos filogrupos estimado no BEAST, usando a região controle do mtDNA. Tempo em milhões de anos (Ma) antes do presente. Calha em verde e rio Madeira em azul.

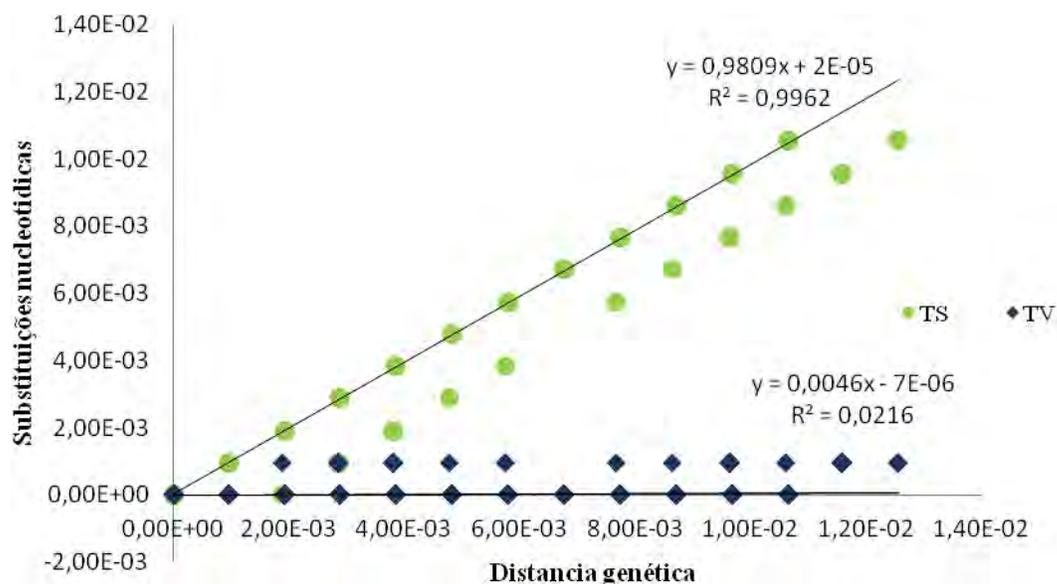
Foi estimado o tempo de expansão para os filogrupos Calha e rio Madeira baseados no parametro demografico tau ( $\tau$ ), entre 400.000 e 250.000 anos, respectivamente. Observa-se que o tempo de expansao para o filogrupo do rio Madeira é relativamente recente, razão pela qual, provavelmente, a distribuicao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

#### 4.1.2 Citocromo *b*

- **Análise da diversidade molecular e genética de *Brachyplatystoma platynemum***

Para o gene citocromo *b* foi sequenciada uma região de 1044 pb para um total de 140 indivíduos. Foram registrados 21 haplótipos e uma diversidade haplotípica total de  $Hd=0,798 \pm 0,00068$ . Um total de 21 sítios apresentaram-se polimórficos para um total de 21 mutações, sete *singletons* e 14 sítios informativos para parcimônia. A composição nucleotídica média para os indivíduos analisados foi de 28,1% para adenina, 31,3% para citosina, 14,0% para guanina e 26,6% para timina e o número médio de diferenças nucleotídicas par a par por sitio foi de  $Pi=0,00442 \pm 0,0000001$ . A média entre transições e transversões foi de 8,571 e 0,143,

respectivamente



**Figura 4.5** Gráfico de substituições nucleotídicas versus a distância genética para o gene citocromo *b* de *Brachyplatystoma platynemum*.

**Tabela 4.7** Polimorfismos de DNA do gene citocromo *b* para os indivíduos de *Brachyplatystoma platynemum* para as localidades amostradas. N= número amostral; H=número de haplótipos; HU= haplótipos únicos; S= sítios polimórficos; ETA= número de mutações; HD= diversidade haplotípica; PI= diversidade nucleotídica

População	N	H	HU	%HU	S	ETA	Hd	PI	D de Tajima	Fs de Fu
Manaus (M)	22	7	4	28,57	7	7	0,5974	0,00143	-0,71117	-1,93112
Iquitos-Perú (IP)	27	5	2	14,28	5	5	0,7379	0,00187	1,42103	1,09260
Rio Purus (RP)	30	3	1	7,14	7	7	0,5448	0,00216	0,81256	4,46337
Montante da Cachoeira (CJ)	8	6	3	21,43	12	12	0,8929	0,00387	-0,64401	-0,93978
Cachoeira (TE)	24	7	2	14,28	13	13	0,7572	0,00215	-1,23421	-0,49163
Jusante da Cachoeira (JT)	12	5	1	7,14	11	11	0,8333	0,00398	0,58140	1,63796
Belém(B)	17	4	1	7,14	6	6	0,6250	0,00141	-0,57485	0,71288

Um total de 21 haplótipos foram registrados para todos os indivíduos analisados apresentando frequências absolutas para cada haplótipos entre um e 16 (H1). O número total de haplótipos entre as localidades variou de H=3 (rio Purus, RP) a H=7 (Manaus, M).

Do total de haplótipos registrados, 14 foram haplótipos únicos e oito foram haplótipos compartilhados. A diversidade haplotípica variou de  $H_d=0,5448$  a  $H_d=0,8929$ . O maior número de haplótipos únicos foi registrado para a localidade de Manaus (N=22, H=7) com  $H_U=4$ , representando 28,57% do total de haplótipos únicos. Para esta localidade foi registrada uma diversidade haplotípica de  $H_d=0,5974$  e um número de sítios polimórficos de  $S=7$  (Tabela 4.7).

Para a localidade de Iquitos (IP, N=27) foi registrado um total de cinco haplótipos, dos quais dois foram únicos, representando 14,28% do total. A diversidade haplotípica foi de  $H_d=0,7379$  e o número de sítios polimórficos foi de  $S=5$ . Em comparação, para a localidade de Belém (N=17) foi registrado um total de quatro haplótipos, sendo um haplótipo único, representando 7,14% do total. A diversidade haplotípica para esta localidade foi de  $H_d=0,6250$  com um total de sítios polimórficos de  $S=6$ . Para o rio Purus (N=30) foi registrado um haplótipo único de um total de três haplótipos, representando uma diversidade haplotípica de  $H_d=0,5448$  e um total de sete sítios polimórficos registrados (Tabela 4.7).

Para as localidades amostradas no rio Madeira foram observados um maior número de sítios polimórficos, sendo para a Cachoeira (TE)  $S=13$ , para a Montante (CJ)  $S=12$  e para a localidade à Jusante (JT)  $S=11$  (Tabela 4.7). Já o número de haplótipos únicos variou entre um e três, representando, as três localidades em conjunto, 42,85% dos haplótipos únicos observados. Para a localidade da Montante da cachoeira foi registrado o maior valor de diversidade haplotípica,  $H_d=0,8929$ , e o segundo maior valor de haplótipos únicos com  $H_U=3$ . No entanto, o número amostral foi baixo com  $N=8$ . Para a localidade da Cachoeira e a Jusante foram registrados um número total de haplótipos de  $H=7$  e  $H=5$  e uma diversidade haplotípica de  $H_d=0,7572$  e  $H_d=0,8333$ , respectivamente (Tabela 4.7).

Os valores de  $P$  para o teste D de Tajima não foram significativos, indicando que as amostras obtidas para o gene citocromo *b* estão baixo seleção neutral. Os valores de  $F_s$  de  $F_u$  não foram significativos indicando que não se tem evidencia de expansão populacional.

- **Estrutura populacional inferida pela análise de variância (AMOVA) para o gene citocromo *b***

Para os análises de variância molecular foram realizados diferentes agrupamentos entre as localidades amostradas. Inicialmente foi realizada uma análise para as sete localidades visando testar a hipótese de panmixia. Os resultados obtidos são mostrados na Tabela 4.8.

**Tabela 4.8** Análise de variância para as sete localidades amostradas de *Brachyplatystoma platynemum* usando sequências do gene citocromo *b*.

<b>Fonte da variação</b>	<b>Grau de Liberdade</b>	<b>Soma dos quadrados</b>	<b>Componentes de variação</b>	<b>Porcentagem de variação</b>
Entre localidades	6	10,282	0,07032 Va	17,15
Dentro das localidades	133	45,182	0,33971 Vb	82,85
Total	139	55,464	0,41003	

---

Índice de Fixação  $\Phi_{ST} = 0.17149$

---

Os resultados desta primeira análise mostram que a maior variação se encontra dentro das localidades amostradas (82,85%), no entanto, existe uma porcentagem de variação importante entre as localidades de 17,15%.

Para poder avaliar a procedência desta variação, foram realizadas análises independentes entre as localidades da calha e dos dois afluentes da margem direita. O primeiro agrupamento foi realizado para dois grupos, o primeiro formado pelas localidades da calha e o segundo grupo pelos tributários que correspondem aos rios Purus e Madeira. Os resultados obtidos para este agrupamento mostram uma mudança na porcentagem de variação em relação à análise anterior, indicando uma porcentagem de variação entre as localidades menor que 5,76%, enquanto entre as localidades dentro dos grupos formados foi de 13,32% e dentro das localidades foi de 80,92%.

**Tabela 4.9** Análise de variância molecular para os dois grupos formados. Calha e tributários na área de estudo.

<b>Fonte da variação</b>	<b>Grau de Liberdade</b>	<b>Soma dos quadrados</b>	<b>Componentes de variação</b>	<b>Porcentagem de variação</b>
Entre localidades	1	3,300	0,02419 Va	5,76
Entre localidades dentro dos grupos	5	6,982	0,05592 Vb	13,32
Dentro das localidades	133	45,182	0,33971 Vc	80,92
Total	139	55,464	0,41982	

---

Índices de Fixação

$\Phi_{SC}=0,14134$

$\Phi_{ST}=0,19082$

$\Phi_{CT}=0,05762$

Análises de variância para cada um dos tributários em comparação com as localidades da calha como um grupo mostraram padrões diferentes. A análise de variância entre o rio Purus e as localidades da calha indicam que a variação entre os grupos é de 7%, enquanto dentro dos grupos é de 90,31%. Em comparação, a análise entre o rio Madeira e as localidades da calha, mostram que, apesar da maior parte da variação continuar representada dentro das localidades (76,60%), existe uma variação importante entre os grupos, correspondente à 22,92%, superior à encontrada entre o rio Purus e as demais localidades. Já a variação entre localidades dentro dos grupos formados foi de 0,48%.

A análise realizada para três grupos, o primeiro formado pelo rio Madeira, o segundo pelo rio Purus e um terceiro agrupando as localidades da calha mostrou que a variação entre as localidades é de 20,53%, enquanto que a variação dentro das localidades é de 78,70%.

Os valores observados nos diferentes grupamentos realizados mostram que é provável que o rio Madeira constitua uma unidade diferenciada, o qual corrobora os valores obtidos para as comparações par a par para o índice  $\Phi_{ST}$  entre as localidades.

**Tabela 4.10** Análise de variância molecular para três grupos conformados pelas localidades amostradas no rio Madeira (CJ, TE e JT), as localidades da calha (IP, B, M) e o rio Purus (RP)

Fonte da variação	Grau de Liberdade	Soma dos quadrados	Componentes de variação	Porcentagem de variação
Entre localidades	2	8,693	0,08863 Va	20,53
Entre localidades dentro dos grupos	4	1,589	0,00332 Vb	0,77
Dentro das localidades	133	45,182	0,33971 Vc	78,70
Total	139	55,464	0,43166	

Índices de Fixação

$\Phi_{SC}=0,00967$

$\Phi_{ST}=0,21301$

$\Phi_{CT}=0,20532$

Um aspecto importante a ser observado nestes resultados em relação à estruturação genética, é o fato de que, embora a estruturação genética tenha sido significativa entre as localidades da calha e as localidades da Cachoeira e a Jusante do rio Madeira, ela não foi significativa em relação à localidade à Montante do rio Madeira, fato que pode estar relacionado com o baixo número de indivíduos analisados para este marcador nesta localidade. No entanto, o padrão de estruturação para o rio Madeira é evidente.

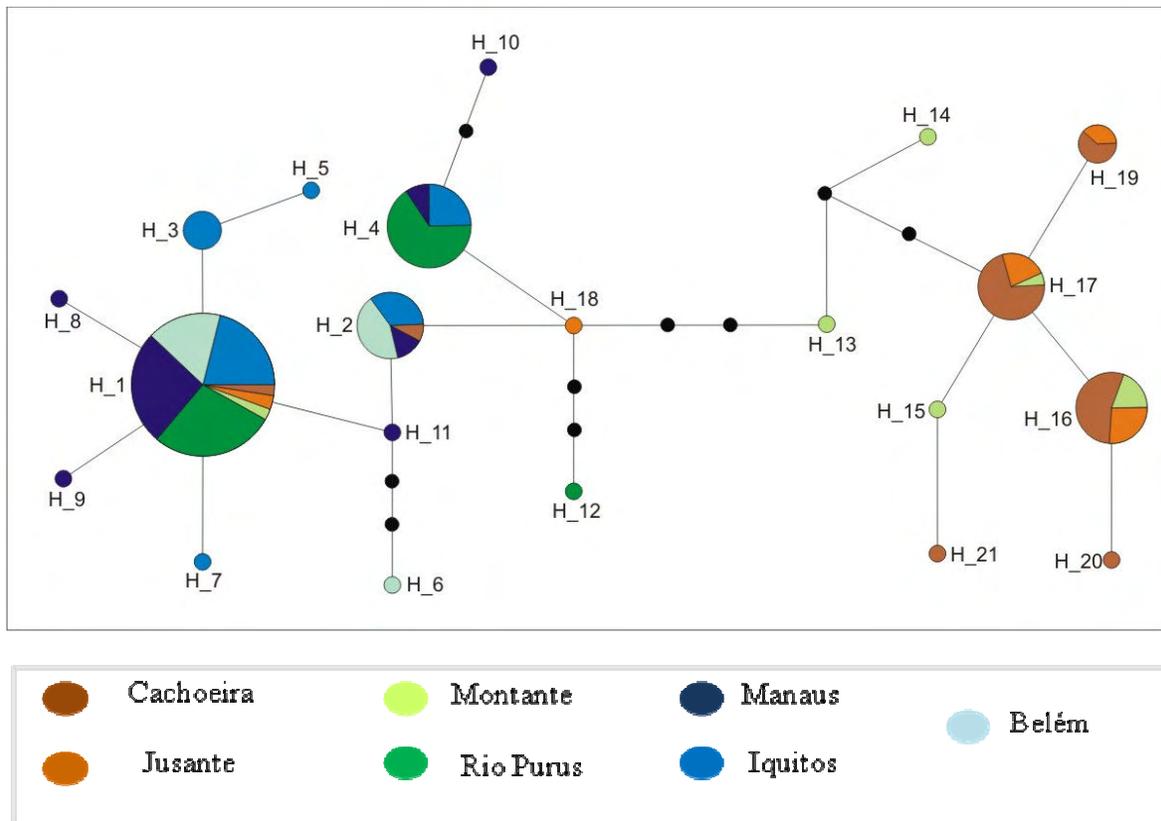
**Tabela 4.11** Valores de  $\Phi_{ST}$  par a par entre as localidades amostradas para o gene citocromo *b*. Valor significativo de  $P < 0,002$  em negrito.

	Iquitos	Rio Purus	Montante	Cachoeira	Jusante	Belém
<b>Manaus</b>	0,02209	0,08168	0,21833	<b>0,30016</b>	<b>0,21258</b>	0,03179
<b>Iquitos</b>		0,06155	0,15007	<b>0,23247</b>	0,15688	0,02339
<b>Rio Purus</b>			0,27376	<b>0,33903</b>	<b>0,26877</b>	0,18919
<b>Montante</b>				0,00467	-0,04754	0,20675
<b>Cachoeira</b>					-0,03480	<b>0,27820</b>
<b>Jusante</b>						<b>0,20695</b>
<b>Belém</b>						

Os valores para o número de migrantes segundo Slatkin (1995) corroboram os valores obtidos para o  $\Phi_{ST}$ , mostrando um baixo número de migrantes entre as localidades que apresentaram valores significativos de estruturação (Tabela 4.12). No caso da localidade da Montante do rio Madeira, pode-se observar se que os valores Nm foram baixos, apesar do valor de  $\Phi_{ST}$  não ser significativo.

**Tabela 4.12** Valores de Nm segundo Slatkin (1995) para as localidades amostradas usando o gene citocromo *b*.

	<b>Iquitos</b>	<b>Rio Purus</b>	<b>Montante</b>	<b>Cachoeira</b>	<b>Jusante</b>	<b>Belém</b>
<b>Manaus</b>	22,13414	5,62164	1,79009	<b>1,16577</b>	<b>1,85202</b>	15,23021
<b>Iquitos</b>		7,62330	2,83177	<b>1,65083</b>	2,68710	20,87809
<b>Rio Purus</b>			1,32642	<b>0,97481</b>	<b>1,36029</b>	2,14286
<b>Montante</b>				106,500	inf	1,91840
<b>Cachoeira</b>					inf	<b>1,29728</b>
<b>Jusante</b>						<b>1,91604</b>
<b>Belém</b>						



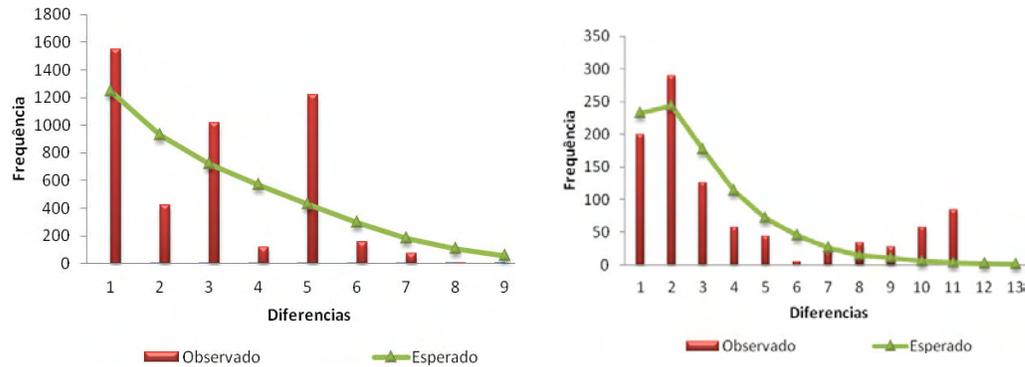
**Figura 4.6** Rede para 21 haplótipos de *Brachyplatystoma platynemum* usando o gene citocromo *b*.

A

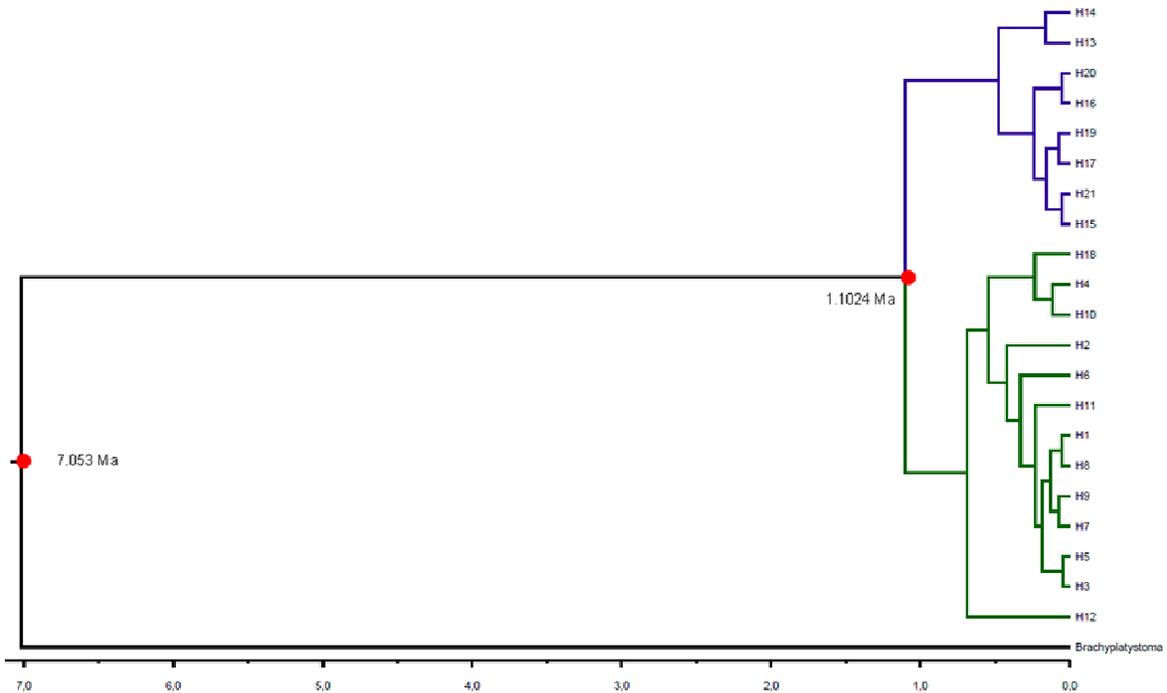
Figura 4.6 mostra a rede construída para os 21 haplótipos do gene citocromo *b* de *Brachyplatystoma platynemum* registrados para as localidades amostradas. Cada cor corresponde a uma localidade, observa-se a distribuição diferenciada de alguns haplótipos, mostrando a formação de dois grupos, à esquerda as localidades da calha junto com o rio Purus e à direita as localidades amostradas no rio Madeira. O haplótipo H18 da localidade da Jusante conecta os dois grupos.

O teste de Mantel mostrou uma débil relação entre a distancia geográfica e os valores para o índice de fixação ( $R^2=0,1231$ ) estatisticamente não significativo ( $P= 0,097$ ), indicando que isolamento por distancia é improvável ter gerado o padrão de estrutura observado. As análises de divergência indicam que os dois filogrupos (Calha e rio Madeira) divergiram a aproximadamente 1,10 Ma. Entretanto os resultados da análise de distribuição Mismatch, mostraram que os filogrupos apresentam uma distribuição multimodal, característica de populações em equilíbrio demográfico

(Schneider *et al.*, 2000). Esta distribuição foi sustentado pelos valores de  $F_s$  para o filogrupos da Calha e do rio Madeira de -2,33323 e -1,20237 respectivamente. Foi estimado o tempo de expansão baseado na taxa de mutação do gene citocromo *b* para os filogrupos Calha e rio Madeira usando o parametro demografico tau ( $\tau$ ), entre 270.000 e 25.000 anos, respectivamente.



**Figura 4.7** Distribucion Mismatch usando a informação do gene citocromo *b*. Primeiro gráfico corresponde aos filogrupos da Calha e o segundo ao filogrupos do rio Madeira.



**Figura 4.8** Tempo de divergencia dos filogrupos estimado no BEAST usando o gene citocromo *b*. Tempo em milhoes de anos (Ma) antes do presente. Calha em verde e rio Madeira em azul.

## 4.2 Microsatélites

- **Análise da diversidade genética de *Brachyplatystoma platynemum* usando marcadores microsatélites**

As análises foram baseadas em uma matriz contendo os genótipos para um total de 169 indivíduos e seis *loci*, para seis localidades do sistema Amazonas-Solimões, os quais incluem dois tributários e duas localidades da calha. Dentro dos tributários foram amostradas três localidades no rio Madeira que correspondem à Montante, a Jusante e a Cachoeira. Análises no programa MICROCHECKER indicam frequência de alelos nulos em três dos seis *loci* analisados para diferentes populações (Tabela 4.13). No entanto, não foram encontrados desvios como consequência de *stutter* ou *dropout*.

No total foram encontrados 37 alelos para todos os *loci* e todas as localidades. Alelos privados foram registrados para as localidades de Manaus, Iquitos, Montante da Cachoeira e a localidade da Cachoeira e apresentaram frequências entre 0,029 e 0,083. Os *loci* avaliados foram pouco polimórficos apresentando um número de alelos entre dois e 10 com média de 6,43 alelos por loco. Os índices de heterozigosidade observada ( $H_o$ ) e esperada ( $H_e$ ) variaram entre 0,055 (BR 51, na localidade da montante do rio Madeira CJ) 0,864 (BR61, na localidade de Iquitos) e 0,055 a 0,849 nos mesmos *loci* e localidades, respectivamente (Tabela 4.13). As estimativas para o índice de endogamia  $F_{IS}$  registrou valores entre 0,000 para a localidade da Montante(CJ) para o locus BR51, no qual o  $H_o$  e  $H_e$  apresentaram o mesmo valor, e 0,867 registrado para a localidade do Rio Purus para o locus BR61. Do conjunto de estimativas para o  $F_{IS}$  (36 estimativas) 14 apresentaram valores negativos ( $H_o > H_e$ ) provavelmente devido ao excesso de heterozigotos, enquanto que 18 estimativas apresentaram valores positivos indicando deficiência de heterozigotos. O valor de  $F_{IS}$  para todos os *loci* foi de  $F_{IS} = 0,205$ , corroborando as estimativas por locus por localidade.

**Tabela 4.13** Análise intrapopulacional de “*Brachyplatystoma platynemum*”.  $n$ , número de espécimes;  $A$ , número de alelos;  $H_o$ , heteroziguidade observada;  $H_E$ , heteroziguidade esperada;  $F_{IS}$ , índice de endogamia. No equilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE) ( $P < 0.007$ ) após correção de Bonferroni e  $R$ , frequência de alelos nulos por loco.

População	Parâmetros	BR43	BR49	BR51	BR53	BR61	BR70
<b>M</b>	$N$	21	21	27	23	24	20
	$A$	3	6	2	5	9	6
	$H_o$	0,714	0,476	0,370	0,609	0,750	0,750
	$H_e$	0,521	0,669	0,307	0,613	0,844	0,717
	$F_{IS}$	-0,382	0,293	-0,209	0,008	0,113	-0,048
	<b>HWE</b>	0,110	<b>0,005</b>	0,548	0,014	0,035	0,552
	$R$	-	0,107	-	-	-	-
<b>IP</b>	$N$	17	24	28	27	22	26
	$A$	3	7	2	4	7	6
	$H_o$	0,470	0,542	0,286	0,296	0,864	0,654
	$H_e$	0,562	0,705	0,382	0,491	0,849	0,644
	$F_{IS}$	0,166	0,235	0,255	0,401	-0,018	-0,015
	<b>HWE</b>	0,050	0,059	0,302	<b>0,001</b>	0,184	0,703
	$R$	-	-	-	0,1254	-	-
<b>RP</b>	$N$	32	25	32	36	10	38

População	Parâmetros	BR43	BR49	BR51	BR53	BR61	BR70
	<i>A</i>	2	4	2	3	6	5
	<b>Ho</b>	0,469	0,440	0,469	0,250	0,100	0,710
	<b>He</b>	0,364	0,520	0,468	0,269	0,721	0,759
	<i>F<sub>rs</sub></i>	-0,292	0,156	-0,002	0,073	0,867	0,065
	<b>HWE</b>	0,153	0,425	1,000	0,594	0,000	0,454
	<i>R</i>	-	-	-	-	0,347	-
<b>CJ</b>	<i>N</i>	16	12	18	17	12	17
	<i>A</i>	2	2	2	6	3	6
	<b>Ho</b>	0,500	0,167	0,055	0,529	0,583	0,529
	<b>He</b>	0,387	0,159	0,055	0,647	0,518	0,665
	<i>F<sub>rs</sub></i>	-0,304	-0,048	0,000	0,186	-0,132	0,209
	<b>HWE</b>	0,512	1,00	1,00	0,255	1,00	0,214
	<i>R</i>	-	-	-	-	-	-
<b>TE</b>	<i>N</i>	24	15	24	27	20	28
	<i>A</i>	2	5	2	4	5	7
	<b>Ho</b>	0,292	0,200	0,083	0,370	0,550	0,321
	<b>He</b>	0,254	0,411	0,081	0,607	0,601	0,678
	<i>F<sub>rs</sub></i>	-0,150	0,523	-0,022	0,395	0,087	0,530

População	Parâmetros	BR43	BR49	BR51	BR53	BR61	BR70
	<b>HWE</b>	1,000	0,0005	1,000	0,030	0,062	0,000
	<b>R</b>	-	0,1415	-	0,1414	-	0,2067
<b>JT</b>	<b>N</b>	16	12	18	17	10	17
	<b>A</b>	2	2	2	4	2	6
	<b>H<sub>0</sub></b>	0,500	0,083	0,111	0,588	0,100	0,705
	<b>He</b>	0,387	0,228	0,108	0,700	0,395	0,718
	<b>F<sub>IS</sub></b>	-0,304	0,645	-0,030	0,164	0,757	0,018
	<b>HWE</b>	0,513	0,129	1,000	0,355	0,046	0,517
	<b>R</b>	-	0,1418	-	-	0,2	-

Desvios do HWE foram observados para dois das 36 estimativas realizadas para os *loci* analisados entre as populações (Tabela 4.13) após a correção de Bonferroni ( $P < 0,007$ ). Os únicos loci que apresentaram desvios foram o BR49 e o BR53. Os valores significativos para o teste de HWE foram concordantes com as estimativas do índice  $F_{IS}$  e os desvios de  $H_o$  e  $H_e$  para cada uma das localidades avaliadas indicando que baixos níveis de heterozigidade foram registrados ( $H_o < H_e$ ) e portanto, os valores para o  $F_{IS}$  foram positivos.

**Tabela 4.14** Índices para as localidades amostradas.  $N_{TOTAL}$ , número total de indivíduos;  $A_T$  número total de alelos;  $A_R$ , riqueza alélica; média da diversidade gênica e média das diferenças par a par.

Localidades	$N_{TOTAL}$	$A_T$	$A_R$	Média da diversidade Gênica	Média das diferenças par a par
Manaus	30	36	5,143	0,628±0,174	2,458
Iquitos	30	35	5,000	0,629±0,159	2,898
Rio Purus	38	26	3,714	0,548±0,195	2,087
Montante da Cachoeira	20	27	3,857	0,453±0,265	2,065
Cachoeira de Teotônio	33	31	4,429	0,490±0,250	2,007
Jusante da Cachoeira	18	22	3,143	0,453±0,235	2,206

Estimativas para as seis localidades mostram que a média de diversidade gênica está entre 0,453±0,265 e 0,629±0,159 e o número total de alelos e a riqueza alélica variaram de 22 a 31 e 3,143 a 5,143, respectivamente, enquanto a média das diferenças par a par dentro das localidades foi pouco variável (Tabela 4.14).

O número de migrantes foi calculado baseado no modelo  $M=2Nm$ , onde assume-se que a mutação é insignificante quando é comparada com a taxa de migração  $m$ . As estimativas par a par entre as localidades amostradas indicam que entre as localidades do rio Madeira que incluem Montante, Cachoeira e Jusante e as localidades da calha e a localidade do rio Purus, apresentam baixos valores de migrantes variando entre 1,368 e 2,776, enquanto que o número de migrantes é

infinito entre Manaus e Iquitos. Entre o rio Purus e Iquitos também foi observado um baixo número de migrantes de 2,843.

- **Estrutura genética para marcadores microssatélites de *Brachyplatystoma platynemum***

Análises de variância molecular para os *loci* estudados em *B. platynemum*, mostram diferença importante entre as localidades amostradas, no entanto a maior variação continua representada dentro das localidades (Tabela 4.15).

O índice de fixação  $\Phi_{ST}$  (baseado no modelo evolutivo IAM) mostra uma porcentagem de diferenciação entre as localidades de 16,53%, enquanto que dentro das localidades a porcentagem corresponde à 83,47%. Em comparação, as estimativas baseadas no índice  $R_{ST}$  (baseado no modelo evolutivo SMM), mostram uma variação menor entre as localidades, correspondente à 5,88%, enquanto a variação dentro das localidades foi de 94,12% (Tabela 4.15).

**Tabela 4.15** Análise AMOVA considerando todas as localidades amostradas para *Brachyplatystoma platynemum* em um mesmo grupo utilizando os índices  $\Phi_{ST}$  e  $R_{ST}$ .

Fonte da variação	Grau de Liberdade	Soma dos quadrados	Componentes de variação	Porcentagem de variação
Índice	$\Phi_{ST} R_{ST}$	$\Phi_{ST} / R_{ST}$	$\Phi_{ST} / R_{ST}$	$\Phi_{ST} / R_{ST}$
Entre localidades	5	55,250/904,799	0.18211/2,52554	16,53/5,88
Dentro das localidades	332	305,235/13433,37	0,91938/40,46195	83,47/94,12
Total	337	360.485/14338,166	1,10149/42,98749	

Índice de Fixação  $\Phi_{ST} = 0.16533$ ;  $R_{ST} = 0,05875$

\* significa  $p < 0.05$ . Baseado em 16,000 permutações.

As diferenças registradas para os índices de fixação podem estar relacionados com os diferentes modelos evolutivos que estão baseados cada um destes índices. O índice  $R_{ST}$  é independente da taxa de mutação sob um modelo estrito SMM, geralmente é considerado o melhor índice para refletir de forma cuidadosa o padrão de mutação dos microssatélites, no entanto, desvios do modelo SMM podem levar a subestimativas da diferenciação populacional

devido à alta variância associada a este índice em comparação com o  $\Phi_{ST}$  (Balloux e Moulin, 2002), os valores podem ser superiores ao  $\Phi_{ST}$  (Slatkin 1995). Na prática o modelo estrito de mutação *stepwise* é difícil de acontecer, motivo pelo qual o uso do índice  $R_{ST}$  é evitado. De fato, quando a mutação é estritamente *stepwise*,  $R_{ST}$  não é necessariamente o melhor estimador que o  $\Phi_{ST}$  (Balloux e Goudet, 2001), por exemplo, quando a escada de tempo é curta e a influência da mutação é relativamente pequena (Slatkin, 1995).

Análises de variância independentes baseados no  $\Phi_{ST}$  foram realizadas para diferentes agrupamentos entre as localidades. Para três grupos formados pelas duas localidades da calha (IQUITOS e Manaus), rio Purus e rio Madeira, a maior variação foi registrada dentro das populações com uma porcentagem de 92,83%, enquanto entre os grupos o valor foi de 6,44% com valor de  $\Phi_{ST}=0,07172$  e valor de  $P<0,05$ . Quando foi realizada a análise comparando cada um dos dois tributários com o resto das localidades, foi observado que as comparações entre o rio Purus com as outras localidades a maior variação foi concentrada dentro das populações com 97,78%; No entanto, quando a análise foi realizada agrupando as localidades do rio Madeira como um grupo em comparação com o resto de localidades como um segundo grupo, foi registrada uma variação importante entre os grupos correspondente cujo valor foi de 12,98%, enquanto dentro das localidades o valor foi de 89,14%.

Doze das 15 comparações par a par entre as localidades para o índice  $\Phi_{ST}$  foram significativas com valor de  $P<0,002$ . Os valores para  $\Phi_{ST}$  indicam de moderada a alta estruturação genética entre as localidades da calha e o rio Purus com as localidades amostradas no rio Madeira (Tabela 4.16). No entanto, entre as localidades do rio Madeira, só apresentaram valores significativos as comparações entre a Cachoeira e a Jusante com valor de  $\Phi_{ST}=0,07260$ . Em comparação, as estimativas para o índice  $R_{ST}$ , foram significativas e com baixos valores para as localidades da Montante e a Jusante do rio Madeira com as localidades de Manaus, IQUITOS e rio Purus (Tabela 4.16).

**Tabela 4.16** Índices de fixação  $\Phi_{ST}$  (acima) e  $R_{ST}$  (abaixo) par a par entre as localidades amostradas para *Brachyplatystoma platynemum*. Números em negrito representam valores significativos ( $P < 0,002$ ).

	Manaus	IQUITOS	Rio Purus	Montante	Cachoeira	Jusante
Manaus	-	-0,01016	<b>0,10888</b>	<b>0,18135</b>	<b>0,15827</b>	<b>0,16244</b>
IQUITOS	-0,03911	-	<b>0,16205</b>	<b>0,20677</b>	<b>0,18103</b>	<b>0,20347</b>
Rio Purus	-0,12405	-0,05461	-	<b>0,28986</b>	<b>0,25359</b>	<b>0,24579</b>
Montante	<b>0,16375</b>	<b>0,20543</b>	<b>0,19674</b>	-	0,04516	0,05296
Cachoeira	0,04731	0,07544	0,03307	0,06570	-	<b>0,07260</b>
Jusante	0,08956	<b>0,14518</b>	<b>0,14140</b>	0,02638	0,01875	-

A análise bayesiana realizada por iterações de cadeias markovianas gerada pelo programa STRUCTURE sob o modelo Admixture, avaliando  $K = 1$  a 8 populações, mostrou a mais alta verossimilhança (LnPD) em uma estrutura populacional de  $K=2$ , resultado que foi corroborado pela estimativa delta de  $K$  (Figura 4.9 e

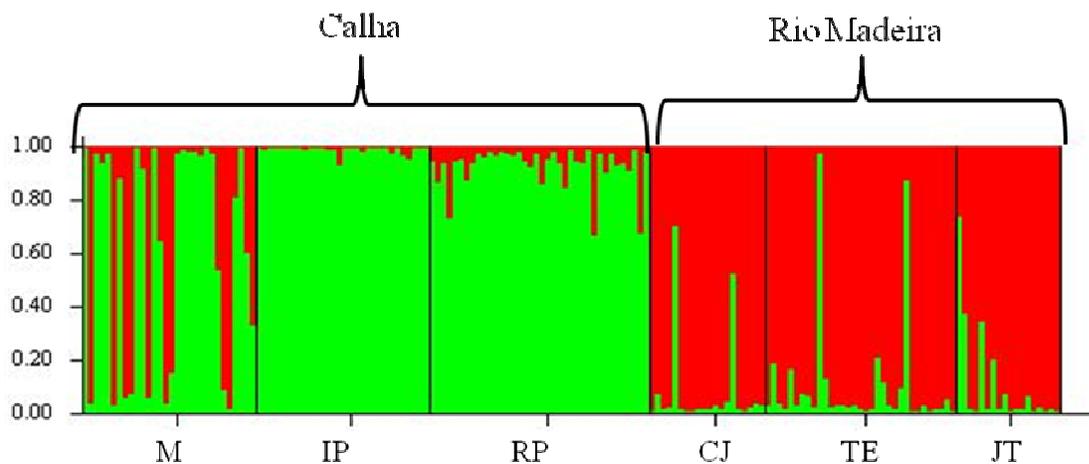
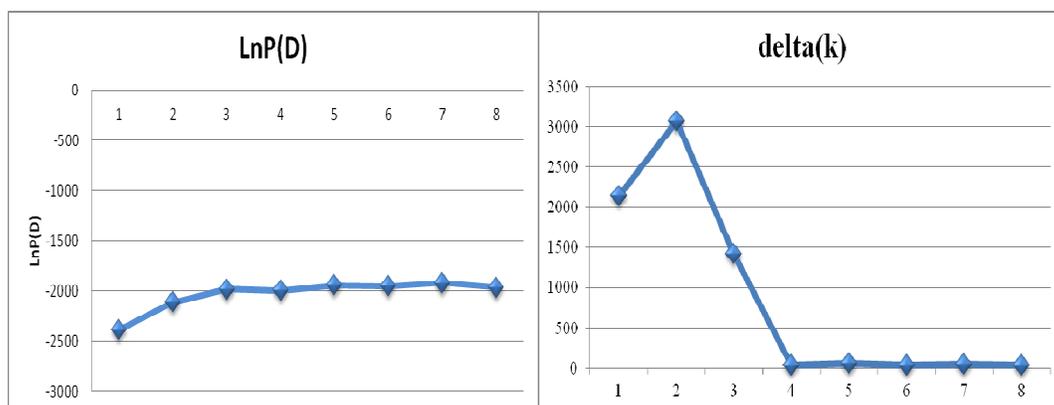
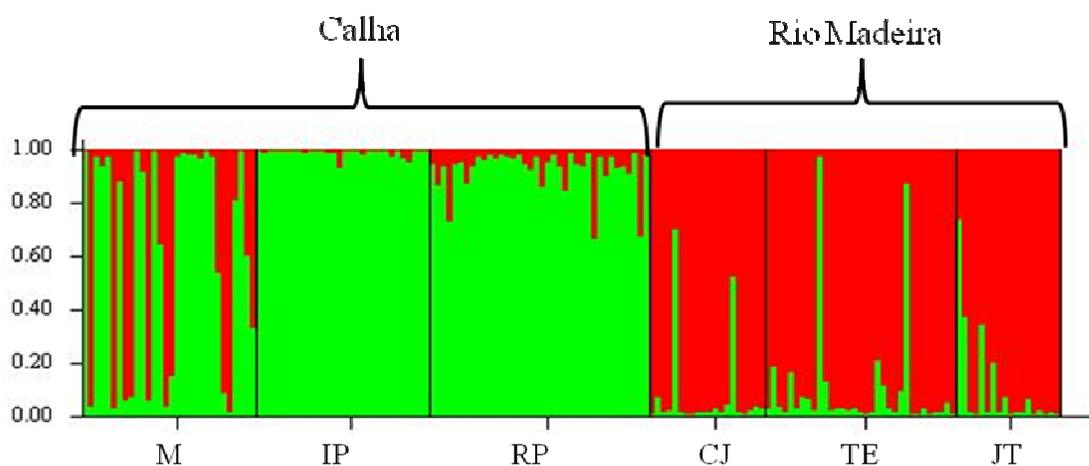


Figura 4.10).



**Figura 4.9** Estimções de  $\text{LnP}(D)$  e  $\text{delta}(K)$  dos resultados da análise bayesiana, sob o modelo Admixture, com  $K=1$  a 8.



**Figura 4.10** Gráfico obtido com o programa STRUCTURE evidenciando estrutura genética entre as seis localidades amostradas de *Brachyplatystoma platynemum*, formando dois grupos. Em verde as localidades da calha (Manaus e Iquitos) e o rio Purus, em vermelho as localidades amostradas no rio Madeira.

## 5. Discussão

A identificação dos padrões de distribuição da variação genética dentro e entre populações é referida como a estrutura genética populacional das espécies. Informação desta estrutura é um parâmetro fundamental na biologia evolutiva e conservação. Altos níveis de variação genética podem aumentar o potencial das populações em responder à seleção, acentuar a adaptação dentro de um habitat particular e também ampliar os limites de colonização e distribuição, possibilitando a sobrevivência em uma grande variedade de ambientes (Carvalho, 1993; Kalinowski, 2004).

Análises genéticas populacionais e filogeográficas usando marcadores moleculares constituem uma poderosa ferramenta e podem elucidar várias questões relativas à estruturação de populações selvagens ou cultivadas de diversas espécies, tais como origem, sucesso reprodutivo, taxas de divergências genéticas, migração, tamanhos da população, seleção natural e eventos históricos (Sunnucks, 2000).

Considerando a grande diversidade biológica registrada na região amazônica e a importância do recurso íctico nesta área, têm levado ao incremento nos estudos da variabilidade genética de diversas espécies de peixes amazônicos, principalmente aquelas que constituem uma unidade de exploração comercial. Os grandes bagres amazônicos do gênero *Brachyplatystoma* são um importante recurso pesqueiro e biologicamente são reconhecidos por sua capacidade migratória

(embora o padrão não tenha sido conhecido para todas as espécies) além de sua ampla distribuição no sistema a Amazonas-Solimões (Barthem e Goulding, 1997; Petrere *et al.*, 2004).

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

Análises realizadas neste estudo para 216 indivíduos de *B. platynemum* usando 663pb da região controle, mostram um padrão similar nos valores estimados para os índices de polimorfismo e distribuição espacial da diversidade genética, ao descrito em trabalhos realizados para outras espécies do gênero, como *Brachyplatystoma vaillanti* (Formiga-Aquino, 2004), *Brachyplatystoma capapretum* e *Brachyplatystoma filamentosum* (Huerdo, 2009) e *Brachyplatystoma rousseauxii* (Batista, 2010). Dos 66 haplótipos registrados para *B. platynemum* 47 corresponderam a haplótipos únicos, registrados em maior proporção para algumas localidades da calha (Iquitos 27,66% e Belém 21,28%) em tanto para os tributários amostrados, rio Purus (RP) e as localidades amostradas no rio Madeira foi achado um número menor de haplótipos; padrão similar na distribuição dos haplótipos foi registrado em outros estudos para *B. rousseauxii* (Batista, 2010), onde os tributários da margem direita (rio Madeira, rio Purus e rio Juruá) apresentaram um número reduzido de haplótipos únicos. O maior número de haplótipos foi observado para a espécie *B. vaillanti* nas localidades de Belém, Manaus e Tabatinga (Rodrigues *et al.*, 2009), em comparação para *B. rousseauxii* a localidade de Belém, apresentou os maiores valores para a maioria dos índices de diversidade molecular (Batista, 2010), o que está de acordo com os dados verificados no presente estudo.

O padrão de alta diversidade haplotípica registrado na região do estuário, esta relacionada segundo Batista e Alves-Gomez (2006), com a função do estuário como área de criação, que congrega um número representativo de indivíduos nascidos nas cabeceiras dos diferentes tributários. No entanto a presença de um número elevado de haplótipos na região oeste da bacia amazônica, como foi observado para *B. platynemum* (localidade de Iquitos, IP) e para outras espécies do gênero, pode estar correlacionada com o processo de migração descrito para *B. rousseauxii*, onde

indivíduos adultos podem não retornar ao estuário em um próximo ciclo migratório e sim à região entre o alto Amazonas e o baixo Solimões, área preferencial de alimentação (Barthem e Goulding, 1997; Barthem e Goulding, 2007; Leite *et al.*, 2007), mantendo uma alta diversidade de haplótipos nesta zona.

Padrões similares na distribuição da variabilidade genética usando a região controle foram determinados para algumas espécies de peixes como *Nannostomus eques* (Terêncio, 2009), *Hypopygus lepturus* (Schmitt, 2005), e para algumas espécies migradoras de prochilodontídeos como *Prochilodus nigricans* (Machado, 2009) e *Semaprochilodus insignis* (Batalha, 2009), para espécies do gênero *Symphysodon* (Farias e Hrbek, 2008) e o gênero *Fluviphylax* (Souza, 2008).

A região controle (mtDNA) tem sido o marcador molecular de sequências nucleotídicas preferencialmente utilizado na estimativa e distribuição da variabilidade genética de peixes, contudo outros marcadores mitocôndrias como o gene citocromo *b* também tem sido usados. O gene citocromo *b* é considerado um dos genes mais úteis para estudos filogenéticos interespecíficos (Farias *et al.*, 2001) mais também é usado para avaliar populações e relações taxonômicas a níveis inferiores (Meyer, 1993), neste caso a nível intraespecífico, este gene conservado pode contribuir com informação genética adicional dos processos evolutivos que podem ter modelado a variabilidade genética contemporânea das populações.

Neste sentido informação adicional foi obtida a partir das análises do gene Citocromo *b* (1044pb) para um total de 140 indivíduos de *B. platynemum*, que registraram uma alta diversidade genética com um total de 21 haplótipos. Para este marcador foi observado um padrão similar ao encontrado para a região controle em relação à distribuição da diversidade haplotípica entre as localidades amostradas. O maior número de haplótipos únicos foi registrada para a localidade de Manaus (HU=4) na calha principal do Amazonas-Solimões, a exceção da localidade da Montante no rio Madeira que apresentou o segundo maior número de haplótipos únicos (HU=3) e a maior diversidade haplotípica ( $Hd=0,8929$ ), no entanto foi analisado um reduzido número de indivíduos (N=8) o que pode ter interferido nas análises.

Apesar de que não se tem informação comparativa deste marcador para outras espécies do gênero, análises filogeográficas realizadas para alguns gêneros de peixes como *Rhamdia* (Perdices

*et al.*, 2002), e *Potamorranphis* (Lovejoy e de Araujo, 2000) tem mostrado padrões evidentes de diversificação de espécies, além de ter sido usado em estudos populacionais da espécie *Colossoma macropomum* (Santos *et al.*, 2007) com excelentes resultados na diferenciação de populações.

De acordo com o padrão de distribuição da diversidade haplotípica observada com os marcadores mitocondriais, análises posteriores para testar a hipótese de panmixia foram realizadas de forma independente.

Análises de variância molecular (AMOVA) realizando diferentes agrupamentos entre as localidades amostradas registraram, que a maior variabilidade genética esta presente dentro das localidades, no entanto existe uma porcentagem importante de variabilidade entre localidades. A maior porcentagem de variância molecular encontrado entre os agrupamentos foi obtida para dois grupos, o primeiro composto pelas localidades da Calha (Manaus, Iquitos, Belém) e o rio Purus, e o segundo composto pelas três localidades amostradas no rio Madeira (Montante, Cachoeira e a Jusante). As estimativas do índice de fixação  $\Phi_{ST}$  par a par entre as localidades amostradas sustentam estes agrupamentos com uma alta significância estatística para os valores estimados; as localidades amostradas no rio Madeira apresentaram valores significativos para o índice de fixação em comparação com o resto das localidades, indicando a existência de unidades populacionais diferentes para esta espécie, o que permite rejeitar a hipótese inicial de panmixia.

O mesmo padrão de estruturação foi corroborado através de seis loci microssatélites avaliados para 169 indivíduos que registraram um total de 37 alelos com valores de riqueza alélica entre as localidades de 3,143 e 5,143. Apesar de registrar níveis baixos de polimorfismo essas análises refletiram o padrão de estruturação encontrado com os marcadores mitocôndrias.

As análises de variância molecular mostram que existe uma maior variação dentro das localidades que entre estas, no entanto os valores para o índice de fixação  $\Phi_{ST}$  foram estatisticamente significativos nas comparações par a par entre as localidades da calha e o rio Madeira com valores entre 0,15827 (M e CJ) e 0,28986 (RP e CJ). Embora se tenha observado também estruturação genética nas comparações par a par, para a localidade do rio Purus com duas das localidades da calha (Manaus e Iquitos), as análises de variância molecular entre estas localidades não apresentaram significância estatística. A análise Bayesiana realizada no programa

STRUCTURE, e as estimativas de Ln (P)D e  $\Delta K$ , indicaram a formação de dois grupos sustentando a estruturação registrada entre as localidades da Calha e as localidades do rio Madeira.

As diferenças encontradas entre os marcadores mitocondriais e os marcadores microssatélites, em relação à estrutura registrada para a localidade do rio Purus, pode estar relacionado com os níveis de variabilidade, entre as diversas classes de marcadores além do tipo de herança destes. Estimativas realizadas das taxas de mutação de marcadores moleculares em peixes indicam que a taxa de mutação do gene citocromo *b* é de 1,5% por milhão de anos (Zardoya e Doadrio, 1999) e para a região controle estima-se uma taxa de mutação maior de  $3,6 \pm 0,46\%$  por milhão de anos (Donaldson e Wilson, 1999), no entanto os microssatélites possuem uma taxa de mutação maior que os marcadores mitocôndrias de  $10^{-2}$ - $10^{-6}$  por locus por geração (Ellegren, 2000) e se deve às alterações no número da unidade de repetição.

Evidências de estruturação genética tinham sido observadas para duas espécies do gênero *Brachyplatystoma* na bacia amazônica, usando a região controle do DNA mitocondrial. Huergo em 2009, identificou que *B. filamentosum* apresenta estruturação genética associada principalmente ao tipo de água (branca, clara e preta), posteriormente foi observada uma baixa estruturação para *B. rousseauxii* entre o rio Madeira e rio Japurá (Batista, 2010) com a região controle, entretanto para *B. vaillanti* (Formiga-Aquino, 2004) e *Brachyplatystoma capapetrum* (Huergo, 2009) não foi observada estrutura genética, sendo definido o estado de panmixia para estas duas espécies, na bacia amazônica.

Padrões de estrutura genética foram identificados para algumas espécies de peixes amazônicos como o curimatã (*Prochilodus nigricans*) envolvendo localidades dos rios Tapajós, Xingu e alto Madeira (Machado, 2009) e para o jaraqui (*Semaprochilodus insignis*) foi observada estruturação entre a bacia amazônica e do Orinoco, no entanto ainda as espécies compreendem um único estoque na região amazônica (Batalha, 2009). Um estudo realizado para outro bagre distribuído na bacia do Paraná-Paraguai, *Pseudoplatystoma corruscans*, mostrou estrutura genética relacionada com o comportamento de *homing* (Pereira *et al.*, 2010).

Os resultados aqui obtidos para *B. platynemum*, mostram estruturação genética entre as localidades do rio Madeira e demais localidades analisadas, padrão que não é uma exceção à regra

na região tropical (Lundberg *et al.*, 1998, Saint-Paul, 2000). No entanto não foi observada uma redução da variabilidade genética no sentido leste oeste que possa ser associado a um comportamento de *homing*, como foi sugerido por Batista e Gomez (2006) para *B. rousseauxii*, onde a região do estuário foi identificada como áreas de agrupamento de diferentes pools gênicos, apresentando uma alta diversidade genética, e os tributários de águas brancas, possuem uma reduzida diversidade genética, comportando se como zonas de segregação reprodutiva, devido a que indivíduos adultos migrantes viajam à cabeceira dos rios regressando ao lugar de nascimento, contribuindo na formação de agrupamentos monofiléticos nos diferentes tributários.

Embora no presente estudo fosse achada uma alta variabilidade genética para a localidade de Belém, zona do estuário, também foi observada níveis importantes de variabilidade genética nas localidades de Iquitos e no rio Purus, um dos dois tributários amostrados, que apresentou haplótipos compartilhados com as localidades amostradas na calha. Entretanto, para as localidades amostradas no rio Madeira, foi registrada a menor variabilidade genética, e em consequência valores elevados para o índice de fixação, principalmente entre a localidade da Cachoeira de Teotônio e as localidades da calha, o que provavelmente poderia estar associado à presença de barreiras físicas geradas pelas cachoeiras, características do rio Madeira.

Análises de variância molecular e estimativas do índice de fixação indicaram ausência de estrutura genética entre as três localidades do rio Madeira, pelo qual para os indivíduos distribuídos nesta bacia as cachoeiras e corredeiras não representam uma barreira física ao fluxo gênico.

As cachoeiras ou corredeiras correspondem a regiões onde o rio Madeira atravessou o escudo brasileiro do precambriano, e têm sido identificadas como elementos importantes na diferenciação populacional das bacias do Amazonas e Bolívia para espécies como: *Potamorrhaphis eigenmanni* (Lovejoy e Collete, 2001), o golfinho *Inia geoffrensis* (Banguera-Hinestroza et al., 2002) e a tartaruga gigante do Amazonas *Podocnemis expansa* (Pearse et al., 2006). Para algumas espécies de peixes, as corredeiras têm sido identificadas como barreiras para os eventos migratórios (Goulding, 1979), no entanto, tem sido observado que para os grandes bagres do gênero *Brachyplatystoma* e *Pseudoplatystoma*, não representam uma barreira, da mesma maneira para espécies como *Prochilodus nigricans* (Goulding, 1979) e *Colossoma macropomum* (Farias et al.; 2010), confirmando os resultados obtidos neste estudo.

A estrutura observada além de não estar associada com barreiras físicas, não mostra padrões claros de segregação genética entre tributários e calha, limitando a caracterização do comportamento de *homing* para *B platynemum*. No entanto é evidente a formação de duas unidades populacionais, a primeira formada pelas localidades da calha e o rio Purus, e uma segunda unidade conformada pelas localidades amostradas no rio Madeira, agrupamento que é sustentado pelas análises filogenéticas baseadas nas relações dos haplótipos para os dois marcadores mitocôndrias.

De acordo com a calibração do relógio molecular foi estimado um tempo de divergência entre as populações de aproximadamente 1,5 (taxa estimada com a região controle) e 1,1 (taxa estimada com o Citocromo *b*) milhões de anos (Ma). A estrutura populacional é o resultado de eventos do passado e da influencia ambiental que tem modelado o fluxo gênico contemporâneo (Templenton *et al.*, 1995). Os padrões de diversificação das populações e espécies na região tropical têm sido associados principalmente à influencia das incursões marinhas (Fjeldsâ 1994; Roy *et al.*, 1997; Nores 1999; Hubert e Renno 2006) e dos processos paleogeograficos relacionados com os surgimento dos Andes (Räsänen *et al.*, 1990, 1992; Patton *et al.*, 1994; Hoorn *et al.*, 1995; Patton e Da Silva 1998; Hubert *et al.*, no prelo), que datam principalmente do Mioceno, entretanto a influencia das flutuações climáticas do Pleistoceno, na demografia e variabilidade genética entre populações é pouco explorada (Hubert *et al.*, 2007).

De acordo com o tempo de divergência estimado no presente estudo, a hipótese que provavelmente possa explicar a separação das populações de *Brachyplatystoma platynemum* corresponde à hipótese de refúgios do Pleistoceno, a qual é fundamentada nas mudanças climáticas como força que direcionou diversos processos de divergência (Pickles *et al.*, 2010). Esta teoria prevê que os eventos de esfriamento resultantes dos ciclos de Milankovitch geraram uma redução das chuvas, conduzindo a periódica redução no fluxo dos rios e à contração da floresta tropical (Haffer 1997; Prance 1982; Whitemore e Prance 1987), aproximadamente 1,8 Ma a 11,000 anos. Estes eventos limitaram a quantidade de habitats disponíveis para plantas e animais durante as eras glaciais, no entanto, estas predições são baseadas na biota terrestre, devido a que as mudanças ambientais são menos evidentes nos ecossistemas aquáticos (Hubert *et al.*, 2007).

Na área de estudo, foram identificados dois refúgios do Pleistoceno, o refúgio Beni, localizado na planície perto do flanco andino (cabeceira do rio Madre de Dios), e o refúgio Aripuanã no escudo brasileiro (rio Guaporé, tributário do rio Madeira), que tem sido de grande importância na colonização e diversificação de espécies no alto Amazonas (Hubert *et al.*, 2007).

Estudos filogeográficos realizados recentemente indicam que o alto Amazonas foi colonizado durante os passados 4 Ma, e unicamente durante o último milhão de anos foram colonizados alguns dos tributários (Aleixo 2004; Hubert *et al.*, no prelo), enquanto a topologia atual do rio Madeira foi estabelecida durante os passados 2 Ma (Hubert *et al.*, 2007).

De acordo com a teoria dos refúgios, os dados de divergência obtidos para os filogrupos de *B. platynemum* (1,5-1,0 Ma), assim como o padrão de estrutura genética observado entre o rio Madeira e as localidades da Calha, pode ser explicado pela ação das mudanças climáticas no isolamento de populações desta espécie em áreas próximas às zonas de refúgio. Provavelmente as pressões ambientais causaram fortes reduções populacionais, mais posteriormente quando as pressões foram reduzidas as populações de *B. platynemum* se expandiram e colonizaram o rio Madeira.

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

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

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

A pesar de que a hipótese de refúgios do pleistoceno tenha sido considerada pouco explicativa na alta diversidade taxonômica de peixes neotropicais (Weitzman e Weitzman, 1982; Lundberg *et al.*, 1998), não pode ser descartado a influência das mudanças climáticas no modelamento da diversidade atual, no entanto, múltiplos eventos podem ter contribuído nos padrões atuais de diversificação.

Outra hipótese, que pode contribuir no entendimento da divergência de peixes neotropicais e provavelmente na divergência populacional alopátrica, corresponde à hipótese hidrogeológica relacionada com a estruturação atual da bacia amazônica.

Segundo Montoya-Burgos (2003) a divisão das drenagens, a mudança no curso dos rios e as repetidas incursões e regressões marinhas podem ter produzido muitos eventos vicariantes, promovendo a riqueza biótica atual. Segundo Lundberg (1997) a diversidade de peixes de água doce pode ser o resultado de mudanças paleohidrológicas, que promoveram dispersão seguida por divergência vicariante.

Estudos paleontológicos e biogeográficos sugeriram que a diversificação de peixes até o nível de espécies modernas antecedeu o Pleistoceno (Weitzman e Weitzman 1982; Lundberg 1997), no entanto tempos de divergência menores entre 0,8-2 Ma tem sido descritos entre populações de peixes das bacias do Amazonas e Paraná-Paraguai, para *Pseudoplatystoma* (Torrice *et al.*, 2009).

Neste contexto é provável que eventos paleohidrológicos possam ter contribuído na divergência ao nível populacional, principalmente por eventos de capturas de cabeceira. No entanto os resultados obtidos coincidem com o tempo de estabelecimento da topologia atual do rio Madeira

(2 Ma), tempo durante o qual múltiplos eventos de captura de cabeceira e desconexão entre o alto rio Madeira, o rio Ucayali e o rio Madre de Dios podem ter acontecido, conduzindo a dispersão e posterior isolamento das populações de peixes. Por outro lado, não explicam com total clareza a divergência entre as populações da Calha do Amazonas e o rio Madeira. É pouco provável que a divergência fosse modelada por um evento de captura de cabeceira e posterior desconexão, devido a que indivíduos da espécie *Brachyplatystoma platynemum* não estão associados ao ambiente das áreas altas dos rios, mas não pode ser descartada a hipótese de que um evento deste tipo tenha contribuído na diversificação das populações de *B. platynemum*.

Ao nível paleogeográfico não se tem uma hipótese clara que possa explicar o padrão encontrado. No entanto, para a região Amazônica tem sugerido que processos geológicos como o surgimento dos Andes, são responsáveis pela separação e divergência de populações por eventos vicariantes (Haffer, 1997).

Uma hipótese particular está relacionada com o levantamento de arcos geológicos na região oeste da Amazônia, responsável da alteração do regime de fluxo, separando linhagens de cada lado dos arcos, resultando em divergência vicariante (Hubert e Renno, 2006). Esta hipótese tem sido questionada por Rossetti *et al.* (2005) e Wesselingh e Salo (2006), que sugerem que estas estruturas são extremamente antigas e devido à grande concentração de depósitos sedimentários, a elevação destas não pode ser responsável pelo padrão filogeográfico da maioria dos taxa.

Estudos recentes (Roddaz *et al.*, 2006; Espurt *et al.*, 2007; Regard *et al.*, 2009; Roddaz *et al.*, 2010) tem identificado que o Arco de Fitzcarraldo é uma estrutura geológica recente que data de não antes do Plioceno, e que tem uma importante influência na formação dos rio na Amazônia ocidental (Toivonen *et al.*, 2007). Este arco forma uma drenagem principal dividida (Church, 1901; Dumont, 1996; Espurt *et al.*, 2007; Regard *et al.*, 2009) entre a sub-bacia do Ucayali, a sub-bacia do Acre e a sub-bacia do Madre de Dios, pelo que linhagens irmãs podem ser registradas de cada lado do arco geológico, datando de eventos recentes no Plioceno.

Evidências de divergência genética como consequências destes eventos tem sido registrados para outras espécies animais como a lontra *Ptenoura brasiliensis* (Pickles *et al.*, 2010), para a qual foi identificada uma divergência das linhagens entre o alto Amazonas e o alto rio Madeira de 1,24

MA, tempo similar ao estimado neste estudo, no entanto esta hipótese não explica o padrão de divergência entre as populações de *B. platynemum*. Como foi exposto anteriormente é pouco provável que populações desta espécie tenham colonizado as áreas de cabeceira onde os processos vicariantes com o surgimento do arco de Fitzcarraldo tiveram influencia na divergência das populações. Entretanto um aspecto importante observado nas redes de haplótipos corresponde à conexão dos dois filogrupos por haplótipos registrados na região de Iquitos, indicando que provavelmente as populações apresentaram uma conexão histórica.

De acordo com as hipóteses analisadas, a divergência das populações de *B. platynemum* provavelmente foi modelada, pelas mudanças ambientais durante o pleistoceno no passado, mas o interessante destes resultados é que a estrutura genética tem sido mantida até hoje, como foi sustentado pelos marcadores microssatélites, e que o padrão de variabilidade genética observada não sustenta a hipóteses de *homing*.

Neste contexto como explicar que a população da Calha do Amazonas e a população do rio Madeira não se misturaram neste tempo? Se a espécie *B. platynemum* não apresenta um comportamento de *homing*, como explicar a redução do fluxo gênico entre as localidades da calha e o rio Madeira, entendendo que os indivíduos migrantes fazem uma escolha aleatória dos tributários para reproduzir se e desta forma tem a mesma chance de entrar em qualquer um dos tributários?

O rio Madeira é provavelmente um dos tributários geograficamente mais complexos da bacia amazônica (Torrente-Vilara, 2011) devido a sua complexidade geomorfológica apresentando uma série de aproximadamente 16 rápidos ou corredeiras, que separam a sub-bacia Boliviana da bacia principal do Amazonas (Goulding *et al.*, 2003). As corredeiras representam barreiras na distribuição de peixes e vertebrados aquáticos (Goulding, 1979), sendo considerado como área de segregação de espécies (Patton *et al.*, 2000; Hayes e Sewlal, 2004). Este rio tem sido reconhecido por apresentar uma grande diversidade de habitat aquáticos devido à influencia simultânea do escudo Brasileiro, os sedimentos de planície do terciário e dos Andes (Guyot, 1993), assim os tributários do Madeira variam de acordo com a turbidez e conteúdo de nutrientes, sendo considerados de águas brancas, claras ou pretas (Sioli, 1984).

A heterogeneidade do habitat gerada pelos ciclos anuais de precipitação na bacia do rio Madeira tem sido identificada como um fator fundamental na estrutura genética das populações aquáticas (Hubert *et al.*, 2007).

De acordo com a complexidade estrutural e ecológica presente no rio Madeira, e com os resultados obtidos de divergência genética entre as duas linhagens (filogrupos) de mtDNA de *B platynemum*, a hipótese a nível biológico e ecológico que pode contribuir na compreensão da permanência da estrutura populacional, é fundamentada na migração reprodutiva restrita das populações de *B platynemum* na bacia do rio Madeira.

Esta hipótese é fundamentada na fragmentação das populações pelas mudanças climáticas durante o Pleistoceno. O isolamento das populações, a limitada disponibilidade de habitats e as difíceis condições ambientais, provavelmente tiveram fortes efeitos no tamanho populacional, e como consequência, a ação de forças evolutivas como a deriva genética posso conduzir a um aumento nas diferenças das frequências alélicas entre as subpopulações. A redução da variação genética e o aumento das diferenças genéticas, levou ao isolamento genético entre populações, onde os haplótipos que surgiram após a fragmentação, mas no mesmo isolado, apresentaram distribuições espaciais restritas (Templeton, 2011).

Posteriormente eventos de expansão populacional, permitiram neste caso à população do rio Madeira, expandir-se nesta bacia adaptando se às condições ambientais, e o baixo fluxo gênico com as localidades da calha, facilitou à fixação de alelos. Processos de diferenciação fenotípica entre a população do rio Madeira e a população da Calha não podem ser descartados, mas requerem ser confirmados.

É provável que o acasalamento preferencial entre os indivíduos da população residente no rio Madeira possa explicar a forte estrutura genética observada, esta hipótese também é fundamentada na evidencia de não isolamento por distancia entre as populações e pelos baixos valores para o numero de migrantes registrados entre as localidades da calha e o rio Madeira. Neste sentido provavelmente indivíduos distribuídos na calha entrem no rio Madeira mais tenham uma reprodução pequena com a população residente, mantendo assim a estrutura populacional observada, no entanto não pode ser descartada a presença de barreiras químicas na área da jusante do rio Madeira, que dificultem a entrada de indivíduos na bacia do rio Madeira.

Embora não se tenham estudos específicos dos padrões reprodutivos para *B platynemum* é provável que a população residente desta espécie no rio Madeira, siga o padrão de migração reprodutiva descrito por Barthem e Goulding (1997), onde indivíduos dos tributários migram rio abaixo para desovar nas águas do canal principal do rio Madeira, e posteriormente as larvas e ovos são levados à áreas de várzea dispersando-se na floresta inundada onde permanecem alimentando se por cerca de 4 a 5 meses. A população do rio Madeira tem uma área de alimentação própria, pelo que indivíduos provavelmente realizam curtas migrações reprodutivas dentro desta bacia, enquanto à população da calha provavelmente dispõe de diferentes áreas de alimentação ao longo da bacia amazônica que não só incluem o estuário mas também à região entre o alto Amazonas e baixo Solimões (Barthem e Goulding, 1997; Barthem e Goulding, 2007; Leite *et al.*, 2007) o que pode explicar a alta variabilidade genética para as localidades de Iquitos e rio Purus.

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

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

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

Para o planejamento e conservação de uma espécie é importante a identificação das linhagens com significado evolutivo para manter ao máximo a diversidade genética e incorporar informação relacionada com os processos históricos populacionais (Moritz, 1998). Análises filogeográficas constituem uma ferramenta importante na biologia da conservação; a idéia de propor

políticas de conservação a nível intraespecíficos constitui uma forma de identificar unidades de manejo que refletem a importância evolutiva das linhagens dentro das espécies, e com esta informação elaborar programas efetivos para a conservação de espécies em risco (Awise e Hamrick, 1996).

Definir uma área de conservação para *Brachyplatystoma platyneum* é uma tarefa difícil. Ainda que a informação obtida neste estudo constitua um ponto de partida, se requer informações adicionais ao nível biológico, ecológico, comportamental e de monitoramento pesqueiro; aspetos que são desconhecidos até o momento. No entanto, considerando a estrutura genética identificada para *B. platyneum* na área de estudo e a redução da variabilidade genética na região do rio Madeira, se considera de grande importância a implementação de medidas de conservação e recuperação de habitat nesta zona, principalmente das áreas de várzea.

O rio Madeira é um dos principais tributários de águas brancas do Amazonas, a geomorfologia diferencial de sua bacia, apresentando uma serie de rápidos e a presença de tributários de diferentes tipos de águas é indicativa de uma alta heterogeneidade de habitats que abriga uma rica biodiversidade, importante na manutenção da variabilidade genética não só da espécie em estudo mais também do resto de espécies cujo ciclo de vida esta intimamente ligada aos canais principais dos rios (Santos e Ferreira 1999). No entanto a construção de barragens nesta bacia pode ter fortes impactos na biota aquática e terrestre, devido principalmente à modificação dos regimes de fluxo, a perda de habitats, à mudança dos parâmetros físicos e químicos da água (Vannote *et al.*, 1980; Junk *et al.*, 1989) e principalmente ao bloqueio das rotas de migração de diversas espécies de peixes (Barthem *et al.*, 1991; MacAllister *et al.*, 2001).

De acordo com os resultados neste estudo a população residente de *B. platyneum* na bacia do rio Madeira, pode ser fortemente afetada pela fragmentação do habitat e a interrupção do processo de migração como consequências das barragens, gerando fortes impactos na sobrevivência da população e na manutenção da variabilidade genética das populações, devido às mudanças nos padrões de reprodução e porém do fluxo gênico.

De acordo com esta informação se sugere uma avaliação profunda do estado da população desta espécie na bacia do rio Madeira, assim como da efetividade do sistema de transposição de

peixes construído pelas empresas responsáveis do funcionamento das barragens, para garantir a subsistência da população do rio Madeira, além de dirigir esforços na conservação das áreas de alimentação na calha principal do rio Amazonas, devido a que esta constitui o hábitat preferencial não só da espécie de estudo mas, provavelmente, de incontáveis espécies de peixes.

## 6. Conclusões gerais

- Os marcadores mitocôndrias e nucleares utilizados para determinar a distribuição espacial da variação genética de *Brachyplatystoma platynemum*, apresentaram padrões similares, indicando uma forte estruturação genética entre as localidades amostradas no rio Madeira e as localidades da calha principal do eixo Amazonas-Solimões e rio Purus.
- A estrutura populacional observada para *B. platynemum* além de não estar associada com barreiras físicas (corredeiras presentes no rio Madeira), não apresenta padrões claros de segregação genética entre os tributários avaliados e a calha principal, o que inviabiliza a caracterização do comportamento de *homing* para esta espécie.
- Análises filogenéticas baseadas nas relações dos haplótipos para os dois marcadores mitocôndrias permitiram identificar dois filogrupos para *Brachyplatystoma platynemum* na área estudada que, de acordo com a calibração do relógio molecular, divergiram aproximadamente entre 1,5 e 1,1 milhões de anos (Ma).
- O padrão de estrutura genética observado e o tempo de divergência obtido para os filogrupos de *B. platynemum*, pode ser explicado pela ação das mudanças climáticas no isolamento de populações desta espécie em áreas próximas às zonas de refúgio durante o Pleistoceno, no entanto eventos paleohidrográficos e paleogeográficos podem ter contribuído de forma indireta nesta divergência.
- A manutenção da estrutura populacional de *B. platynemum* provavelmente esta associada a processos de migração reprodutiva restrita e ao acasalamento preferencial da população residente na bacia do rio Madeira; premissa fundamentada na evidencia de não isolamento por distancia entre as populações e pelos baixos valores para o numero de migrantes registrados.
- Considerando a estrutura genética identificada para *Brachyplatystoma platynemum* na área de estudo e a redução da variabilidade genética na região do rio Madeira, é de grande importância a implementação de medidas de conservação e recuperação de habitat neste rio,

principalmente das áreas de várzea que correspondem a áreas de alimentação das populações residentes.

## 7. Referências bibliográficas

- Aleixo, A. 2004. Historical diversification of a terra-firme forest bird superspecies: a phylogeographic perspective on the role of different hypotheses of Amazonian diversification. *Evolution*, 58, 1303–1317.
- Aljanabi, S.M and Martinez, I. 1997. Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. *Nucleic Acid. Res.* 25(22): 4692-4693.
- Anderson, T. J. C; Komuniecki, R; Komuniecki, P. R and Jaenike, J. 1995. Are mitochondria paternally inherited in *Ascaris*? *Int. J. Parasitol.*, 25: 1001-1004.
- Aquadro, C.F and Greenberg, B.D. 1983. Human mitochondrial DNA variation and evolution: Analysis of nucleotide sequences from seven individuals. *Genetics*, 103:287-312.
- Arbogast, B. S. and Kenagy, G. J, 2001. Comparative phylogeography as an integrative approach to historical biogeography. *Journal of Biogeography*, 28: 819–825.
- Avise, J.C. 1986. Mitochondrial DNA and the evolutionary genetics of higher animals. *Phil. Trans. Soc. Lond. B* 3f2: 325-342.
- Avise, J. C; Arnold, J; Ball, R. M. Jr; Bermingham, E; Lamb, T; Neigel, J. E.; Reeb; C. A and Saunders, N. C. 1987. Intraspecific phylogeography: The mitochondrial DNA bridge between population genetic and systematics. *Annu. Rev. Ecol. Syst.*, 18: 489-522.
- Avise, J.C., Hamrick, J.L. 1996. Conservation genetics. Case histories from nature. Chapman & Hall, New York, 512 p.
- Avise, J. C. 2000. *Phylogeography: The history and formation of species*. Harvard University Press, Londres.
- Avise, 2009. Retrospect and prospect. *Journal of Biogeography* :36, 3–15.
- Ayala, F.J. 1995. The myth of eve: Molecular biology and human origins. *Science* 270:1930-1936.
- Ayala, F.J; Escalante, A; O’Huigin, C and Klein, J.1994. Molecular genetics os speciation and human origins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:678-6794

- Balloux F and Goudet J. 2001. Statistical properties of differentiation estimators under stepwise mutations in a finite island model. *Molecular Ecology*.
- Balloux, F. and Lugon-Moulin, N. 2002. The estimation of population differentiation with microsatellite markers. *Molecular Ecology* 11: 155–165.
- Banguera-Hinestroza, E; Cárdenas, H; Ruiz-García, M; Marmontel, M; Gaitán, E; Vázquez, R and García-Vallejo, F. 2002. Molecular identification of evolutionarily significant units in the Amazon River dolphin *Inia* sp. (Cetacea: Iniidae). *J.Hered.* 93, 312–322.
- Banks, M.A; Blouin, M.S; Baldwin, B.A; Rashbrook, V.K.; Fitzgerald, H.A.; Blankenship, S.M and Hedgecock, D. 1999. Isolation and inheritance of novel microsatellites in chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). *J. Heredity* 90, 281 – 288.
- Barthem, R and Goulding, M. 1997. Os Bagres Balizadores: Ecologia, Migração e Conservação de Peixes Amazônicos. Sociedade Civil Mamirauá, MCT - CNPq, IPAAM. Brasília, Brazil. 140 pp.
- Barthem, R.B and Goulding, M. 2007. An unexpected ecosystem: the Amazon revealed by the fisheries. Gráfica Biblos, Lima. Botanical Garden Press. Missouri. 241 pp.
- Batalha, K.P. 2009. Genética populacional do jaraqui de escama grossa (*Semaprochilodus insignis* Prochilodontidae, Characiformes). Dissertação de Mestrado, UFAM, Manaus, 57 pp.
- Batista, JS and Alves-Gomez, JA. 2006. Phylogeography of *Brachyplatystoma rousseauxii* (Siluriformes - Pimelodidae) in the Amazon Basin offers preliminary evidence for the first case of “homing” for an Amazonian migratory catfish. *Genetic and Molecular Research*. 5 (4): 723-740.
- Batista,JS. 2010. Caracterização genética da dourada - *Brachyplatystoma rousseauxii*, Castelnau, 1855 (Siluriformes-Pimelodidae) na Amazônia por meio de marcadores moleculares mitocondriais e microssatélites: subsídios para conservação e manejo/ Jacqueline da Silva Batista. Manaus: [s.n.], 2010. Tese de doutorado. INPA. Manaus.
- Beheregaray, L. 2008. Twenty years of phylogeography: the state of the field and the challenges for the Southern Hemisphere. *Molecular Ecology*. 17: 3754–3774.
- Bell, G.I and Jurka, J. 1997. The length distribution of perfect dimer repetitive DNA is consistent with its evolution by an unbiased single-step mutation process. *J. Mol. Evol.* 44:414–421.
- Bermingham, E and Martin, AP. 1998. Comparative mtDNA phylogeography of neotropical freshwater fishes: testing shared history to infer the evolutionary landscape of lower Central America. *Molecular Ecology*, 7, 499–517.
- Brookfield, JFY.1996. A simple new method for estimating null allele frequency from heterozygote deficiency. *Molecular Ecology* ,5: 453–455.

- Brown, W.M; George, M.Jr and Wilson, A.C. 1979. Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. Proc. Natl. Acad. Sci., 76: 1967-1971.
- Brown, WM and Wright, JW. 1975. Mitochondrial DNA and the origin of parthenogenesis in whiptail lizard (*Cnemidophorus*). Herpetological Review, 6, 70-71.
- Brown, W. M; Prager, E.M; Wang, A and Wilson, A.C. 1982. Mitochondrial DNA sequences of primates: tempo and mode of evolution. J. Mol. Evol.225-239.
- Calcagnotto, D. and Toledo-Filho, S. 2000. Loss of genetic variability at the transferrin locus in five hatchery stocks of tambaqui (*Colossoma macropomum*). Genetics and Molecular Biology. Vol.23 (1): pp. 127-130.
- Callen, D.F; Thompson, A.D; Shen, Y; Phillips, A.H; Richards, R.I; Mulley, J.C and Sutherland, G.R. 1993. Incidence of null alleles in the (AC)<sub>n</sub> microsatellite markers. Am. J. Hum. Genet. 52, 922 – 927
- Carrillo-Avila, M; Resende, E; Marques, D and Galetti, P. 2009. Isolation and characterization of polymorphic microsatellites in the threatened catfish Jaú, Zungaro jahu (Siluriformes, Pimelodidae). Conservation Genetics, 10: 1597-1599.
- Carvalho, G.R. 1993. Evolutionary aspects of fish distribution: genetic variability and adaptation. J. Fish Biol. 43, 53-73.
- Cavalli-Sforza, L.L; Menozzi, P and Piazza, A. 1994 .The history and geography of human genes. Princeton University Press, Princeton.
- Church, G.E. 1901. South America: An Outline of Its Physical Geography. The Geographical Journal, 17, 333-406.
- Council, N.R. 1996. Upstream: salmon and society in the pacific Northwest. Washington, DC. National academy.
- De Pinna, M. 1998. Phylogenetic relationships of Neotropical Siluriformes (Teleostei: Ostariophysi):Historical overview and synthesis of hypothesis. 3: 279-330, in: Malabarba, L.R., Reis, R.P., Lucena, Z.M. &Lucena, C.A.S. (eds.), Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes. Porto Alegre, Edipucrs, 603p.
- Densmore, L.D; Moritz, C.C; Wright, J.W and Brown, W.M.1989. Mitochondrial DNA analyses and the origin and relative age of parthenogenetic and bisexual lizards (Genus *Cnemidophorus*). Genetics 110: 689-707.
- Donaldson, K.A and Wilson Jr., R.R. 1999. Amphi-Panamic germinates of snook (Percoidei: Centropomidae) provide a calibration of the divergence rate in the mitochondrial DNA control region of fishes. Mol. Phylogenet. Evol. 13, 208–213.
- Drummond AJ, Ho S, Phillips and Rambaut, M. 2006. A: Relaxed phylogenetics and dating with confidence. PLoS Biology 2006, 4:e88.

- Drummond , A.J and Rambaut, A. 2007. BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC Evolutionary Biology* 2007, 7:214.
- Dumont, J.F. 1996. Neotectonics of the Subandes-Brazilian craton boundary using geomorphological data: The Marañon and Beni basins. *Tectonophysics* 259:137–151.
- Ellegren, H. 2000. Microsatellite mutations in the germline: implications for evolutionary inference. *Trends Genet.* 16:551–558.
- Echelle, A.A; Dowling, T.E; Moritz, C.C and Brwon, W.M. 1989. Mitochondrial DNA diversity and the origin of the *Menidia clarkhubbsi* complex of unisexual fishes (Atherinidae). *Evolution* 43:984-993.
- Esguícero, L.H and Arcifa, M. S. (in press). Fragmentation of a Neotropical migratory fish population by a century-old dam. *Hydrobiologia*. DOI 10.1007/s10750-009-0008-2.
- Esposti, DM; De Vries, S; Crimi, M; Ghelli, A; Patarnello, T and Meyer, A. 1993. Mitochondrial cytochrome b: evolution and structure of the protein. *Biochim Biophys Acta* 1143:243–271.
- Espurt, N; Baby, P; Brusset, S; Roddaz, M; Hermoza, W; Regard, V; Antoine, P.-O; Salas-Gismondi, R and Bolanos, R. 2007. How does the Nazca Ridge subduction influence the modern Amazonian foreland basin?. *Geology* 35: 515–518.
- Evanno, G; Regnaut, S and Goudet, J. 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular Ecology* 14:2611-2620
- Excoffier, L.; Smouse, P.E and Quattro, J.M. 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: Application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics*, 131: 479-491.
- Excoffier, L; Laval, G and Schneider, S. 2005. Arlequin ver. 3.1: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online*, 1: 47-50.
- Fabré N and Borges R, organizadores –, 2005. Coleção Documentos Técnicos: Estudos Estratégicos I Manaus: Ibama, ProVárzea
- Falush, D.; Stephens, M.; Pritchard, J.K. 2003. Inference of Population Structure Using Multilocus Genotype Data: Linked Loci and Correlated Allele Frequencies. *Genetics*, 164: 1567-1587
- FAO-COPESCAL. 2000. Inform del taller regional sobre el manejo de las pesquerías de bagres migratorios del Amazonas (Iquitos - Perú). Page 103. Informe de campo F-5: Comisión de pesca continental para América Latina. FAO, Roma.
- Farias, I; Ortı, G; Sampaio, I; Schneider, H and Meyer, A. 2001. The Cytochrome b Gene as a Phylogenetic Marker: The Limits of Resolution for Analyzing Relationships Among Cichlid Fishes. *J Mol Evol.* 53:89–103.

- Farias, I.P and Hrbek, T. 2008. Patterns of diversification in discus fishes (*Symphysodon* spp. Cichlidae) of the Amazon basin. . *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 49: 32-43.
- Farias, I; Torrico, J; García, C; Freitas, M; Hrbek, T and Renno, J . 2010. Are rapids a barrier for floodplain fishes of the Amazon basin? A demographic study of the keystone floodplain species *Colossoma macropomum* (Teleostei: Characiformes). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 56: 1129–1135.
- Ferreira, M.E and Grattapaglia, D. 1998. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. Embrapa. Brasília.
- Fjeldså, J. 1994. Geographical patterns for relict and young species of birds in Africa and South America and implications for conservation priorities. *Biodivers. Conserv.* 3: 207–226.
- Formiga-Aquino, K. 2004. Variabilidade genética da piramutaba - *Brachyplatystoma vaillantii* (Velenciennes, 1840) (Siluriformes - Pimelodidae) no sistema Estuário-Amazonas-Solimões. Mestrado, CPBA, INPA/UA, Manaus, 73 pp.
- Freeland, J. R. 2005. *Molecular ecology*. John Wiley & Sons, England.
- Fu, Y.X. 1997. Statistical Tests of Neutrality of Mutations Against Population Growth, Hitchhiking and Background Selection. *Genetics*, 147: 915-925.
- Galetti, E.S. 2009. Distribuição da variabilidade genética da pescada, *Plagioscion squamosissimus* (Heckel, 1840) na calha do Rio Amazonas. Dissertação de Mestrado, INPA, Manaus, 67 pp.
- Gillespie, J. H. 1986. Variability of evolutionary rates of DNA. *Genetics*, 113: 1077-1091.
- Torrente-Vilara, G; Zuanon, J; Leprieur, F; Oberdorff, T and Tedesco, P. 2011. Effects of natural rapids and waterfalls on fish assemblage structure in the Madeira River (Amazon Basin). *Ecology of Freshwater Fish*.
- Goldstein, D.B. and Schlotterer, C. 1999. *Microsatellites: Evolution and applications*. Oxford. New York
- Goulding, M. 1979. *Ecologia de Pesca do Rio Madeira*. INPA, Manaus, Brazil.
- Goulding, M. 1980. *The Fishes and the Forest. Explorations in Amazonian Natural History*. Berkeley, CA: University of California Press.
- Goulding, M; Barthem, R.B; Ferreira, E.J.G. 2003. *The Smithsonian Atlas of the Amazon*. Smithsonian Institution Press, Washington, DC.
- Guyot, J.L. 1993. *Hydrogéochimie des Fleuves de l'Amazonie Bolivienne*. Editions de l'ORSTOM, Collection Etudes et Thèses, Paris.
- Haffer, J. 1997. Alternative models of vertebrate speciation in Amazonia: an overview. *Biodiversity and Conservation* 6: 451–476

- Hall, T.A. 1999. Bio Edit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Res.*, 27: 95-98.
- Hardy, M. E; Grady, J. M. and Routman, E. J. 2002. Intraspecific phylogeography of the slender madtom: the complex evolutionary history of the Central Highlands of United States. *Molecular Ecology*, 11: 2393–2403.
- Hauge, X.Y. and Litt, M. 1993. *Human Molecular. Genetics*, 2, 411–415.
- Hayes, F.E. and Sewlal, J.N. 2004. The Amazon Rivers as a dispersal barrier to passerine birds: effects of river width, habitat and taxonomy. *Journal of Biogeography* 31: 1809–1818.
- Hoorn, C; Guerrero, J; Sarmiento, G.A; Lorente, M.A. 1995. Andean tectonics as a cause for changing drainage patterns in Miocene northern South America. *Geology*, 23, 237–240.
- Hrbek, T; Larson, A. 1999. The evolution of diapause in the killifish family Rivulidae (Atherinomorpha, Cyprinodontiformes): a molecular phylogenetic and biogeographic perspective. *Evolution*, 53, 1200–1216.
- Hrbek, T; Crossa, M; Farias, I.P. 2007. Conservation strategies for *Arapaima gigas* (Schinz, 1822) and the Amazonian várzea ecosystem. *Brazilian Journal of Biology*, 67: 909-917.
- Hubert, N and Renno, J.-F. 2006. Historical biogeography of South American freshwater fishes. *J. Biogeogr.* 33, 1414–1436.
- Hubert, N; Duponchelle, F; Nuñez-Rivera, JR; Bonhomme, F and Renno, J.N. 2007. Isolation by distance and Pleistocene expansion of the lowland populations of the white piranha *Serrasalmus rhombeus*. *Molecular Ecology* (2007) 16, 2488–2503.
- Huergo, G.M. 2009. Estimativa da diversidade genética da piraíba (*Brachyplatystoma filamentosum* Lichtenstein, 1919) e da piraíba negra (*B. capapretum* Lundberg & Akama, 2005), na Amazônia brasileira, inferidas através de DNA mitocondrial: subsídio para manejo e conservação. Tese de Doutorado, BADPI, INPA, Manaus, 114 pp.
- Junk, W.J; Bayley, P.B; Sparks, R.E. 1989. The Flood Pulse Concept In River Floodplain Systems. In: Doge, D.P.(Ed.). *Proc. Int. Large River Symp (Lars) – Can. Spec. Publ. Fish. Aquat. Sci.*, 106: 110-127.
- Kalinowski, S.T. (2004). Counting alleles with rarefaction: private alleles and hierarchical sampling designs. *Conserv. Genetics* 5: 539-543.
- Keeney, D.B; Heupel, M.R; Hueter, R.E and Heist, E.J. 2005. Microsatellite and mitochondrial DNA analyses of the genetic structure of blacktip shark (*Carcharhinus limbatus*) nurseries in the northwestern Atlantic, Gulf of Mexico, and Caribbean Sea. *Mol. Ecol.*, 14: 1911–1923.
- Kimura, M and Crow, J.F. 1964. The number of alleles that can be maintained in a finite population. *Genetics* 49, 725–738.

- Kimura, M and Ohta, T. 1978. Stepwise mutational model and distribution of allelic frequencies in a finite population. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 75, 2868–2872.
- Laikre, L; Palm, S. and Ryman, N. 2005. Genetic population structure of fishes: implications for coastal zone management. *Ambio* 34(2): 111-119.
- Lanteri, A and Confalonieri, V. 2000. Filogeografía: objetivos, métodos y ejemplos. In: Una perspectiva latinoamericana de la biogeografía: 185–194 (J. J. Morrone & J. Llorente, Eds.). CONABIO, México.
- Leite, R.G; Cañas, C; Forsberg, B; Barthem, R.B and Goulding, M. 2007. Larvas dos Grandes Bagres Migradores. Lima, Peru. 127 pp.
- Leggett, W.C. 1977. The ecology of fish migration. *Annual Review of Ecology and Systematics* 8:285-308.
- Lévêque, C; Oberdorff, T; Paugy, D; Stiassny, M.L.J and Tedesco, P.A. 2008. Global diversity of fish (Pisces) in freshwater. *Hydrobiologia*: 545–567.
- Li, W.H and Graur, D. 1991. *Fundamentals of Molecular Evolution*. Sinauer Associates. Sunderland, Massachusetts.
- Li, W.H. 1997. *Molecular Evolution*. Sinauer Associates, Inc., Sunderland, MA.
- Li, W.-H., and Sadler, L. 1992. DNA variation in humans and its implication for human evolution. *Oxf. Surv. Evol. Biol.* 8:111–134.
- Librado, P and Rozas, J. 2009. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*, 25: 1451-1452.
- Lovejoy, NR and De Araújo, MLG .2000. Molecular systematics, biogeography and population structure of Neotropical freshwater needle fishes of the genus *Potamorhaphis*. *Molecular Ecology*, 9, 259–268.
- Lovejoy, N.R and Collette, B.B. 2001. Phylogenetic relationships of New World needlefishes (Teleostei: Belontiidae) and the biogeography of transitions between marine and freshwater habitats. *Copeia*, 324-338.
- Lundberg, JG. 1993. African–South American freshwater fish clades and continental drift: problems with a paradigm. In: *Biological Relationships Between Africa and South America* (ed. Goldblatt P), pp. 156–199. Yale University Press, New Haven, CT.
- Lundberg, JG . 1997. Fishes of the La Venta fauna: additional taxa, biotic and paleoenvironmental implications. In: *Vertebrate Paleontology in the Neotropics: the Miocene Fauna of la Venta Colombia* (eds Kay RF, Madden RH, Cifelli RL, Flynn JJ), pp. 67–91. Smithsonian Institution Press, Washington, DC.

- Lundberg, J.G; Marshall, L.G; Guerrero, J; Horton, B; Malabarba, M.C and Wesselingh, F. 1998. The Stage for Neotropical Fish Diversification: A History of Tropical South American Rivers. In: Malabarba, L.R.; Reis, R.E.; Vari, R.P.; Lucena, C.A.S.; Lucena, Z.M.S., (Eds.), *Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes*. Museu de Ciências e Tecnologia, PUCRS. Porto Alegre. pp. 13-48.
- Lundberg, J and Littmann, M.W. 2003. Family Pimelodidae: Long-Whiskered catfishes. In: Reis, R.E.; Kulander, S.O.; Ferraris, C.J., (Eds.), *Check list of the freshwater fishes of south and central America*. Porto Alegre-RS. pp. 432-446.
- Lundberg, J.G and Akama, A. 2005. *Brachyplatystoma capapretum*: a New Species of Goliath Catfish from the Amazon Basin, with a Reclassification of Allied Catfishes (Siluriformes: Pimelodidae). *Copeia*, 2005: 492-516.
- Machado, V.N. 2009. Análise da variabilidade genética da curimatã *Prochilodus nigricans* (Agassiz, 1829) na calha do rio Amazonas e seus principais tributários. Mestrado, UFAM, Manaus.
- Mantel, N. 1967. The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Research*, 27: 209-220.
- Martin AP and Bermingham, E. 2000. Regional endemism and cryptic species revealed by molecular and morphological analysis of a widespread species of Neotropical catfish. *Proceedings of the Royal Society of London, B Biological Sciences*, 267, 1135–1141.
- McAllister, M.K.; Pikitch, E.K and Babcock, E. A. 2001. Using demographic methods to construct Bayesian priors for the intrinsic rate of increase in the Schaefer model and implications for stock rebuilding. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 58: 1871e1890.
- McCouch, S.R; Chen, X; Panaud, O; Temnykh, S; Xu, Y; Cho, Y.G; Huang, N; Ishii, T; Blair, M. 1997. Microsatellite marker development, mapping and applications in rice genetics and breeding. *Plant Molecular Biology*, 35: 89-99.
- Metzgar, D; Bytof, J; Wills, C. 2000. Selection against frameshift mutations limits microsatellite expansion in coding DNA. *Genome Res.* 10, 72–80.
- Meyer, A. 1993. Evolution of mitochondrial DNA in fishes. In: Hochachka, Mommsen (eds) *Biochemistry and molecular biology of fishes*, vol. 2. Elsevier, Amsterdam, pp. 1–38
- Meyer, A. 1994. Shortcomings of the cytochrome b gene as a molecular marker. *Trend Ecol Evol* 9(8):278–280.
- Michalakis, Y and Excoffier, L. 1996. A Generic Estimation of Population Subdivision Using Distances Between Alleles With Special Reference for Microsatellite Loci. *Genetics*, 142: 1061-1064.
- Moeser, A. A. and Bermingham, E. 2005. Isolation and characterization of eight microsatellite loci for the Neotropical freshwater catfish *Pimelodella chagresi* (Teleostei: Pimelodidae). *Molecular Ecology Notes*, 5(2): 363-365.

- Montoya-Burgos, J.I. 2003. Historical biogeography of the catfish genus *Hypostomus* (Siluriformes: Loricariidae), with implications on the diversification of Neotropical ichthyofauna *Molecular Ecology* (2003) 12, 1855–1867.
- Moritz, C.C. 1991. The origin and evolution of parthenogenesis in *Heteronotia binoei* (Gekkonidae): Evidence for recent and localized origins of widespread clones. *Genetics* 129:211-219.
- Moritz, C.C. and Heideman, A. 1993. The origin and evolution of parthenogenesis in *Heteronotia binoei* (Gekkonidae): Reciprocal origins and diverse mitochondrial DNA in western populations. *Syst.Biol.* 129:211-219.
- Moritz, C and Faith, D. 1998. Comparative phylogeography and the identification of genetically divergent areas for conservation. *Molecular Ecology* 7:419-429.
- Nedbal, M. A and Flynn, J. J. 1998. Do the combined effects of the asymmetric process of replication and DNA damage from oxygen radicals produce a mutation-rate signature in the mitochondrial genome? *Mol. Biol. Evol.* 15: 219–223.
- Ngamsiri, T; Ohashi, Y; Sukumasavin, N; Nakajima, M; Na-Nakorn, U and Taniguchi, N. 2006. Characterization of microsatellite DNA markers in a critically endangered species, Mekong giant catfish, *Pangasianodon gigas*. *Molecular Ecology Notes*, 6: 313-315.
- Nelson, J.S. 2006. *Fishes of the world*. John Wiley & Sons, New York
- Nei, M. 1985. Human evolution at the molecular level. Pp. 41-64 in: Ohta, T and Aoki, K, eds. *Population genetics and molecular evolution*. Japan Scientific Societies, Tokyo.
- Nores, M. 1999. An alternative hypothesis for the origin of Amazonian bird diversity. *J. Biogeogr.* 26, 475–485
- Patton, J.L; Da Silva MNF and Malcolm JR .1994. Gene genealogy and differentiation among arboreal spiny rats (Rodentia: Echimyidae) of the Amazon basin: a test of the riverine barrier hypothesis. *Evolution*, 48, 1314–1323.
- Patton, J.L and Da Silva, MNF. 1998. Rivers, refuges and ridges: the geography of speciation of Amazonian mammals. In: *Endless Forms: Species and Speciation* (eds Berlocher S, Howard D), pp. 202–216. Oxford University Press, New York.
- Patton, J.L; Silva, M.N.F and Malcolm, J.R. 2000. Mammals of the Rio Jurua' and the evolutionary and ecological diversification of Amazonia. *Bulletin of American Museum of Natural History* 44: 1–305.
- Pearse, D.E; Arndt, A.D; Valenzuela, N; Miller, B.A; Cantarelli, V.H and Sites Jr., J.W., 2006. Estimating population structure under nonequilibrium conditions in a conservation context: continent-wide population genetics of the giant Amazon River turtle, *Podocnemis expansa* (Chelonia; Podocnemididae). *Mol. Ecol.* 15, 985–1006.

- Perdices, A; Bermingham, E; Montilla, A and Doadrio, I. 2002. Evolutionary history of the genus *Rhamdia* (Teleostei: Pimelodidae) in Central America. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 25:172–189.
- Pereira, L.H.G; Foresti, F and Oliveira, C. 2009. Genetic structure of the migratory catfish *Pseudoplatystoma corruscans* (Siluriformes: Pimelodidae) suggests homing behavior. *Ecol. Freshwater Fish* 18: 215–225.
- Petrere, M; Barthem, R; Cordoba, E and Gomez, B. 2004. Review of the large catfish fisheries in the upper Amazon and the stock depletion of piraiba (*Brachyplatystoma filamentosum* Lichtenstein). *Rev. Fish. Biol. Fish.*, 14: 403-414.
- Pickles, R; Groombridge, J; Zambrana, V; Van Damme, P; Gottelli, D; Kundu, S; Bodmer, R; Ariani, C and Iyengar, A . 2011. Evolutionary history and identification of conservation units in the giant otter, *Pteronura brasiliensis*. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 61:616–627.
- Porto, J.I.R. 1999. Análise cariotípica e sequenciamento de mtDNA de populações de *Mylesinus paraschomburgkii* (Characiformes, Serrasalminidae) da Bacia Amazônica. Tese de Doutorado, INPA, Manaus.
- Prance, GT . 1982. *Biological Diversification in the Tropics*. Columbia University Press, New York
- Peakall, R.; Smouse, P.E. 2006. genalex 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes*, 6: 288-295.
- Pritchard, J.K.; Stephens, M and Donnelly, P. 2000. Inference of Population Structure Using Multilocus Genotype Data. *Genetics*, 155: 945-959.
- Rand, D. M. and Kann, L.M. 1998. Mutation and selection at silent and replacement sites in the evolution of animal mitochondrial DNA. *Genetica* 102/103:393-407
- Räsänen, ME; Salo, JS; Jungnert, H and Pittman, LR . 1990. Evolution of the western Amazon lowland relief: impact of Andean foreland dynamics. *Terra Nova*, 2, 320–332.
- Räsänen, M; Neller, R; Salo, JS and Jungner, H . 1992. Recent and ancient fluvial deposition systems in the Amazonian foreland basin. *Peru. Geological Magazine*, 129, 293–306.
- Raymond, M and Rousset, F. 1995. GENEPOP (Version 1.2): Population Genetics Software for Exact Tests and Ecumenicism. *J Hered*, 86: 248-249.
- Regard, V; Lagnous, R; Espurt, N; Darrozes, J; Baby, P; Roddaz, M; Calderon, Y and Hermoza, W.2009. Geomorphic evidence for recent uplift of the Fitzcarrald Arch (Peru): a response to the Nazca Ridge subduction. *Geomorphology* 107,107–117.
- Renno, JF; Berrebi, P; Boujard, T and Guyomard, R. 1990. Intraspecific genetic differentiation of *Leporinus friderici* (Anostomidae, Pisces) in French Guiana and Brazil: a genetic approach to the refuge theory. *Journal of Fish Biology*, 36, 85–95.

- Renno, JF; Machordom, A; Blanquer, A and Boursot, P. 1991. Polymorphism of mitochondrial genes in populations of *Leporinus friderici* (Bloch, 1974): intraspecific structure and zoogeography of the Neotropical fish. *Genetica*, 84, 137–142.
- Renno, J; García, C; Duponchelle, F and Nuñez, J . 2005. *Biología de las Poblaciones de Peces de la Amazonía y Piscicultura. Comunicaciones del Primer Coloquio Internacional de la Red de Investigación sobre la Ictiofauna Amazónica, Iquitos, Perú.*
- Renno, JF; Hubert, N and Torrico, JP . 2006. Phylogeography of *Cichla* (Cichlidae) in the upper Madera basin (Bolivian Amazon). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 41, 503–510.
- Rice, W.R. 1989. Analyzing tables of statistical tests. *Evolution*, 43: 223-225.
- Richter, C. 1992. Reactive oxygen and DNA damage in mitochondria. *Mutation research DNAing*. Volume 275, 249–255.
- Rocha-Olivares A; Rosenblatt, RH and Vetter, RD. 1999. Molecular evolution, systematics, and zoogeography of the rockfish subgenus *Sebastomus* (*Sebastes*, Scorpaenidae) based on mitochondrial cytochrome b and control region sequences. *Mol Phy Evol* 11(3):441–458.
- Roddaz, M; Brusset, S; Baby, P and Herail, G. 2006. Miocene tidal-influenced sedimentation to continental Pliocene sedimentation in the forebulge–backbulge depozones of the Beni–Mamore foreland Basin (northern Bolivia). *Journal of South American Earth Sciences* 20: 351–368.
- Roddaz, M; Hermoza, W; Mora, A; Baby, P; Parra, M; Christophoul, F; Brusset, S and Espurt, N. 2010. Cenozoic sedimentary evolution of the Amazonian foreland basin system. In: Hoorn, C., Wesselingh, F. (Eds.), *Amazonia, Landscape and Species Evolution: A Look at the Past*. Wiley-Blackwell, Oxford, pp. 61–88.
- Rodriguez de Souza, 2008. Filogeografia do gênero neotropical *Fluviphylax* (CYPRINODONTIFORMES: POECILIIDAE) das bacias do Amazonas e do Orinoco. Teses de mestrado. Programa Integral de Pós-Graduação em biologia tropical e Recursos Naturais. INPA. Manaus.
- Rodrigues, F; Farias, I; Batista, J; Alves-Gomes, J. 2009. Isolation and characterization of microsatellites loci for “piramutaba” (*Brachyplatystoma vaillantii*, Siluriformes: Pimelodidae), one of the commercially most important migratory catfishes in the Amazon Basin. *Conservation Genetics Resources*.
- Roger, A.R and Harpending, H. 1992. Population Growth Makes Waves in the Distribution of Pairwise Genetic Differences. *Mol Biol Evol.*, 9: 552-569
- Rossetti, D.F; de Toledo, P.M and Goes, A.M. 2005. New geological framework for Western Amazonia (Brazil) and implications for biogeography and evolution. *Quaternary Research* 63, 78–89.

- Roy, MS; Silva, JMC; Arctander, P; García-Moreno J and Fjeldså J. 1997. The speciation of South American and African birds in montane regions. In: Avian Molecular Evolution and Systematics (ed. Mindell DP), pp. 325–343. Academic Press, New York.
- Ryman, N. 1991. Conservation genetic considerations in fishery management. J. Fish Biol. 39: Sambrook, J.; Fritsch, E.F.; Maniatis, T. 1989. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Springs Harbor Laboratory Press. Cold Springs Harbor, NY.
- Sambrook, J; Fritsch, E.F and Maniatis, T. 1989. *Molecular Cloning: a laboratory manual*. 2<sup>nd</sup> ed. N.Y., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1659 p. ISBN 0-87969-309-6.
- Sanderson, M.J and Hufford, L. (Eds.), 1996. Homoplasy: The Reoccurrence of Similarity in Evolution. Academic Press, New York.
- Sanger, F; Nicklen, S and Coulson, A.R. 1977. DNA Sequencing with chain terminating inhibitors. Proceedings of National Academy of Science, 74: 5463-5467.
- Santos, G.M and Ferreira, E.J.G. 1999. Peixes da bacia Amazônica. In: LOWE-McCONNELL, R.H. Estudos ecológicos de comunidades de peixes tropicais. Tradução de Anna Emília A. M. Vazzoler; Angelo Antonio Agostinho; Patricia T. M. Cunningham. São Paulo:EDUSP, 1999, p. 345-354. Título original: Ecological studies in tropical fish Communities
- Santos, M.D.C.F; Ruffino, M.L and Farias, I.P. 2007. High levels of genetic variability and panmixia of the tambaqui *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818) in the main channel of the Amazon River. J. Fish Biol., 71a: 33-44.
- Schaefer, SA. 1998. Conflict and resolution: impact of new taxa on phylogenetic studies of the neotropical cascudinos (Siluroidei: Loricariidae). In: Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes (eds Malabarba LR, Reis RE, Vari RP, Lucena ZMS, Lucena CAS), pp. 375–400. Edipucrs, Porto Alegre, Brazil.
- Schlötterer, C and Tautz, D. 1992. Slippage synthesis of simple sequence DNA. Nucleic Acids Res. 20, 211–215.
- Schmitt, R. 2005. Filogeografia de *Hypopygus lepturus* Hoedman, 1962 (Gymnotiformes: Rhamphichthyidae) ao longo do médio rio Negro, Amazônia. Mestrado, CPBA, INPA/UFAM, Manaus, 95 pp.
- Schneider, S; Roessli, D and Excoffier, L. 2000. Arlequin ver. 2000: a software for population genetics data analysis. Genetics and Biometry Laboratory, University of Geneva, Switzerland. URL: <http://lgb.unige.ch/arlequin>.
- Schuelke, M. 2000. An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. Nature biotechnology vol 18.
- Selkoe, K.A; Toonen, R.J. 2006. Microsatellites for ecologists: a practical guide to using and evaluating microsatellite markers. Ecology Letters, 9: 615-629.

- Sioli, H. 1984. The Amazon and its main affluents: hydrography, morphology of the river courses, and river types. In: *The Amazon: Limnology and Landscape Ecology of a Mighty Tropical River and its Basin* (ed. Sioli H), pp. 127–165. *Monographiae Biologicae* 56, The Netherlands.
- Sivasundar, A; Bermingham, E and Ortí, G. 2001. Population structure and biogeography of migratory freshwater fishes (*Prochilodus*: Characiformes) in major South American rivers. *Molecular Ecology*, 10: 407-417.
- Slatkin, M. 1995. A Measure of Population Subdivision Based on Microsatellite Allele Frequencies. *Genetics*, 139: 457-462.
- Smith, N. J. H. 1979. *A Pesca no Rio Amazonas*. INPA, CNPq, Manaus .
- Souza, E.R. 2008. *Filogeografia do genero neotropical Fluviphylax (Cyprinodontiformes: Poeciliidae) das bacias do amazonas e do Orinoco*. Tese de mestrado. INPA/UFAM. Manaus.
- Sutterlin, A. M. and Gray, R. 1973. Chemical basis for homing of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *J. Fish. Res. Board Can.* 28, 565-572.
- Sunnucks, P. 2000. Efficient genetic markers for population biology. *Tree* 15: 199-203.
- Tajima, F. 1989. Statistical Method for Testing the Neutral Mutation Hypothesis by DNA Polymorphism. *Genetics*, 123: 585-595.
- Templeton, AR; Routman, E and Philips, CA .1995. Separating population structure from population history: a cladistic analysis of geographical distribution of mitochondrial DNA haplotypes in the tiger salamander, *Ambystoma trifurcatus*. *Genetics*, 140, 767-782.
- Templeton, A. 2011. *Genética de populações e teoria microevolutiva*. Tradução de: *Population genetics and microevolutionary theory*. Editora SBG.
- Terêncio, M.L. 2009. *Estimativa da variabilidade genética da região controle do DNA mitocondrial de Nannostomus eques (Characiformes, Lebiasinidae) da bacia do rio Negro*. Dissertação de Mestrado, CGBEV, INPA, Manaus 102 pp.
- Thompson, J.D; Higgins, D.G and Gibson, T.J. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*
- Thuesen, P.A; Pusey, B.J; Peck, D.R; Pearson, R and Congdon, B.C. 2008. Genetic differentiation over small spatial scales in the absence of physical barriers in an Australian rainforest stream fish. *J. Fish. Biol.*, 72: 1174-1187.
- Toivonen, T; Maki, S and Kalliola, R. 2007. The riverscape of Amazonia – a quantitative approach to the fluvial biogeography of the region. *Journal of Biogeography* 34, 1374–1387.

- Torrente-Vilara, G; Zuanon, J; Leprieur, F; Oberdorff, T and Tedesco, P. 2011. Effects of natural rapids and waterfalls on fish assemblage structure in the Madeira River (Amazon Basin). *Ecology of Freshwater Fish* 20, 588-597.
- Torrico, J.P; Hubert, N; Desmarais, E; Duponchelle, F; Nunez- Rodriguez, J; Montoya-Burgos, J; Garcia-Davila, C; Carvajal-Vallejos, F.M; Grajales, A.A; Bonhomme, F and Renno, J.-F. 2009. Molecular phylogeny of the genus *Pseudoplatystoma* (Bleeker, 1862): biogeographic and evolutionary implications. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 51, 588–594.
- Toth, G; Gaspari, Z and Jurka, J. 2000. Microsatellites in different eukaryotic genomes: survey and analysis. *Genome Res.* 10, 967–981.
- Tsigenopoulos, CS and Berrebi, P. 2000. Molecular phylogeny of North Mediterranean freshwater barbs (genus *Barbus*: Cyprinidae) inferred from cytochrome b sequences: biogeographic and systematic implications. *Mol Phy Evol* 14(2):165–179.
- Vannote, R. L; Minshall, G. W; Cummings, K. W; Sedell, J. R and Cushing, C. E. 1980. The River Continuum Concept. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 37: 130-137.
- Van Oosterhout, C; Hutchinson, W.F; Wills, D.P.M and Shipley, P. 2004. micro-checker: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes*, 4: 535-538.
- Vari, RP. 1988. The Curimatidae, a lowland Neotropical fish family (Pisces: Characiformes); distribution, endemism, and phylogenetic biogeography. In: *Proceedings of a Workshop on Neotropical Distribution Patterns* (eds Heyer WR, Vanzolini PE), pp. 343–377. Academia Brasileira de Ciências, Rio de Janeiro.
- Vari, RP and Weitzman, SH. 1990. A review of the phylogenetic biogeography of the freshwater fishes of South America. In: *Vertebrates in the Tropics* (eds Peters G, Hutterer R), pp. 381–394. Alexander Koenig Zoological Research Institute and Zoological Museum, Bonn.
- Vázquez–Domínguez, E. 2002. Phylogeography, historical patterns and conservation of natural areas. In: *Protected areas and the regional planning imperative in North America*: 369–378 (G. Nelson, J. C. Day, L. M. Sportza, J. Loucky & C. Vásquez, Eds.). Univ. of Calgary Press, Canada.
- Vázquez–Domínguez, E. 2007. Filogeografía y vertebrados. In: *La Ecología molecular de plantas y animales*: 441–466 (L. Eguiarte, V. Souza, & X. Aguirre, Eds.). INE, Mexico.
- Weber, J.L. 1990. Informativeness of human (dC-dA)<sub>n</sub> (dG-dT)<sub>n</sub> polymorphisms. *Genomics*, 7: 524-530.
- Weir, BS; Cockerham, CC. 1984. Estimating *F*-Statistics for the analysis of population structure. *Evolution*, 38: 1358–1370.
- Weitzman, SH and Weitzman, MJ. 1982. Biogeography and evolutionary diversification in Neotropical freshwater fishes with comments on the refuge theory. In: *Biological*

Diversification in the Tropics(ed. Prance GT), pp. 403–422. Columbia University Press, New York.

Welcomme , R. L. 1985. River fisheries. FAO. Fish. Tech. Pap., No. 262.

Wesselingh, F.P and Salo, J.A. 2006. Miocene perspective on the evolution of the Amazonian biota. *Scripta Geologica* 133, 439–458.

Wilson, G.M; Thomas, W.K and Beckenbach; A.T. 1985. Intra- and interspecific mitochondrial DNA sequence divergence in *Salmo*: rainbow, steelhead, and cutthroat trotts. *Can. J. Zool*,63: 2088-2094.

Whitemore, TC and Prance, GT. 1987. Biogeography and QuaternaryHistory in Tropical America. Oxford University Press, Oxford.

Wolfe, K. H; Li, W-H and. Sharp, P. M. 1987. Rates of nucleotide substitution vary greatly among plant mitochondrial, chloroplast, and nuclear DNAs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84: 9054-9058.

Wright, S. 1931. Evolution in Mendelian populations. *Genetics*, 16.

Wright S. 1951. The genetical structure of populations. *Ann Eugen* **15**: 323–354.

Wright, S. 1969. *Evolution and the Genetics of Populations, Theory of Gene Frequencies*. Chicago

Wright, S. 1978. *Evolution and the Genetics of Populations*. University of Chicago Press. Chicago

Wright, J.W; Spolsky, C and Brown, WM. 1983. The origin of the parthenogenetic lizard *Cnemidophorus laredoensis* inferred from mitochondrial DNA analysis. *Herpetologica* 39: 410–416.

Wright, J.M. and Bentzen, P. 1994. Microsatellites: genetic markers for the future. *Reviews in fish Biology and Fisheries*, 4:384-388.

Yeh, F.C and Boyle, T.J.B. 1997. Population genetic analysis of co-dominant and dominant markers and quantitative traits. *Belgian Journal of Botany* 129: 157.

Zardoya, R and Doadrio, I. 1999. Molecular evidence on the evolutionary and biogeographical patterns of European Cyprinids. *J. Mol. Evol.* 49, 227–237.

Zink, R. M. 2002. Methods in comparative phylo-geography, and their application to studying evolution in the North American aridlands. *Integrative and Comparative Biology*, 42: 953–959.