

Universidade do Amazonas - UA
Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia - INPA

**Estimativa da variabilidade genética intra-específica da
dourada - *Brachyplatystoma flavicans* Castelnau 1855
(Pimelodidae - Siluriformes) no Sistema Estuário-
Amazonas-Solimões**

JACQUELINE DA SILVA BATISTA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia Tropical e Recursos Naturais do convênio INPA/FUA, como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre em Ciências Biológicas área de concentração Biologia de Água Doce e Pesca Interior.

MANAUS - AMAZONAS
2001
Universidade do Amazonas - UA

**Estimativa da variabilidade genética intra-específica da
dourada - *Brachyplatystoma flavicans* Castelnau 1855
(Pimelodidae - Siluriformes) no Sistema Estuário-
Amazonas-Solimões**

JACQUELINE DA SILVA BATISTA

Orientador: José Antônio Alves Gomes, Ph.D.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia Tropical e Recursos Naturais do convênio INPA/FUA, como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre em Ciências Biológicas área de concentração Biologia de Água Doce e Pesca Interior.

FICHA CATALOGRÁFICA

Batista, Jacqueline da Silva

Estimativa da variabilidade genética intra-específica da dourada - *Brachyplatystoma flavicans* Castelnau 1855 (Pimelodidae - Siluriformes) no Sistema Estuário-Amazonas-Solimões.

Manaus: INPA, 2001.

XVIII + 97 p.

Dissertação de Mestrado

1. Peixe 2. Siluriformes 3. Pimelodidae 4. Dourada 5. Dna Mitochondrial
6. Região controle 7. Filogeografia

Sinopse:

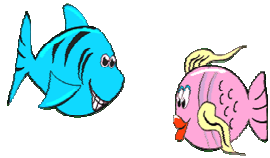
Espécimens de *Brachyplatystoma flavicans*, provenientes de três localidades do eixo Estuário-Amazonas-Solimões (EAS), foram estudados mediante análise de seqüências nucleotídicas da região controle do DNA mitocondrial. As análises filogenéticas, análise de polimorfismo de DNA, AMOVA e análise de clados inseridos, sugerem que esta espécie compõe uma única população migradora na Amazônia e que a variabilidade genética não está associada com a distribuição geográfica. Não se pode descartar, porém, a possibilidade de haver populações associadas a afluentes específicos do sistema EAS.

Palavras-chave: *Brachyplatystoma flavicans*, região controle, seqüenciamento de DNA, filogeografia.

**Dedico esta dissertação a minha querida família:
meus pais Darcy e Aldeir e meus irmãos Albery e Dalbert.
Ao meu amor Adonai e aos meus Mentores.**

“Nada é mais fácil do que admitir a verdade deste princípio: a luta universal pela existência; nada mais difícil ter esse princípio sempre presente ao espírito. Pois, não sendo assim, ou se vê mal toda a economia da natureza, ou se erra quanto ao sentido que convém atribuir a todos os fatos relativos à distribuição, à raridade, à abundância, à extinção e às variações dos seres organizados”.

(Charles Darwin)



“Aquele que vê as coisas crescerem desde o princípio terá delas a melhor visão”.

(Aristóteles)

AGRADECIMENTOS

Muitos foram os que acreditaram e contribuíram para que essa dissertação se tornasse realidade.

Em primeiro lugar agradeço a Deus, divina providência, que sempre me deu forças, permitindo a realização de meus merecimentos, oportunidades e evolução desde o mais ínfimo começo.

Agradeço ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e tecnológico (CNPq) pelo financiamento da minha bolsa de estudo que permitiu dedicar-me ao mestrado.

Ao Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA.

À Universidade do Amazonas – UA.

Em especial ao meu orientador Dr. José Antônio Alves Gomes que desde o primeiro ano que fui sua aluna de PIBIC, (1997) em nenhum momento poupou esforços e tempo para me orientar e ajudar. Por ter paciência e sempre proporcionar tudo de que eu precisava para cursar o mestrado. Por ter me ensinado muito e ter contribuído de forma ímpar para que eu me tornasse a profissional que sou. Como costumam dizer, foi um verdadeiro pai em toda essa jornada. Certamente todas as palavras seriam poucas para expressar o quanto lhe sou grata.

Ao Laboratório de Biologia Molecular do INPA por permitir que eu realizasse a maior parte do trabalho laboratorial e aos técnicos Marco e Franco.

À Coordenação Geral de Pós-graduação do INPA.

À coordenação do Curso de Biologia de Água Doce e Pesca Interior, em boa parte na pessoa da Dra. Lúcia Rapp Py-Daniel pela sua doação ao ensino e coordenação do Curso, por fazer possível a minha participação e exposição de meus trabalhos em eventos científicos e à Carminha pelo seu trabalho valioso junto à secretaria do curso.

À Universidade Federal do Pará, na pessoa da Dra. Iracilda Sampaio, do Laboratório de genética e Biologia Molecular do Campus de Bragança, por permitir o seqüenciamento de DNA, aplicado nas amostras dos espécimens de *B. flavicans* e por toda sua valiosa ajuda, amizade e carinho.

A todos os docentes do curso pelas contribuições durante a jornada.

Ao Msc. Juan Carlos Alonso e sua orientadora Dra. Nídia Noemi Fabr e pela coleta de parte das amostras de tecido de *B. flavicans*.

Ao Dr. Guillermo Ort , por ter fornecido os *primers* utilizados para amplificar e seqüenciar toda a região controle do mtDNA dos espécimens de *B. flavicans*.

Ao Dr. Jansen Zuanon por ter me concedido a foto de *B. flavicans*.

Aos meus professores de gradua o por terem me preparado e contribuído para com a bióloga que sou e ingressar na pós-gradua o.

A todos os alunos de p s-gradua o que permitiram que a Marcela e eu fôssemos representantes discentes junto a CCPG por um ano (04/1999 a 04/2000). Aos alunos do Curso de Biologia de  gua Doce e Pesca Interior por permitirem que eu e Guillermo Estup n fôssemos representantes discentes do Curso BADPI.

A minha amiga Kyara, que desde o início de minha vida acad mica acompanha esta caminhada, pela força e por acreditar junto comigo que esse sonho tornar-se-ia realidade.

Aos meus amigos de curso: Graciene Taveira, Rosymeire Mendonça, Hemily Rêgo, Edsandra Campos, Tony Braga, Carmen Rosa por todos os instantes juntos e por me motivarem nos momentos dif cies.  s minhas amigas Sandra Aguilar, Gláucia Chair, Dulce Belém e Adriana Brandão e aos meus amigos Abecassis Garcia e Ellington Bezerra por me motivarem e por terem contribuído de uma forma ou de outra com esse trabalho.

  Dra. Izeni Pires Farias (a Fofa) pela preciosa motiva o, por ter me ajudado com sugestões, esclarecendo d vidas, até mesmo as básicas, em algumas análises.

Aos meus tios M riam e José Albertino Rafael por me incentivarem desde o ensino médio e terem me proporcionado sugestões valiosas durante o mestrado.

  FUJ e todos os Mentores por serem meu suporte, alicerces e incentivo espiritual. Por me proporcionarem informa es úteis para também entender melhor as questões biológicas, relacionadas às leis que regem o Universo, e me ajudarem a ser cada vez melhor como pessoa.

A minha avó Terezinha que, desde o começo de minha vida, me inclui fervorosamente em suas ora es e sempre acreditou que um dia eu iria conseguir.

Ao meu amor Adonai pela paciência, compreensão, incentivo, motiva o, amor e ajuda desde o início dessa jornada.

Aos meus irmãos Albery e Dalbert pelo incentivo. Aos meus pais Darcy e Aldeir, por terem me dado e permitido esta vida, por nunca terem poupado esforços para me ajudar, renunciando noites de sono, trabalhando dia e noite, investindo na minha educação. Por valorizar minha profissão e minha escolha e por acreditarem em mim, muito mais do que eu.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para que esse sonho se tornasse realidade, obrigada por tudo.

Finalizo, então, com um pensamento do grande Matemático Isaac Newton, que diz: “Se pude ver mais longe, foi por ter-me apoiado em ombros de gigantes”.

Valeu !

Jacqueline da Silva Batista

RESUMO

A dourada (*Brachyplatystoma flavicans*) é uma das duas espécies de bagres mais importantes para a pesca da região Norte, sendo capturada comercial e artesanalmente desde Iquitos, no Peru, até a região do estuário do rio Amazonas, em Belém. Trabalhos de vários autores sugerem que esta espécie possui áreas diferenciadas de alimentação/crescimento e reprodução e que, na Amazônia, a espécie é composta por uma única população que sazonalmente migra desde as áreas de alimentação e crescimento para as áreas de reprodução. Este trabalho teve como objetivos principais: estimar a variabilidade genética entre indivíduos de *B. flavicans*, coletados em três pontos ao longo do eixo Estuário-Amazonas-Solimões (EAS), e verificar se esta variabilidade estava correlacionada com a distribuição geográfica. Foram seqüenciados 1037 pb da região controle do DNA mitocondrial de 45 indivíduos de *B. flavicans*, coletados em Belém, Manaus e Letícia. As seqüências nucleotídicas foram utilizadas em quatro análises: filogenéticas (parcimônia, máxima verossimilhança e distância genética), polimorfismo de DNA, AMOVA e de cladogramas inseridos. Foram identificados 31 haplotipos e nestes 27 *singletons* entre os 45 indivíduos de *B. flavicans* seqüenciados. A maior variabilidade genética foi encontrada em Belém e a menor em Letícia, mas não houve correlação da variabilidade genética com distribuição geográfica, sugerindo que *B. flavicans* englobe uma única população migradora no eixo EAS. No entanto, como explicação para a maior variabilidade genética encontrada em Belém, não se pode descartar a hipótese de que várias sub-populações de *B. flavicans* segreguem-se geograficamente e geneticamente nos diferentes afluentes do sistema EAS em função da migração reprodutiva.

ABSTRACT

The dourada (*Brachyplatystoma flavicans*) is among the two most important catfish species in the Amazon, being captured by both artisanal and commercial fishing fleets from Iquitos (Peru) to the estuary of the Amazonas river, in Belem. Studies by several authors suggest that the species has differentiated areas for feeding/growth and reproduction, and that, in the Amazon, it is composed by a single population that seasonally migrates from the feeding and growing areas to the areas of reproduction. The main objectives of this study were: to estimate the genetic variability among and between individuals of *B. flavicans* collected in three points along the Estuary-Amazonas-Solimões axis (EAS) and to verify if the variability found was correlated with geographic distribution. A fragment of 1037 bp corresponding to the D-loop of the mtDNA was sequenced for 15 individuals in three locations: Belem, Manaus and Leticia. The sequences were utilized in four types of analyzes: phylogenetic (parsimony, maximum likelihood and distance), DNA polymorphism, AMOVA and Nested Clade Analyses. It was possible to identify 31 haplotypes and 27 singletons among the 45 *B. flavicans* individuals sequenced. The larger genetic variability was found in Belem and the smaller in Leticia, but there was no correlation between the genetic variability and geographic distribution, suggesting that *B. flavicans* enclose a single migrating population in the EAS axis. However, as an explanation for the significantly larger degree of genetic variability found in Belem, one cannot discard the hypothesis that different subpopulations of *B. flavicans* may segregate geographically and genetically in the basins of the different affluents of the EAS system, during the migration for reproduction.

ÍNDICE

FICHA CATALOGRÁFICA	III
DEDICATÓRIA	IV
EPÍGRAFE	V
AGRADECIMENTOS	VI
RESUMO	IX
ABSTRACT	X
LISTA DE TABELAS	XIV
LISTA DE FIGURAS	XVI
1. INTRODUÇÃO	01
1.1 - Importância comercial da Dourada	02
1.2 - Biologia e pesca da Dourada	03
1.3 - Uso de DNA em estudos populacionais	07
1.4 - A Região controle	10
1.5 - Problemática abordada - Justificativa (mtDNA e <i>B. flavicans</i>)	13
2. OBJETIVOS	15
2.1 - Objetivo geral	15
2.2 - Objetivos específicos	15
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	16
3.1 - Locais de coleta, obtenção e preservação do material.....	16
3.2 - Métodos laboratoriais.....	16
3.2.1 - Extração de DNA.....	16
3.2.1.1 - Digestão.....	18
3.2.1.2 - Purificação do DNA - Extração fenol-clorofórmio.....	18
3.2.2 - Amplificação <i>in vitro</i> do DNA pela PCR.....	19
3.2.3 - Purificação do produto amplificado.....	21
3.2.4 - Reação de seqüenciamento.....	22

3.2.5 - Precipitação do produto da reação de seqüência.....	23
3.2.6 - Eletroforese de seqüenciamento.....	23
3.3 - Edição e alinhamento das seqüências nucleotídicas.....	24
3.4 - Análises estatísticas e filogenéticas das seqüências nucleotídicas.....	24
3.4.1 - Máxima Parcimônia.....	25
3.4.2 -Máxima Verossimilhança.....	27
3.4.3 -Distância Genética.....	27
3.4.4 - Análise dos haplotipos e polimorfismo de DNA.....	28
3.4.5 - Análise de Variância Molecular (AMOVA)	29
3.4.6 - Análise de clados inseridos (<i>Nested clade analysis</i>)	29
4. RESULTADOS.....	32
4.1 - Extração e amplificação da região controle (<i>D-loop</i>)	32
4.2 - Seqüências de DNA.....	33
4.3 - Análises filogenéticas.....	36
4.3.1 - Máxima Parcimônia.....	36
4.3.2 -Máxima Verossimilhança.....	36
4.3.3 - Distância genética.....	36
4.4 - Análises populacionais.....	45
4.4.1 - Análise e distribuição de haplotipos.....	45
4.4.2 - Análises de polimorfismo de DNA.....	47
4.5 - Análise de Variância Molecular (AMOVA)	49
4.6 - Análise de clados inseridos (<i>Nested clade analysis</i>)	50
5. DISCUSSÃO.....	53
5.1 - Análises filigenéticas.....	54
5.2 - Análises populacionais.....	58
5.2.1 - Distribuição dos haplotipos.....	58
5.2.2 - Análises de polimorfismo de DNA.....	59

5.3 - Análise de variância molecular - AMOVA.....	61
5.4 - Análise de clados inseridos (<i>Nested clade analysis</i>)	63
6. CONCLUSÃO.....	68
7. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	69
ANEXOS.....	82
ANEXO I - Seqüências da região controle do mtDNA de 45 indivíduos de <i>Brachyplatystoma flavicans</i>	83
ANEXO II - Seqüências da região controle do mtDNA de um indivíduo de <i>B.</i> <i>flavicans</i> e um de <i>B. vaillantii</i>	95

LISTA DE TABELAS

- Tabela 01** - Sumário dos métodos filogenéticos utilizados e seus respectivos resultados MP (Máxima Parcimônia), MV (Máxima Verossimilhança), NJ (método do agrupamento dos vizinhos), L (comprimento da árvore), Ln (log da árvore de ML), CI (índice de consistência), RI (índice de Retenção)37
- Tabela 02** - Matriz de distância entre pares de indivíduos de *B. flavicans* coletados em Belém, Manaus e Letícia. Os valores acima da diagonal representam o número de substituições nucleotídicas e abaixo a distância genética corrigida segundo o modelo de HKY. Os táxons destacados são os 31 haplotipos identificados entre os 45 indivíduos.....43
- Tabela 03** - Média da distância genética (em porcentagem) obtida segundo o modelo de HKY dentro e entre as populações de *B. flavicans*.....45
- Tabela 04** - Haplotipos de *B. flavicans* encontrados entre 45 indivíduos com suas localidades, frequências e espécimens correspondentes46
- Tabela 05** - Resultados da análise de polimorfismo de DNA, obtidos através da análise das seqüências nucleotídicas da região controle, entre os indivíduos de *B. flavicans* das três localidades. O valor abaixo dos números é o desvio padrão.....47
- Tabela 06** - Resultados da análise de polimorfismo de DNA entre pares de populações de *B. flavicans* obtidos através das seqüências nucleotídicas da região controle48

Tabela 07 - Resultado da análise de variância molecular (AMOVA) inter e intrapopulacional. V_b = variância em cada população; V_c = variância entre as três populações. O valor de P foi estimado mediante 1000 permutações aleatórias.....49

Tabela 08 - Resultado da chave de inferência de interpretação biológica (Templeton, 1998) determinados a partir dos resultados estatísticos obtidos da análise de clados inseridos, conforme cladograma da figura 18.....51

LISTA DE FIGURAS

- Figura 01-** Desembarque da dourada (*Brachyplatystoma flavicans*) capturada em Belém, Santarém e Letícia (Colômbia) em 1993 e 1994 (Modificado de Ruffino *et al.*, 2000).....03
- Figura 02 -** Dourada – *Brachyplatystoma flavicans*04
- Figura 03 -** Modelo para as migrações da dourada. 1) Área hipotética de desova; 2) Área de criação; 3) Área de alimentação dos pré-adultos e adultos. Adaptado de Barthem & Goulding (1997)05
- Figura 04 -** Comprimento médio furcal e desvio padrão da dourada capturada ao longo do rio Amazonas em outubro de 1994 (Rufino & Barthem, 1996)..06
- Figura 05 -** Esquema gráfico do DNA mitocondrial de peixes com a localização da região controle (seta) (modificado de Meyer, 1993)09
- Figura 06 -** Localização dos pontos de coleta (adaptado de Barthem & Goulding, 1997)17
- Figura 07 -** Esquema com a sequência das etapas que compõem a metodologia17
- Figura 08 -** Eletroforese em gel de agarose 0.8% demonstrando o DNA de 10 espécimens. O marcador de peso molecular não aparece na fotografia..32
- Figura 09 -** Eletroforese em gel de agarose 0.8% da amplificação da região controle do mtDNA de 15 espécimens de *B. flavicans* coletados em Belém. A fileira identificada pelas letras MM e C indicam o marcador molecular e o controle negativo, respectivamente32

- Figura 10** - Porcentagem da frequência de bases nucleotídicas das 45 seqüências da região controle de *B. flavicans*34
- Figura 11** - Número de substituições (transições - TS e transversões - TV) versus distância genética p (não corrigida) para a região controle do DNA mitocondrial35
- Figura 12** - Consenso estrito de 4 árvores de MP (L = 208; CI = 0.822; RI = 0.809) considerando matriz de peso TS1TV1. Os números acima dos braços são valores de *bootstrap* para 1000 replicações, sendo que somente os valores acima de 50% são mostrados. Os táxons em azul foram coletados em Belém, em verde em Manaus e em vermelho em Letícia. Em preto, o táxon *B. vaillantii* utilizado como grupo externo38
- Figura 13** - Consenso estrito de 4 árvores de MP considerando a matriz de peso diferenciado TS1TV2 (L =271; CI = 0.838; RI = 0.802). Os números acima dos braços são valores de *bootstrap* e somente os valores acima de 50% são mostrados. Os táxons em azul foram coletados em Belém, em verde em Manaus e em vermelho em Letícia. Em preto, o táxon *B. vaillantii* utilizado como grupo externo39
- Figura 14** - Árvore obtida por Máxima Verossimilhança (- Ln = 2508.26406) com os indivíduos de *B. flavicans* das 3 localidades. Os táxons em azul foram coletados em Belém, em verde em Manaus e em vermelho em Letícia. Em preto, o táxon *B. vaillantii* utilizado como grupo externo.....40
- Figura 15** - Árvore de distância genética com os 45 indivíduos de *B. flavicans*, obtida

pelo agrupamento dos vizinhos, usando o modelo de correção das distâncias de HKY+ Γ +I. Os táxons em azul foram coletados em Belém, em verde em Manaus e em vermelho em Letícia. Em preto, o táxon *B. vaillantii* utilizado como grupo externo.....41

Figura 16 - Consenso pela regra da maioria de 50% de todas as árvores (10 árvores) obtidas por máxima parcimônia, máxima verossimilhança e distância. Os valores acima dos braços foram obtidos pelo mesmo consenso. Os táxons em azul foram coletados em Belém, em verde em Manaus e em vermelho em Letícia. Em preto, o táxon *B. vaillantii* utilizado como grupo externo.....42

Figura 17 - Histograma representativo da variabilidade nucleotídica observada nas amostras de *B. flavicans* provenientes de Belém (azul), Manaus (verde) e Letícia (vermelho). H, frequência haplotípica; S, número de sítios polimórficos; ETA, número total de mutações; K, média da variabilidade nucleotídica par a par48

Figura 18 - Estrutura do cladograma com os 31 haplotipos de *B. flavicans*, e seus respectivos níveis de passo, estimado pela análise de clados inseridos. O "0" indica as OTUs ou haplotipos intermediários hipotéticos. Os haplotipos destacados em azul foram coletados em Belém, os em verde em Manaus e os em vermelho em Letícia e os com duas cores em localidades conforme as cores correspondentes às três localidades citadas.....52

1. INTRODUÇÃO

A Amazônia possui uma das mais ricas ictiofaunas do planeta, com aproximadamente 2500 espécies descritas, sendo que a Ordem Siluriformes, com 11 famílias na região Neotropical, contribui com aproximadamente 39% deste total (Nelson, 1994; de Pinna, 1998). Apesar deste percentual significativo e considerada a importância do grupo para a economia regional, os estudos sobre a biologia da grande maioria das espécies desta Ordem ainda são escassos.

Os maiores representantes dos Siluriformes na Amazônia, os chamados grandes bagres, pertencem à família Pimelodidae, que inclui o gênero *Brachyplatystoma*. Pimelodidae é um clado com cerca de 300 espécies distribuídas nos rios da América do Sul e Central, Ilhas do Caribe e do Sul do México (Nelson, 1994; de Pinna, 1998). De acordo com Goulding (1979) os bagres Neotropicais possuem estratégias variadas para a ocupação das áreas alagadas disponíveis, mas os grandes pimelodídeos são especialmente abundantes nos produtivos rios de águas brancas, onde a sua importância comercial é bem estabelecida e onde está localizado o centro das atividades pesqueiras na Amazônia (Junk & Honda, 1976; Barthem & Goulding, 1997).

Entre os grandes pimelodídeos, *Brachyplatystoma flavicans* (popularmente conhecida como dourada), *B. vaillantii* (piramutaba) e *B. filamentosum* (piraíba) têm sido as três espécies mais importantes, tanto para a pesca comercial quanto para a pesca artesanal da região há algumas décadas (Barthem & Goulding, 1997). Esta situação realça a importância atual do gênero *Brachyplatystoma* como fonte de alimento e de renda para populações humanas na Amazônia, especialmente considerando que este gênero é capturado intensamente desde o estuário do rio

Amazonas no Pará, até Iquitos no Perú, próximo às nascentes do Amazonas nos Andes.

1.1 - Importância comercial da Dourada

A dourada, *Brachyplatystoma flavicans*, está entre as duas espécies de Siluriformes mais importantes para a pesca na Amazônia. Dados de desembarque, apesar de não estarem disponíveis em uma base anual, evidenciam tal situação. Iquitos é o local de maior atividade pesqueira na Amazônia peruana. Em 1992 foram desembarcadas 5000t de pescado sendo que a dourada estava entre as dez espécies principais que, juntas, representavam 82% do desembarque (Barthem *et al.*, 1995); Em Letícia, um dos principais centros de desembarque de pescado da Amazônia ocidental e onde a captura de dourada ocorre o ano inteiro (fig. 01), nos anos de 1986, 1991 e 1993 foram desembarcadas 354, 3127 e 2385t somente de dourada, respectivamente (Ruffino *et al.*, 2000). Especificamente no ano de 1993, aproximadamente 6.000t de bagres foram exportados para Bogotá e *B. flavicans* foi a espécie indiscutivelmente mais importante, com o dobro da captura (2385t) da segunda espécie mais capturada (Salinas, 1994). Em duas localidades de desembarque pesqueiro no Estado do Amazonas, Janaucá/Curuçá (Iranduba) e pesqueiro (Manacapuru), Braga & Fabr  (2001) verificaram que a dourada foi a espécie de maior captura e comercialização em 1999 entre os siluriformes pescados nestas regiões com freqüências relativas de captura de 60% e 56% do total, respectivamente. Em Santarém, das 3700t de pescado desembarcadas em 1992, a dourada representou 14,9% do total (Ruffino & Barthem, 1996) e foi a espécie mais abundante em 1993, com aproximadamente 600t capturadas (Barthem & Goulding,

1997). Já em Belém a dourada está entre as duas espécies de bagres mais importantes desde os anos setenta e é o principal alvo da pesca artesanal (Barthem *et al.*, 1995).

Na figura 01, que apresenta dados de captura da dourada nas principais cidades ao longo do rio Amazonas, verifica-se que ocorre um pico de captura em Belém, Santarém e Manaus, entre agosto e novembro, quando os cardumes estão, em teoria, subindo o rio para reproduzir.

De uma maneira geral, os grandes bagres perfazem de 80 a 100% das exportações de pescado na Amazônia, (Barthem & Goulding, 1997), sendo que a dourada, em todos os locais onde existe estatística de desembarque, está entre as duas espécies mais capturadas.

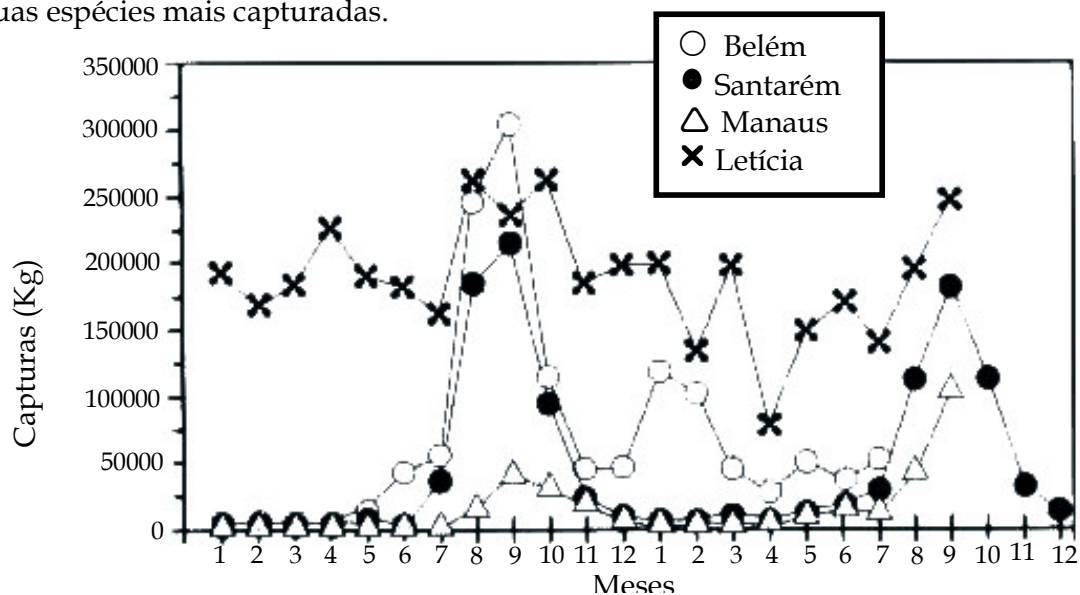


Figura 01 - Desembarque da dourada (*Brachyplatystoma flavicans*) capturada em Belém, Santarém, Manaus e Leticia (Colômbia) em 1993 e 1994 (Modificado de Ruffino *et al.*, 2000).

1.2 - Biologia e pesca da dourada

A dourada (fig. 02), considerada uma espécie de pimelodídeo de grande porte (tamanho máximo registrado: 192 cm), possui como características morfológicas externas mais marcantes a cabeça prateada e achatada, corpo dourado e barbilhões

maxilares curtos (Eigenmann & Eigenmann, 1890; Barthem & Goulding, 1997). Distingue-se das outras espécies do gênero *Brachyplatystoma*, não só devido à cor e ao tamanho dos barbilhões, mas também por possuir a maxila e mandíbula de iguais dimensões (Ferreira *et al.*, 1998).

Sua distribuição na bacia amazônica é ampla, podendo ser encontrada desde as águas de baixa salinidade da foz Amazônica até as cabeceiras de tributários de águas brancas como os rios Madeira, Japurá/Caquetá e Solimões/Ucayali. Esta espécie habita os canais dos rios principais e ocasionalmente entra na várzea durante a noite para se alimentar, retornando ao nascer do dia às águas fundas e escuras do canal (Barthem & Goulding, 1997).



Figura 02 - Dourada - *Brachyplatystoma flavicans*. (Cortesia de Zuanon)

Para espécies migradoras, Fonteles Filho (1989) e King (1995) sugerem que a área de reprodução não coincide com a melhor área de criação nem com a melhor área de alimentação, justificando assim a existência de movimentos sazonais de longa distância. Vários dos aspectos biológicos estudados até o momento corroboram a hipótese de que a dourada realiza grandes migrações para completar seu ciclo de vida. Dados de captura pesqueira e experimental (Barthem & Goulding, 1997), sugerem que os jovens saem do estuário e se dispersam por um a dois anos nos canais dos grandes rios da Amazônia Central para se alimentar. Assim, este ambiente

seria a área de alimentação e crescimento durante a fase pré-adulta. Quando o nível do rio começa a subir, a dourada que viveu na Amazônia Central durante pelo menos um ano, forma cardumes e se move rio acima procurando as cabeceiras, onde desova (fig. 03). Os ovos e larvas, então, são carregados passivamente pelas correntes do rio, de volta às regiões de criadouro, próximas a foz do Amazonas, onde o ciclo recomeçaria. No estuário, as águas ricas em nutrientes do Amazonas encontram as águas oceânicas transparentes que permitem a penetração de luz necessária para a intensa produção de fitoplâncton, o que torna esta área um ecótono de alta produção primária e grande densidade de invertebrados e outros organismos que servem de alimentação a esses peixes (Barthem & Goulding, 1997).

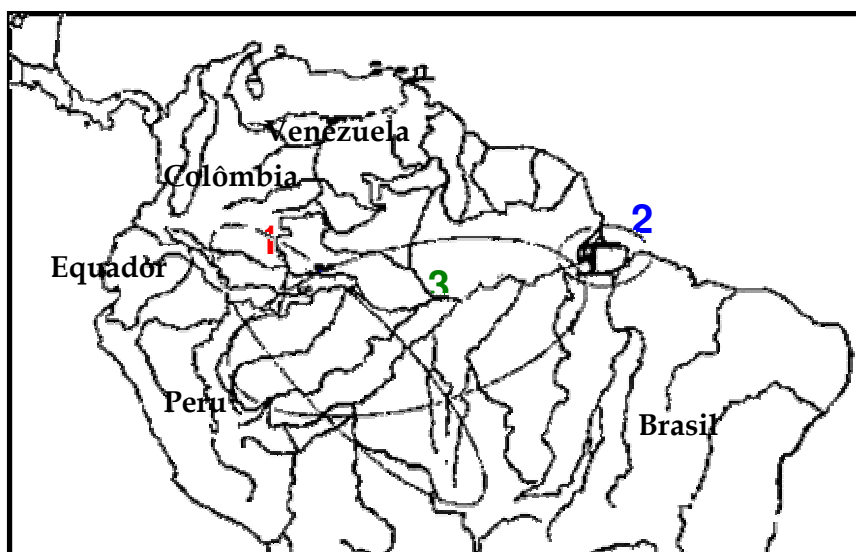


Figura 03 - Modelo para as migrações da dourada. 1) Área hipotética de desova; 2) Área de criação; 3) Área de alimentação dos pré-adultos e adultos. Adaptado de Barthem & Goulding (1997).

A hipótese migratória encontra ainda suporte em dados de captura da pesca comercial coletados nos principais centros de desembarque ao longo do eixo Estuário-Amazonas-Solimões. O comprimento médio das douradas capturadas, observadas por Rufino & Barthem (1996), aumentam no sentido Belém → Iquitos, ou

seja, na medida em que os peixes sobem o rio. Nesse estudo, os autores observaram que os indivíduos menores, presumivelmente juvenis e pré-adultos são capturados em maior número no estuário, indivíduos de porte médio no médio Amazonas e indivíduos maiores, aptos para a reprodução e por isso considerados adultos, são capturados somente no alto Amazonas (fig. 04). Um grande número de douradas, quase ou completamente maduro sexualmente, até o momento só foi encontrado no alto rio Amazonas, na área de Letícia e no rio Caquetá, na Colômbia (Barthem & Goulding, 1997). A ausência de indivíduos de *B. flavicans* sexualmente maduros na Amazônia Central, no baixo Amazonas e no estuário, sugere que a desova de *B. flavicans* realmente ocorra somente na Amazônia Ocidental. Segundo estimativas sobre a velocidade das correntes feitas por Barthem e Goulding (1997), os peixes nascidos nas cabeceiras poderiam alcançar o estuário entre 13 e 20 dias sendo levados pela correnteza dos rios.

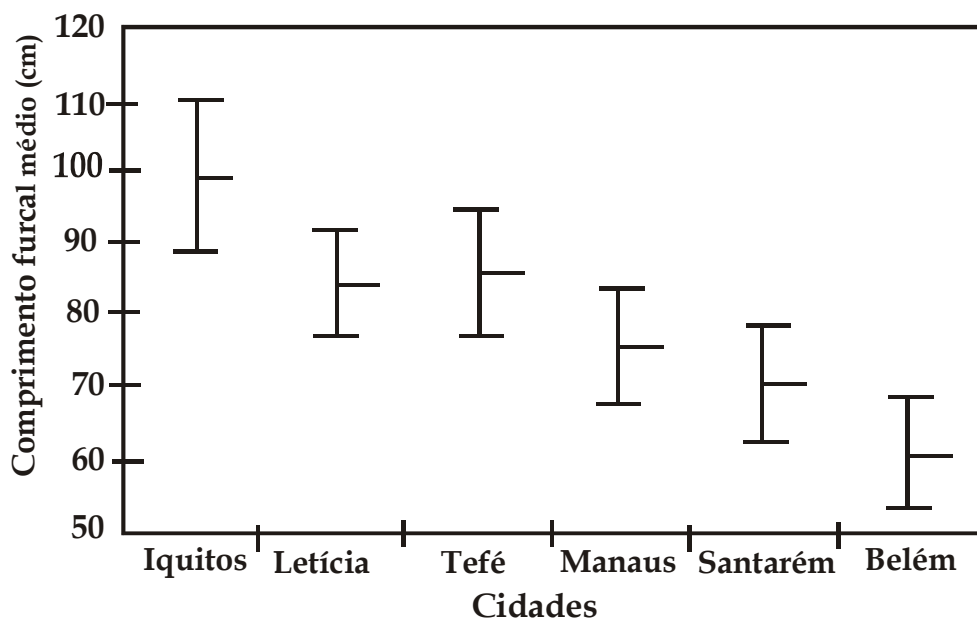


Figura 04 - Comprimento médio furcal e desvio padrão da dourada capturada ao longo do rio Amazonas em outubro de 1994 (Rufino & Barthem, 1996).

A série de evidências apresentadas anteriormente sugere a hipótese de *B. flavicans* ser formada de um único estoque que possui áreas de crescimento e reprodução completamente separadas geograficamente, fazendo com que essa espécie necessite percorrer distâncias superiores a 4.500 km para completar seu ciclo de vida (Ruffino & Barthem, 1996; Barthem & Goulding, 1997). Neste cenário, uma grande população ocupando uma enorme área geográfica estaria sendo explorada pela pesca comercial e artesanal de vários países amazônicos (Brasil, Colômbia, Peru, Venezuela e Equador). Porém, a situação real pode ser um pouco mais complexa. A pesca de dourada ao longo do ano na região de Letícia sugere populações locais permanentes (fig. 01). Também não se tem nenhum conhecimento sobre a importância relativa dos diferentes tributários do Solimões-Amazonas para a dourada. Não existem dados que permitam estabelecer se na migração para reprodução nas cabeceiras, os indivíduos adultos de *B. flavicans* voltam especificamente para os tributários onde nasceram, como no caso dos salmões na América do Norte, ou se a escolha do tributário onde a desova será feita acontece através de circunstâncias aleatórias. Se as populações de douradas segregam-se geograficamente ou não, por ocasião da reprodução nas cabeceiras, tais informações precisam ser consideradas em políticas de conservação e manejo. Estudos que se utilizam do DNA para estimar a estrutura genética da espécie e das populações podem auxiliar neste aspecto.

1.3 - Uso de DNA em estudos populacionais

O DNA (ácido desoxirribonucléico) é a molécula da hereditariedade em todos os organismos (Stryer, 1988) e por ser o reservatório de informações genéticas, ocupa uma posição central entre as macromoléculas biológicas (Lehninger *et al.*, 1995).

A possibilidade do uso da informação contida no DNA em estudos sobre a história evolutiva de populações e espécies, abriu uma nova perspectiva em estudos biológicos. Atualmente, estudos filogenéticos e filogeográficos podem gerar subsídios essenciais para conservação e manejo dos mais variados organismos. Entre os fragmentos de DNA mais usados, o DNA mitocondrial (mtDNA) tem recebido atenção especial (Avice, 1994).

A mitocôndria é uma organela citoplasmática, originada provavelmente, há cerca de 2 bilhões de anos a partir de uma bactéria aeróbica de vida livre, com um sistema de fosforilação oxidativa, que se tornou parte dos organismos eucarióticos através de um evento endossimbiótico (Margulis, 1970; Yang *et al.*, 1985). Sua função é fornecer energia na forma de ATP às células, resultante da oxidação de açúcares e ácidos graxos. As mitocôndrias possuem genoma próprio, replicação independente, mas sintetizam somente parte das proteínas e RNAs necessários à função da organela, enquanto a outra parte é sintetizada por genes do núcleo (Brown *et al.*, 1979).

O genoma mitocondrial em animais é uma molécula de DNA circular de fita dupla e contida em múltiplas cópias na mitocôndria (fig. 05). Seu tamanho é relativamente estável para animais, em torno de 16500 ± 500 pares de bases (pb) (Brown, 1981; 1983; 1985; Clarck-Walker, 1985; Moritz, *et al.*, 1987). Sua organização inclui 13 genes codificadores de proteínas, que representam 90% deste genoma, 22 de RNA transferidor (tRNAs), 2 de RNAs ribossômicos (12S e 16S rRNA) e uma região não codificadora chamada de região controle ou alça D (*D-loop*) (Brown *et al.*, 1979; Anderson *et al.*, 1981; Avice *et al.*, 1986; Meyer, 1993).

O mtDNA é geneticamente mais eficiente do que o DNA nuclear, (Attardi, 1985; Gray, 1989), quando se considera que não contem seqüências duplicadas, não possui íntrons e os genes são geralmente separados por menos do que 10 pares de bases (Wolstenholme & Clary, 1985).

Uma das vantagens em usar o mtDNA em estudos populacionais é que ele possui uma taxa de evolução (mutação) de 5 a 10 vezes maior ($5,7 \times 10^{-8}$ substituição/sítio/ano) do que os genes codificadores de proteínas do DNA nuclear (Brown, 1980; Perler *et al.*, 1980; Brown *et al.*, 1982). Várias razões possíveis explicam o porquê dessa taxa de mutação tão alta: 1) A exposição do DNA ao alto fluxo de radicais de oxigênio na cadeia respiratória, que têm efeito mutagênico, o que não acontece com o DNA nuclear por ser protegido pelas histonas (Cann *et al.*, 1984; Strachan & Read, 1996; Li, 1997); 2) A falta de um mecanismo de reparo ao contrário do DNA nuclear e 3) O número de replicações é muito maior no DNA mitocondrial em relação ao nuclear, durante a vida da célula (Li, 1997).

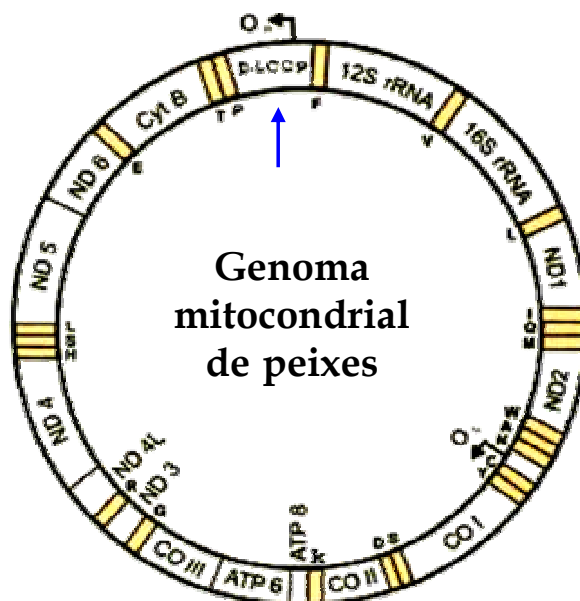


Figura 05 – Esquema gráfico do DNA mitocondrial de peixes com a localização da região controle (seta) (modificado de Meyer, 1993).

O mtDNA é também muito utilizado devido à facilidade em isolá-lo, ao grande número de cópias por célula, seu tamanho pequeno, sua organização simples (Avise *et al.*, 1984; Hayashi *et al.*, 1985), por sua suposta herança estritamente materna (a mitocôndria paternal parece ser ativamente degradada durante a fertilização) e uniclonal (Hutchison *et al.*, 1974; Giles *et al.*, 1980; Vaughn *et al.*, 1980; Avise *et al.*, 1986, 1994). A herança materna gera hipóteses que refletem a filogenia das fêmeas de uma população, sendo útil, por exemplo, no estudo da movimentação de fêmeas em populações naturais de uma espécie (Lasman *et al.*, 1981; Avise *et al.*, 1984). A alta taxa de mutação ainda permite que o DNA mitocondrial seja utilizado para inferir relações filogenéticas entre populações ou espécies com tempos de divergência relativamente recentes entre milhares e alguns milhões de anos (Brown *et al.*, 1979). Dentro do mtDNA, a região controle ou *D-loop* apresenta taxas de mutações ainda mais elevadas do que as regiões codificadoras, o que a torna uma região ainda mais indicada para estudos intra-específicos.

1.4 - A Região Controle

A região controle (alça-D ou *D-loop*) (fig. 05 seta) é a região não codificadora do genoma mitocondrial. Apresenta em torno de 1100 pares de bases e localiza-se entre as regiões codificadoras de dois RNAs transportadores (tRNA), o tRNA da prolina e o tRNA da fenilalanina.

Esta região é chamada *D-loop* (*displacement loop structure*) ou alça-D porque nela estão contidos os sítios de iniciação da replicação da fita pesada (H) e os promotores de transcrição das fitas leve e pesada (Brown *et al.*, 1986; Honeycutt & Wheeler, 1990; Strachan & Read, 1996).

A extrema variabilidade encontrada na região controle, em termos de substituição de bases, quando comparada a outras regiões do mtDNA e do DNA nuclear (Aquadro & Greenberg, 1983; Honeycutt & Wheeler, 1990), foi descoberta há mais de duas décadas (Fauron & Wolstenholme, 1976; 1980; Upholt & Dawid, 1977) e tem sido amplamente utilizada para estudos populacionais. Sua taxa de evolução é de duas a cinco vezes maior do que a de genes mitocondriais codificadores de proteínas (Aquadro & Greenberg, 1983). Esta região é também responsável pela variação de tamanho observada no genoma mitocondrial dos vertebrados (Desmore *et al.*, 1985; Harrison *et al.*, 1985), pois em alguns organismos a alça-D possui inserções de pares de bases que podem chegar a centenas de nucleotídeos.

Vários trabalhos utilizaram a alça-D como região alvo para estudos populacionais em vertebrados. Em mamíferos citam-se: Wang *et al.* (1999) em golfinhos do gênero *Tursiops*; Wynen *et al.* (2000) em duas espécies de pinípedes do gênero *Arctocephalus*; Escorza-Treviño & Dizon (2000) em um cetáceo da espécie *Phocoenoides dalli*; Houlden *et al.* (1999) em koalas da espécie *Phascolarctos cinereus*; Rossiter *et al.* (2000) em morcegos da espécie *Rhinolophus ferrumequinum*; Arctander *et al.* (1999) em bovinos africanos; Firestone, *et al.* (1999) em um marsupial da espécie *Dasyurus maculatus*; Honeycutt & Wheeler (1990) em primatas (Gorilas); Comas *et al.* (1996) em humanos. Em aves, Wenink *et al.* (1994) nas espécies *Arenaria interpres* e *Calidris alpina*; Marshall & Baker (1997) nas espécies *Fringilla* spp. e *Carduelis chloris*; Tarr & Fleischer (1999) em corvos da espécie *Corvus kubaryi* e Pestano *et al.* (2000) na espécie *Fringilla teydea*. Em anfíbios, James & Moritz (2000) em sapos da espécie *Litoria fallax* e em réptil, Serb *et al.* (2001) em tartarugas da espécie *Kinosternon flavescens*.

Em peixes, Shedlock *et al.* (1992) seqüenciaram a região controle no intuito de estudar a história evolutiva da família Salmonidae e verificaram que a alça-D é um gene em potencial para ser utilizado como marcador molecular e definição de estoques; Tzeng *et al.*, (1992) seqüenciaram todo o genoma mitocondrial de *Crossostoma lacustre* (Homalopteridae) e verificaram que, as únicas regiões que apresentaram variações nucleotídicas no nível interespecífico foram a região controle e os espaços entre os genes, enquanto que os demais genes mitocondriais mostraram-se conservativos; Brown *et al.* (1993) determinaram a variabilidade genética intraespecífica de duas populações do esturjão *Acipenser transmontanus*, a partir de 462 pb da região controle do DNA mitocondrial, e sugeriram que estas populações divergiram recentemente, propondo que a região controle de vertebrados é um gene potencial usado como marcador molecular em estudos populacionais; Nesbo *et al.* (1999) usaram a região controle para investigar as rotas de colonização da carpa (*Perca fluviatilis*) na Europa, após a última glaciação e verificaram que as 34 populações analisadas no oeste e nordeste da Europa foram colonizadas por três principais refúgios, localizados no sudoeste, noroeste e oeste daquele Continente; Gleeson *et al.* (1999) estudaram as relações filogenéticas e estruturação geográfica de sete populações de *Neochanna diversus* (Galaxiidae) provenientes de duas localidades da Nova Zelândia e sugerem, mediante divergência e diversidade genética com base em 913 pb da região controle, que existem duas espécies crípticas dessa espécie de peixe em uma das duas localidades; Sivasundar *et al.* (2000) utilizaram dois genes mitocondrias entre os quais a região controle com o objetivo de estimar as relações filogenéticas e a estrutura populacional de espécies de *Prochilodus* (curimatã) das

bacias do Paraná, Amazonas, Orinoco e Magdalena e verificaram que a divergência genética entre os haplotipos variou entre 0,3 a 3,6%.

Na Amazônia, Porto (1999) utilizou a alça-D, dentre outros genes mitocondriais e dados cariotípicos, com o objetivo de caracterizar geneticamente três populações de *Mylesinus paraschomburgkii* (uma espécie de pacu) das bacias de drenagens do Uatumã, Trombetas e Jarí, e de estudar as relações filogenéticas entre algumas espécies da família Serrasalminidae. O autor verificou que a região controle apresentou o maior índice de divergência interpopulacional, que foi de 5,2%.

1.5 - Problemática abordada - Justificativa (mtDNA e *B. flavicans*)

Os estudos até então realizados sugerem um ciclo de vida para a dourada que inclui uma das mais longas migrações conhecidas para peixes de água doce. Para explorar este recurso dentro do conceito de sustentabilidade, é de fundamental importância conhecer melhor não só o seu ciclo de vida, mas também a estrutura genética das populações exploradas, para que se possam dimensionar estoques pesqueiros. A combinação destes estudos tem reflexos diretos no manejo da pesca e nos programas de conservação para esta espécie.

Entre as várias definições disponíveis referentes ao termo estoque (Larkin, 1972; Jamielson, 1974; Ihlssen *et al.*, 1981; Gulland, 1983; Sparre & Venema, 1995), a considerada nesse trabalho é uma compilação das definições de Larkin (1972), Jamielson (1974) e Sparre & Venema (1995). Assim, considera-se estoque como uma população intercruzante geneticamente homogênea (pool de genes comum) cujos indivíduos possuem os mesmos parâmetros de crescimento e mortalidade, habitam

uma área geográfica particular, são geneticamente distinguíveis de outros estoques contemporâneos e passíveis de serem manejados.

Desta forma, é necessário determinar se a pescaria que vem sendo executada sobre a dourada na Amazônia, desde Belém até Iquitos, está sendo feita sobre um estoque único, geneticamente homogêneo como preclui o modelo migratório de Barthem & Goulding (1997), ou se a espécie *Brachyplatystoma flavicans* é constituída de várias sub-populações geneticamente diferenciadas.

Os estudos moleculares com seqüenciamento da região controle do DNA mitocondrial podem vir a auxiliar no entendimento da estruturação genética das populações da dourada na Amazônia e assim contribuir para a definição dos estoques.

Mediante o exposto, formula-se a seguinte hipótese de trabalho:

Ho: A variabilidade genética entre os indivíduos de *Brachyplatystoma flavicans* coletados ao longo do Sistema Estuário-Amazonas-Solimões é pequena ou inexistente, evidenciando a existência de um único estoque.

2. OBJETIVOS

2.1 - Objetivo geral

Determinar o grau de variabilidade genética entre indivíduos de *B. flavicans* coletados em três pontos ao longo do eixo Estuário-Amazonas-Solimões e avaliar se esta variabilidade genética está correlacionada com a distribuição geográfica.

2.2 - Objetivos específicos

- Determinar a composição nucleotídica da região controle (*D-loop*) de indivíduos de dourada coletados na região de Belém, Manaus e Letícia;
- Identificar os sítios variáveis nas seqüências nucleotídicas e estimar índices de variabilidade genética intraespecífica nos indivíduos de *Brachyplatystoma flavicans* coletados;
- Determinar os haplotipos dos indivíduos dos três locais de coleta e compará-los associados à distribuição geográfica;
- Verificar se existe alguma segregação na diversidade molecular que possa indicar a existência de estoques distintos.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 - Locais de coleta, obtenção e preservação do material:

Em função da rota migratória proposta por Barthem & Goulding (1997), espécimens de *Brachyplatystoma flavicans* foram coletados em três pontos ao longo do sistema Estuário - Amazonas - Solimões, sendo estes: a região do estuário em Belém, Manaus e Leticia (fig. 06). Em cada local, 15 indivíduos foram obtidos junto ao desembarque pesqueiro nos anos de 1998 e 1999. Devido ao fato de a dourada ser alvo da pesca artesanal e esse tipo de pesca caracterizar-se por incluir embarcações de pequeno porte, as pescarias são invariavelmente feitas em localidades próximas a estes desembarques. Com isso, foi assegurado que os espécimens amostrados foram coletados num raio inferior a que 30 km do local do desembarque. Além dos espécimens de dourada, um indivíduo de *Brachyplatystoma vaillantii* coletado em Belém também foi incluído nas análises como grupo irmão, na tentativa de referenciar a variabilidade intra-específica de *B. flavicans* em relação à variabilidade interespecífica encontrada entre estes dois pimelodídeos. As amostras de tecido (músculo) dos espécimens foram retiradas com material cirúrgico esterilizado e preservadas em álcool 80% até a extração do DNA em laboratório.

3.2 - Métodos laboratoriais

A figura 07 apresenta um esquema com as principais etapas envolvidas no presente trabalho.

3.2.1 - Extração de DNA

O DNA de cada espécimen foi extraído através de técnicas padronizadas seguindo-se o protocolo descrito em Alves-Gomes *et al.* (1995) e detalhado subsequentemente.

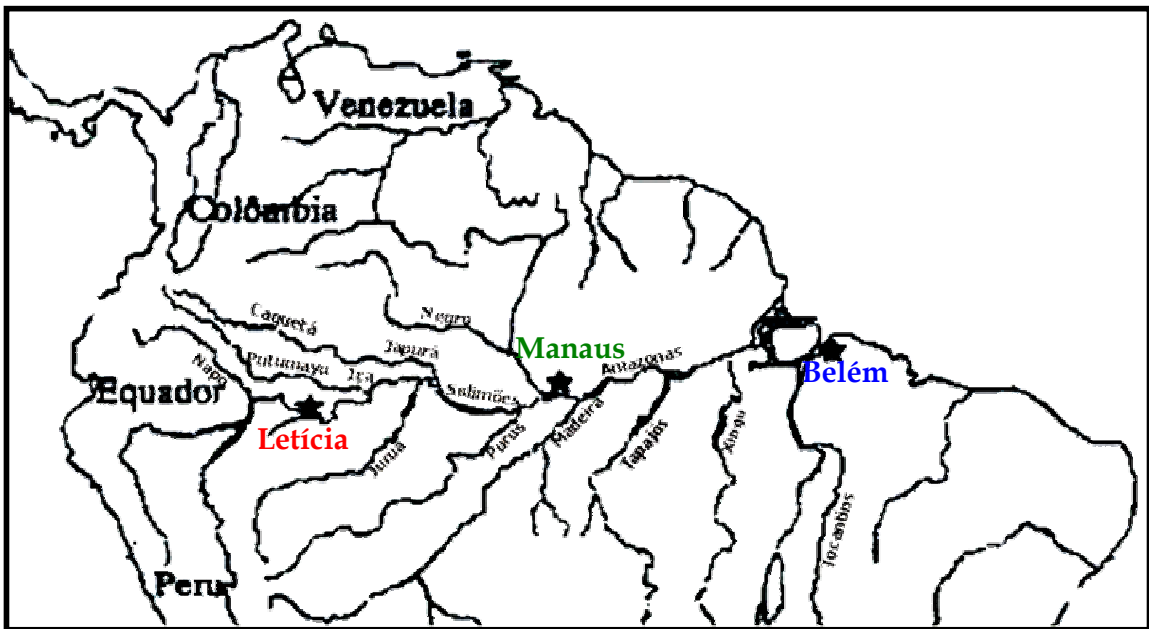


Figura 06 - Localização dos pontos de coleta (adaptado de Barthem & Goulding, 1997).

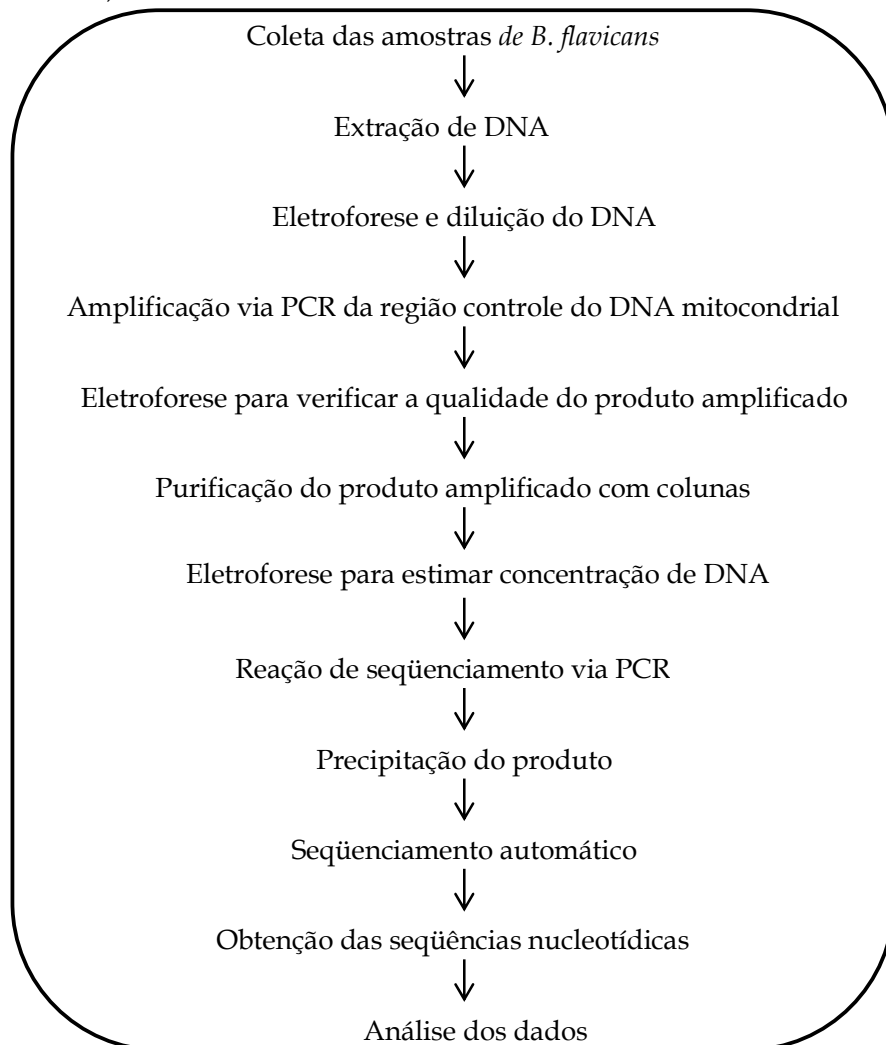


Figura 07 - Esquema com a seqüência das etapas que compõem a metodologia.

3.2.1.1 - Digestão

Foi preparado inicialmente 100 mL do tampão de extração [1 mL de cloreto de sódio 5M, 10 mL de SDS 20% (dodecil sulfato de sódio), 86 mL de água Milli-Q esterilizada, 1 mL de Tris, pH 8,0 8M e 2 mL de EDTA 0.5M] sendo que 500 µL deste em tubo tipo eppendorf juntamente com 10 µL de Proteinase K a 10 mg/mL, 10 µL de RNase a 10 mg/mL, 20 µL de DTT (ditiotretol) 1M e aproximadamente 500 mg de tecido picado do espécimen em questão. O tubo eppendorf em seguida levado à estufa a 37 °C para digestão por 24 - 48 horas.

3.2.1.2 - Purificação do DNA - Extração fenol-clorofórmio

Após a digestão, foi adicionado 500 µL de fenol equilibrado com tampão TEN 2 (Tris-HCl 20 mM pH 8.0, EDTA 10mM e NaCl 0.1M) ao tubo com tecido digerido. O tubo foi agitado por 5 min e imediatamente centrifugado, por 5 min, a 3000 g. A camada sobrenadante resultante da centrifugação foi transferida para um tubo limpo e repetido o mesmo processo.

A camada sobrenadante foi então transferida para um novo tubo onde foi adicionado 500 µL de solução fenol/clorofórmio/álcool isoamílico na proporção de 25:24:1 e agitado por 5 min seguido de centrifugação a 3000 g no mesmo período de tempo. Em seguida a camada sobrenadante foi transferida para um tubo limpo e repetiu-se a mesma operação.

O sobrenadante foi transferido para um novo tubo e em seguida foram adicionados 500 µL de solução clorofórmio/álcool Isoamílico (24:1). O tubo foi agitado por 5 min seguido de centrifugação a 3000 g, também por 5 min.

Posteriormente, foi transferida a camada sobrenadante para um tubo limpo e repetiu-se a mesma operação.

Em seguida, a camada sobrenadante foi colocada em um novo tubo eppendorf onde se adicionou 1 mL de etanol 100% e a solução mantida a -20°C por 12 horas.

Posteriormente o tubo foi centrifugado a 14000 g por 30 min, centrifugado, lavado com etanol a 70 %, seco e o DNA precipitado foi ressuspensão com 200 μL de água milli-Q.

Para a verificação quali-quantitativa do DNA extraído, o mesmo foi inoculado em gel de agarose 0.8% com brometo de etídio e marcador com peso molecular conhecido. O gel foi colocado numa cuba eletrolítica sob uma voltagem de 80 Volts e corrente de 40 Amperes por aproximadamente 50 min. Após a corrida, o gel foi colocado em transluminador de UV, fotografado em sistema de fotodocumentação Eagle Eye, e a concentração da amostra estimada visualmente mediante a comparação da amostra com o marcador molecular em diferentes diluições.

Uma vez extraído e quantificado, o DNA de cada espécie foi acondicionado em tubos eppendorf com água ultrapura, rotulado e mantido em freezer a -20°C . Antes de ser utilizado como substrato para a amplificação, o DNA foi diluído a partir da quantificação descrita acima para uma concentração de trabalho entre 10-100ng/ μL .

3.2.2 - Amplificação *in vitro* do DNA pela PCR (Mullis & Faloona, 1987)

Foi amplificada a região controle (*D-loop*) do DNA mitocondrial de cada indivíduo. Esta região contém em torno de 1070 pares de bases. A reação de amplificação foi realizada em um eppendorf de 0.2 mL com a seguinte composição:

- 19.9 μL de água milli-Q;
- 3.0 μL de tampão 10X com cloreto de magnésio;
- 3.0 μL de dNTPs 1 mM;
- 1.5 μL do primer F-TTF a 10 μM ;
- 1.5 μL do primer F-12R a 10 μM ;
- 0.1 μL de DNA Taq polimerase à 5 U/ μL
- 1.0 μL do DNA genômico do espécimen em questão a 10 – 100 ng/ μL .

Os “*primers*” (iniciadores) (Sivasundar *et al.*, 2000) utilizados na reação localizam-se adjacentes à região controle da mitocôndria, e tem as seguintes seqüências:

- F-TTF: 5'- GCC TAA GAG CAT CGG TCT TGT AA - 3'; (que se anela à fita leve);

- F-12R: 5'- GTC AGG ACC ATG CCT TTG TG - 3'; (que se anela à fita pesada).

O volume total da reação foi de 30 μL e o tubo foi colocado em termociclador, programado para realizar 30 ciclos com o seguinte perfil de temperatura: os primeiros cinco ciclos foram constituídos de um minuto a 94 °C para a desnaturação das fitas complementares do DNA, um minuto a 53 °C para anelamento (pareamento) dos *primers* complementares à região estudada e um minuto e meio a 72 °C para a extensão dos segmentos amplificados de DNA. Os demais vinte e cinco ciclos com as mesmas condições de temperatura de desnaturação e extensão, porém com 50 °C de temperatura de anelamento dos *primers*. Desta forma, todo o processo de amplificação totalizou cerca de duas horas.

Após a reação, a eficiência da amplificação foi verificada através da aplicação de 3 μL do produto amplificado de cada reação em gel de agarose 0.8 % e marcador molecular de peso de bandas conhecidos (λ digerido com HAE III - peso das bandas - 1353, 1078, 872, 603, 310, 281, 271, 234 e 194 pb) por cerca de 1 hora e 40 min com

corrente de 70 mA. Por comparação com o marcador, foi determinado se o tamanho do fragmento amplificado correspondia ao desejado.

3.2.3 - Purificação do produto amplificado

A purificação consiste na eliminação dos vários tipos de produtos não incorporados na reação de amplificação como *primers*, dNTPs, sais e outras moléculas de peso molecular baixo, e foi realizada com o Kit *Wizard* (Promega), de acordo com as especificações do fabricante.

O produto amplificado via PCR foi centrifugado e transferido para um tubo eppendorf de 1.5 mL, onde também foi colocado 100 µL do tampão de purificação e 1 mL de resina do kit de purificação. Em seguida os tubos foram agitados 3 vezes durante 1 minuto e a solução (DNA + tampão + resina) foi pressionada através da coluna de purificação do kit acoplada à uma seringa de 3 mL. A coluna foi então lavada com isopropanol 80% e o DNA (molécula de alto peso molecular) foi retido na matriz de resina da coluna. Em seguida, a minicoluna foi removida da seringa e colocada em um eppendorf e centrifugada por 2 min a 10.000 g, para que toda a solução atravessasse a matriz. Posteriormente a minicoluna foi transferida para um novo tubo e adicionados 50 µL de água quente (65-90°C) para a eluição do DNA e esperou-se 1 minuto. A minicoluna, então, foi centrifugada novamente por 20 segundos a 10000 g e 3 µL do DNA amplificado e purificado foi inoculado em gel de agarose 0.8% a fim de ter sua concentração e qualidade estimada. Subseqüentemente o DNA foi armazenado em tubo a -20 °C. Este DNA purificado foi utilizado na reação de seqüenciamento descrita a seguir.

3.2.4 - Reação de seqüenciamento

As etapas de número 3.2.4, 3.2.5 e 3.2.6 foram realizadas no laboratório de Genética e Biologia Molecular da Universidade Federal do Pará - Campus de Bragança.

O DNA das amostras de *B. flavicans* foi seqüenciado com a utilização do Kit de seqüenciamento *ABI PRISM BigDye Terminator Cycle Sequencing*. Em função de a região controle ter 1070 pb, cada amostra de DNA foi seqüenciada em duas etapas, uma com o *primer* L (leve) quando se obteve em torno de 600 pb iniciando-se na extremidade 5' do gene, e outra com o *primer* H (pesado), quando também se obtiveram em torno de 600 pb, a partir da outra extremidade (L) do gene. Mediante a complementação das duas fitas foi possível obter toda a seqüência da região controle para todos os indivíduos.

A reação de seqüência foi realizada também através da técnica de PCR (seqüenciamento cíclico) na qual o volume final de cada reação foi obtido com os seguintes componentes:

- 8 µL de água milli-Q autoclavada (esse volume teve variação que dependeu da concentração de cada amostra de DNA amplificado);
- 6 µL de tampão (200mM tris base pH 9.0, 5mM de cloreto de magnésio, água Milli-Q autoclavada);
- 1 µL do *primer* L (leve) ou H (pesado) utilizado anteriormente na amplificação do fragmento;
- 2 µL da solução de Seqüenciamento *Big Dye terminator*;
- 3 µL de DNA purificado (entre 30 -90 ng/µL).

O tubo de 0.2 mL com todos os reagentes e totalizando 20 µL de reação, foi levado ao termociclador por 25 ciclos com o seguinte perfil de temperatura: 10 seg. à 96 °C a fim de desnaturar as fitas complementares, 5 seg. à 50 °C, para o anelamento do primer e 4 min à 60 °C para a extensão da região a ser seqüenciada.

3.2.5 - Precipitação do produto da reação de seqüência

Após o término da PCR de seqüenciamento, o produto foi transferido para tubo de 0.6 mL e em seguida adicionados 80 µL de isopropanol 75%.O tubo foi então agitado brevemente e deixado à temperatura ambiente por 15 min e em seguida centrifugado por 20 min a 14500 g. O sobrenadante foi aspirado e descartado. O “pellet” (DNA purificado) foi lavado com 250 µL de isopropanol 75% e centrifugado por 5 min a 14500 g. Finalmente o excesso de álcool foi eliminado colocando-se os tubos em estufa a 37°C até que fosse seco.

Antes de ser inoculado no seqüenciador automático (ver 3.2.6), o DNA foi ressuspenso com 4 µL de tampão (formamida deionizada e EDTA 25 mM pH 8.0 com dextran azul a 50mg/mL) e colocado em termociclador por 2 min a 90° C, para que as fitas complementares fossem desnaturadas.

3.2.6 - Eletroforese de seqüenciamento

Para a obtenção da seqüência nucleotídica final, O DNA do item anterior foi submetido a uma eletroforese em gel de poliacrilamida em seqüenciador automático ABI 377 - *Perkin Elmer*, seguindo a metodologia padrão do fabricante, sendo que foram feitas eletroforeses de 3.5 e 7 horas.

3.3 - Edição e alinhamento das seqüências nucleotídicas

Após o seqüenciador automático gerar as seqüência nucleotídicas de cada reação, as seqüências de cada indivíduo foram compiladas a partir da análise das duas reações de seqüenciamento (L e H), através do programa SeqEd (ABI, 1992). Uma vez compiladas, as seqüências foram conferidas e editadas com auxílio do mesmo programa, a fim de que fossem estabelecidas as seqüências individuais finais. As seqüências, então, foram alinhadas visualmente e com essas foi originada uma matriz de dados contendo as seqüências (1037 pb) dos 45 indivíduos de *B. flavicans* dos três locais de coleta, mais um indivíduo de *B. vaillantii* que foi usado como grupo externo totalizando 46 táxons. Ao alinhar as 45 seqüências nucleotídicas dos indivíduos de *B. flavicans* com *B. vaillantii*, foi necessária a introdução de “gaps” na matriz, que correspondem às inserções/deleções, com o propósito de estabelecer homologia dos sítios entre os indivíduos. A matriz final alinhada, contendo *B. vaillantii* como grupo externo teve 1069 pb. Subseqüentemente foram feitas as análises estatísticas e filogenéticas pertinentes.

3.4 - Análises estatísticas e filogenéticas das seqüências nucleotídicas

A estimativa das relações filogenéticas das seqüências nucleotídicas foi realizada no programa PAUP* 4.0 para Macintosh (Swofford, 1999), através de três tipos de princípios metodológicos: máxima parcimônia (MP), distância genética e máxima verossimilhança (ML). Outras análises estatísticas das seqüências nucleotídicas, listadas subseqüentemente, foram feitas com o auxílio dos programas MODELTEST 3.0 (Posada & Crandall, 1998), ARLEQUIN 2.0 (Schneider *et al.*, 2000), COLAPSE 1.1 (http://www.bioag.byu.edu/zoology/crandall_lab/programs.htm),

DNASP 3.0 (Rozas & Rozas, 1999), TCS 1.06 (Clement *et al.*, 2000) e GEODIS 2.0 (Posada *et al.*, 2000).

3.4.1 – Máxima Parcimônia (MP)

O princípio da MP consiste na escolha da hipótese mais simples dentre todas as hipóteses possíveis de reconstrução filogenética, ou seja, a árvore que apresentar o menor número de passos. Cada passo representa uma mudança de estado de caráter e, no caso de seqüências de DNA, uma mutação em um dos sítios das seqüências alinhadas. Para as análises de parcimônia, duas matrizes de pesos para transições e transversões foram utilizadas: TS1TV1, na qual dois tipos de mutação tiveram o mesmo custo e TS1TV2, na qual a transição foi a metade do peso de cada transversão. Estes esquemas de peso foram utilizados com o objetivo de remediar possíveis problemas que podem ser causados pela saturação das transições e transversões em função do tempo de divergência. Em virtude de não existirem *gaps* entre as seqüências nucleotídicas de *B. flavicans* (todos os *gaps* foram autapomorfias para *B. vaillantii*) não foram realizadas análises que consideram *gaps* como quinto estado de caráter.

As opções de parcimônia definidas em PAUP foram: os caracteres (sítios) foram tratados como não ordenados, ou seja, a série de transformação de qualquer caráter é em sentido direto a qualquer estado e qualquer mudança tem o mesmo custo; os caracteres multiestados foram interpretados como incertos (um estado é escolhido dentre todos os estados disponíveis que permitem minimizar o tamanho da árvore); deleções e inserções (*gaps*) foram tratadas como ausência de dados; os sítios não informativos pela parcimônia foram excluídos das análises. As árvores

mais parcimoniosas foram geradas através de busca heurística, a qual considera uma porção entre todas as árvores possíveis e que contém um conjunto de árvores mais prováveis de conter a mais parcimoniosa. Os táxons foram adicionados às árvores aleatoriamente passo a passo, com 100 replicações para cada busca e a permutação de ramos conduzida por divisão e reconexão de clados nas árvores (*TBR - Tree bisection-reconnection*).

Para cada árvore foram estimados: O comprimento (*L - Length*) em número de passos; o índice de Consistência (*CI - Consistence Index*), que é uma medida indireta do número de vezes que um caráter sofre mudanças em uma topologia, sendo assim uma estimativa indireta de homoplasia, e o índice de Retenção (*RI - Retention index*) que indiretamente reflete a proporção de sinapomorfias.

As árvores de consenso para as duas situações (TS1TV1 e TS1TV2) foram obtidas por consenso estrito, cuja árvore contém somente os grupos que apareceram em todas as árvores igualmente parcimoniosas e pela regra da maioria de 50%, cuja árvore apresenta os grupos que apareceram em mais de 50% das árvores mais parcimoniosas.

O nível de confiança de cada nó das árvores de MP para as duas matrizes de peso (TS1TV1 e TS1TV2) foi estimado utilizando-se o método não paramétrico *bootstrap* (Felsenstein, 1985) (análise de reamostragem de caracteres da matriz com reposição de dados gerando assim novas matrizes) baseado em 1000 réplicas.

Todas as análises foram realizadas incluindo um indivíduo de *B. vaillantii* como grupo externo.

3.4.2 – Máxima Verossimilhança (MV)

O princípio do algoritmo da máxima verossimilhança - *Maximum Likelihood* - *ML* (Felsenstein, 1981) é avaliar a probabilidade de um determinado modelo de mudanças evolutivas, específico para seqüências nucleotídicas, explicar a origem dos dados observados. Este modelo permite selecionar, a partir da matriz de dados, a topologia que seja mais verossímil. Os parâmetros desse modelo podem ser definidos em função dos próprios dados e o processo de comparação entre os diferentes modelos existentes é baseado no valor de verossimilhança obtido pela aplicação destes diferentes modelos na matriz de dados. Escolhe-se, então, aquele modelo que apresentar o melhor valor probabilístico.

O modelo de evolução molecular utilizado foi definido com o auxílio do programa MODELTEST 3.0 (Posada & Crandall, 1998), sendo que os melhores valores de verossimilhança foram obtidos com o modelo de Hasegawa-Kishino-Yano (HKY 85) (Hasegawa *et al.*, 1985) e os parâmetros definidos a partir da matriz de dados para este modelo foram: proporção de sítios invariáveis, freqüência empírica das bases nucleotídicas, razão TS/TV e parâmetro gamma (Γ).

3.4.3 – Distância Genética

Inicialmente, criou-se uma matriz de distância “*p*” (não corrigida) de onde se extraiu, indiretamente, as proporções de transições e de transversões entre os pares de seqüências nucleotídicas. Subseqüentemente, estas distâncias foram corrigidas para substituições múltiplas (*multiple hits*) aplicando-se o mesmo modelo usado nas análises de máxima verossimilhança (HKY+ Γ +I). Com essa distância estimou-se uma topologia para os táxons estudados, pelo método do agrupamento dos vizinhos (NJ),

como implementado em PAUP (Swofford, 1999). Para verificar possível saturação de transições e transversões, graficou-se a distância p versus transições e distância p versus transversões para cada par de seqüências nucleotídicas.

3.4.4 - Análise dos haplotipos e polimorfismo de DNA

O número de haplotipos dentro e entre as populações amostradas foi determinado com o auxílio do programa COLAPSE 1.1 (http://www.bioag.byu.edu/zoology/crandall_lab/programs.htm).

Várias análises que estimam direta e indiretamente o polimorfismo de DNA foram feitas com o programa DNAsp 3.0 (Rozas & Rozas, 1999). Entre os parâmetros estimados inclui-se: 1) diversidade haplotípica, que é probabilidade de cada duas seqüências serem diferentes em uma população (HD) (Nei, 1987 equação 8.4); 2) diversidade nucleotídica, que indica o número médio de diferenças nucleotídicas por sítio entre as seqüências (Pi) (Nei, 1987 p. 259); 3) média das diferenças nucleotídicas entre pares de indivíduos (K) e respectivas variâncias [observada $V(k)_o$ e esperada $V(k)_e$] (Tajima, 1983; Tajima, 1993); 4) número total de mutações (Eta) (Nei, 1987 equação 10.3); 5) média do número de substituições por sítio (D_{xy}); 6) substituição líquida por sítio (Da) (Nei, 1987) e 7) estimador de fluxo gênico, em termos de número de migrações por ano (Nm) (Nei, 1982). No cálculo de alguns dos parâmetros acima foi adotada a correção de Jukes-Cantor, JC (Jukes & Cantor, 1969) a fim de assegurar a consistência dos dados, dada a impossibilidade de implementar o modelo definido pelo programa MODELTEST (HKY+ Γ +I) em DNAsp.

3.4.5 - Análise de Variância Molecular (AMOVA)

A fim de verificar se a variabilidade molecular encontrada dentro e entre as populações de *B. flavicans* era significativa, foi realizada a análise de variância molecular - AMOVA - (Excoffier *et al.*, 1992) com o auxílio do programa ARLEQUIN 2.0 (Schneider *et al.*, 2000).

A AMOVA consiste em uma análise hierárquica na qual a variância total (Vt) é dividida em componentes covariantes em função do número de mutações entre os haplotipos dentro de cada população (Vc) e entre diferentes populações (Vb). Neste trabalho foram definidas três populações (Belém, Manaus e Letícia), sendo que para cada local foram determinados todos os haplotipos presentes com as suas respectivas frequências. A análise é realizada também levando em consideração uma matriz de distância p não corrigida entre os haplotipos.

Como o mt DNA em peixes é herdado somente da mãe, a razão entre Vb e Vt é uma estimativa do índice de fixação (F_{st}), como definido por Weir & Cockerham (1984). A significância dos índices e da variância total (diversidade genética) foi testada por meio de 1000 permutações não paramétricas dos haplotipos entre as populações (Schneider *et al.*, 2000). Segundo Excoffier *et al.* (1992), isto permite a eliminação de hipóteses e premissas assumidas por análises convencionais de variância inapropriadas para dados moleculares.

3.4.6 - Análise de clados inseridos (*Nested clade analysis*)

A análise de clados inseridos (Templeton *et al.*, 1987; Templeton *et al.*, 1988; Templeton *et al.*, 1992; Templeton *et al.*, 1995) é um algoritmo desenvolvido especificamente para estimar genealogias intra-específicas e testar a hipótese de que

a topologia obtida para os haplotipos também esteja correlacionada a algum tipo de estrutura geográfica. Esta análise foi realizada com as 45 seqüências dos indivíduos de *B. flavicans* (sem o grupo externo). O cladograma intra-específico foi estimado com o auxílio do programa TCS 1.06 (Clement *et al.*, 2000) o qual retira as seqüências redundantes e constrói o cladograma conectando os clados separados por uma única diferença. No caso de dois haplotipos diferirem em uma ou mais bases, o programa TCS assume um haplotipo intermediário “virtual”, que representa haplotipo hipotético (inexistente ou não amostrado). Uma vez definido o cladograma inicial com os haplotipos, a estrutura dos clados inseridos foi realizada manualmente segundo os procedimentos descritos por Crandall & Templeton (1993), Crandall & Templeton (1996) e Crandall (1996) iniciando das “extremidades” para o interior do cladograma. O primeiro passo é juntar todos os haplotipos separados por uma diferença em um clado definido como clado 1-passo, em seguida são definidos os clados de 2-passos que envolvem dois subclados de 1-passo. Posteriormente os de 3-passo que é formado por, no mínimo 2 subclados de 2-passos e prossegue-se assim até que todo o cladograma esteja inserido em um só clado, com vários subclados inseridos. Em seguida foi realizada a análise estatística com o auxílio do programa GEODIS 2.0 (Posada *et al.*, 2000) para testar se os vários níveis do subclado obtidos possuem alguma estrutura geográfica. Estas análises foram feitas com 10000 permutações aleatórias no nível de significância de 5%, e levaram em consideração o número de indivíduos amostrados em cada localidade e as distâncias geográficas das três localidades de onde cada haplotipo foi coletado, estimada em um mapa seguindo o curso do rio (Belém-Manaus 1550 Km, Manaus-Letícia 1680Km e Belém-Letícia 3230 Km). Esta análise realiza um teste de contingência exata no qual é

testada, por permutação, a hipótese nula de que não há associação dos clados com a localidade geográfica. A análise estima ainda dois tipos de distância para cada subclado: distância interna do clado (D_c) e a distância entre clados (D_n) (Templeton *et al.*, 1995). Para o cálculo de D_c , primeiramente é calculada a localização do centro geográfico, a partir do local de coleta de cada indivíduo que possui um haplotipo presente no clado de interesse. Em seguida, é calculada a distância geográfica entre o centro geográfico do clado e cada indivíduo e, a média dessas distâncias é a distância interna do clado (D_c). Para o cálculo da distância entre clados (D_n) é determinado, primeiramente, o centro geográfico do clado do próximo nível superior. Prossegue-se com o cálculo das distâncias entre os indivíduos (representados por cada haplotipo contidos no subclado) e o centro geográfico do clado do próximo nível superior. A distância entre os clados (D_n) é, portanto, a média dessas distâncias (Templeton *et al.*, 1995; Templeton, 1998).

Os resultados obtidos foram interpretados segundo chave de interpretação em termos biológicos de Templeton (1998).

4. RESULTADOS

4.1 - Extração e amplificação da região controle (D-loop)

Foi extraído o DNA total de 15 espécimens de *B. flavicans* coletados em cada uma das localidades amostradas, Belém (BE), Manaus (MA) e Leticia (LE), e de 1 espécimen de *B. vaillantii* coletado em Belém, totalizando 46 amostras de DNA. As amostras de DNA foram submetidas a eletroforese em gel de agarose 0,8% (fig. 01) a fim de serem estimadas suas respectivas concentrações, por meio de comparação visual com marcador molecular com concentração conhecida.

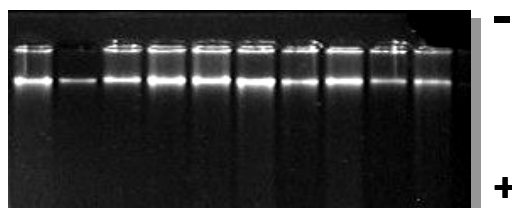


Figura 08 - Eletroforese em gel de agarose 0.8% demonstrando o DNA de 10 espécimens. O marcador de peso molecular não aparece na fotografia.

Após estimada a concentração do DNA dos 46 indivíduos, foi realizada a amplificação da região controle dos mesmos e submetidos à eletroforese (fig. 02).



Figura 09 - Eletroforese em gel de agarose 0.8% da amplificação da região controle do mtDNA de 15 espécimens de *B. flavicans* coletados em Belém. A fileira identificada pelas letras MM e C indicam o marcador molecular e o controle negativo, respectivamente.

4.2 - Seqüências de DNA

Quando alinhadas entre si, a região controle dos 45 espécimens de *B. flavicans* totalizou 1037 bp (anexo I), sendo que não foi necessário introduzir nenhum evento de inserção ou deleção (*indels*) na matriz de dados para o alinhamento das seqüências. Quando o espécimen de *B. vaillantii* foi incorporado à matriz como grupo externo, o alinhamento das 46 seqüências (anexo II) totalizou 1069 pb com a inclusão de 32 *indels*. Na matriz com 46 indivíduos, 905 sítios foram constantes, 129 variáveis e, destes, 35 foram filogeneticamente informativos para parcimônia. Ao considerar somente as 45 seqüências de *B. flavicans*, 983 bp foram constantes, 54 variáveis sendo que destes 30 apresentaram-se filogeneticamente informativos para parcimônia.

A média da composição de bases nucleotídicas calculada foi de 31,90% para Adenina, 21,20% para Citosina, 14,43% para Guanina e 32,47% para Timina (fig.10) e a taxa de transição/transversão (ts/tv) foi de 3.9. Dos 1037 bp, foram observadas 57 substituições nucleotídicas, 54 sítios polimórficos, sendo 45 transições e 12 transversões. Apesar de não existir uma declividade bem definida para transversões, não foi possível observar saturação para transições ou transversões quando a distância genética “p” não corrigida foi plotada contra os dois tipos de mutações (fig. 11).

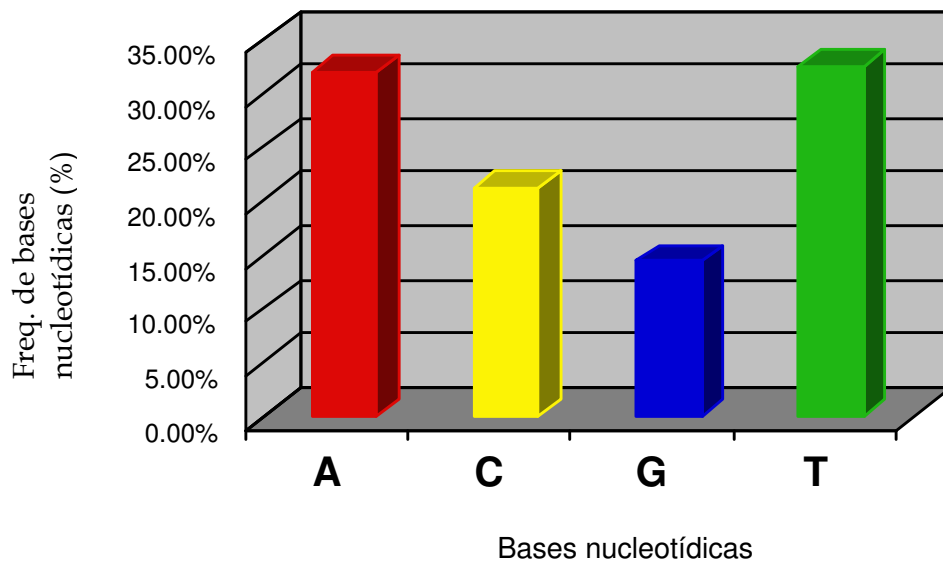


Figura 10 – Porcentagem da frequência de bases nucleotídicas das 45 seqüências da região controle de *B. flavicans*.

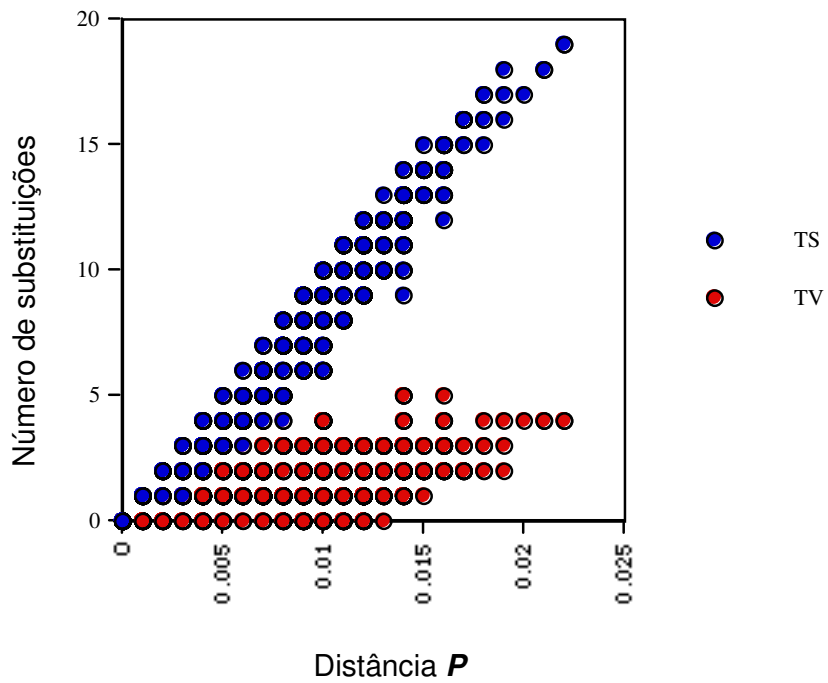


Figura 11 - Número de substituições (transições - TS e transversões - TV) versus distância genética p não corrigida para a região controle do DNA mitocondrial.

4.3 - Análises filogenéticas

4.3.1 - Máxima Parcimônia

Com as matrizes de pesos iguais (TS/TV) e diferenciados (TS1/TV2) as análises de MP resultaram, para cada uma, em quatro árvores igualmente parcimoniosas. A descrição das árvores pode ser visualizada na tabela 01 e a árvore de consenso estrito para TS1TV1 e TS1TV2 nas figs. 12 e 13, respectivamente. As duas árvores de consenso estrito apresentaram exatamente a mesma topologia.

4.3.2 - Máxima Verossimilhança

Para as análises de máxima verossimilhança (MV) foi utilizado o modelo de HKY+ Γ +I, a partir do teste de taxa de verossimilhança (*likelihood ratio test*) implementado em MODELTEST, sendo que os seguintes parâmetros e respectivos valores foram definidos pelo programa: Proporções de sítios invariáveis= 0.633; parâmetro Gamma= 0.6723; Taxa de ts/tv= 4.55 e frequências de bases nucleotídicas A= 0.3194, C= 0.2115, G= 0.1428, T= 0.3263. Com tais parâmetros foi obtida uma árvore (fig.14) com $-\ln = 2508.26406$ (tabela 01).

4.3.3 - Distância genética

A árvore de distância, gerada segundo o modelo de HKY+ Γ +I e pelo método do agrupamento dos vizinhos, pode ser visualizada na fig. 15.

A matriz de distância genética par a par, também determinada por esse modelo, para todos os 45 indivíduos *B. flavicans* está na tabela 02. A distância genética entre *B. flavicans* e *B. vaillantii* (utilizado como grupo externo) variou entre 36.0 a 48.7%, enquanto que a distância entre os indivíduos de *B. flavicans* ficou entre

0.0% e 3.5%. A tabela 03 apresenta as distâncias médias dentro e entre as populações de *B. flavicans*.

Com o objetivo de compilar todos os resultados em uma única árvore para uma melhor visualização dos resultados, foi computada uma árvore de consenso pela regra da maioria de 50%, a partir de todas as árvores obtidas pelos três métodos (máxima parcimônia, máxima verossimilhança e distância genética). Esta árvore pode ser visualizada na fig.16.

Tabela 01 - Sumário dos métodos filogenéticos utilizados e seus respectivos resultados MP (Máxima Parcimônia), MV (Máxima Verossimilhança), NJ (método do agrupamento dos vizinhos), L (comprimento da árvore), Ln (log da árvore de MV), CI (índice de consistência), RI (índice de Retenção).

Método		L ou Ln	Nº árvores	CI	RI	N. de rearranjos	Topologia
MP	TS1TV1	208	4	0.822	0.809	70.876.409	fig.12
	TS1TV2	271	4	0.838	0.802	48.038.554	fig.13
MV	HKY+Γ+I	-Ln=2508.26406	1			191.962	fig.14
Distância	NJ/HKY		1				fig.15
Cons.50%			1				fig.16

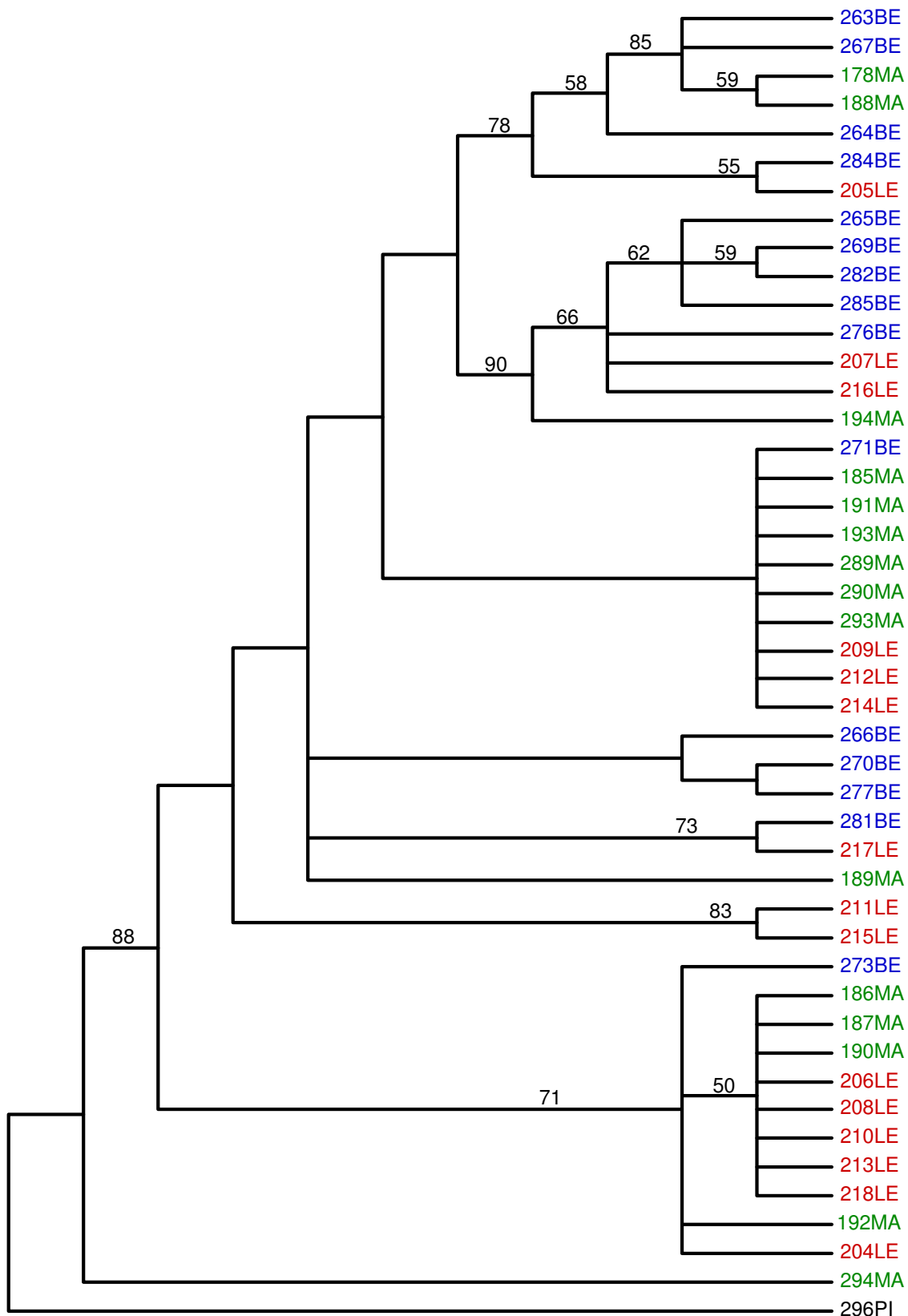


Figura 12 - Consenso estrito de 4 árvores de MP (L = 208; CI = 0.822; RI = 0.809) considerando matriz de peso TS1TV1. Os números acima dos braços são valores de *bootstrap* para 1000 replicações, sendo que somente os valores acima de 50% são mostrados. Os táxons em azul foram coletados em Belém, em verde em Manaus e em vermelho em Letícia. Em preto, o táxon *B. vaillantii* utilizado como grupo externo.

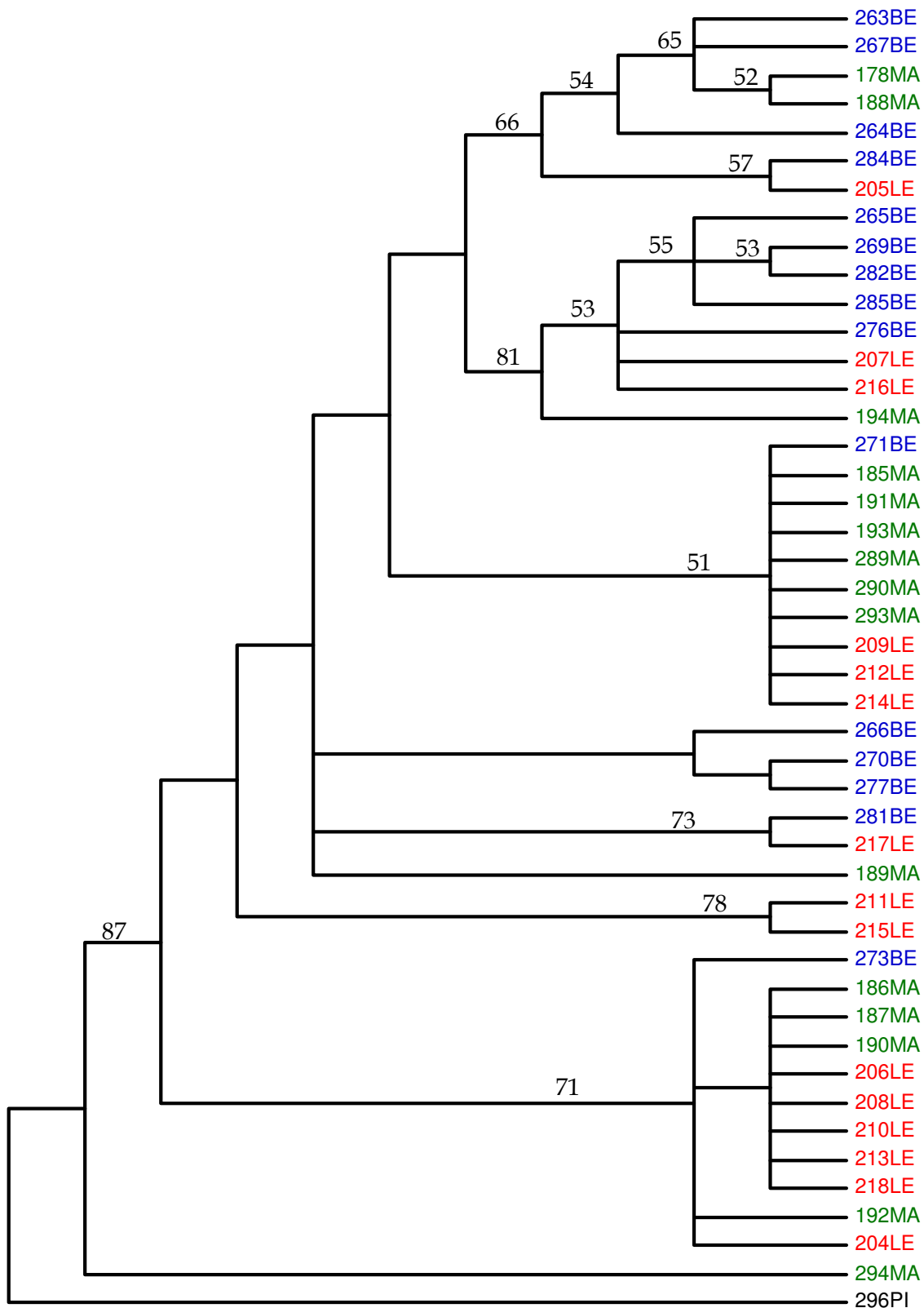


Figura 13 - Consenso estrito de 4 árvores de MP considerando a matriz de peso diferenciado TS1TV2 (L =271; CI = 0.838; RI = 0.802). Os números acima dos braços são valores de *bootstrap* para 1000 replicações. Somente os valores acima de 50% são mostrados. Os táxons em azul foram coletados em Belém, em verde em Manaus e em vermelho em Letícia. Em preto, o táxon *B. vaillantii* utilizado como grupo externo.

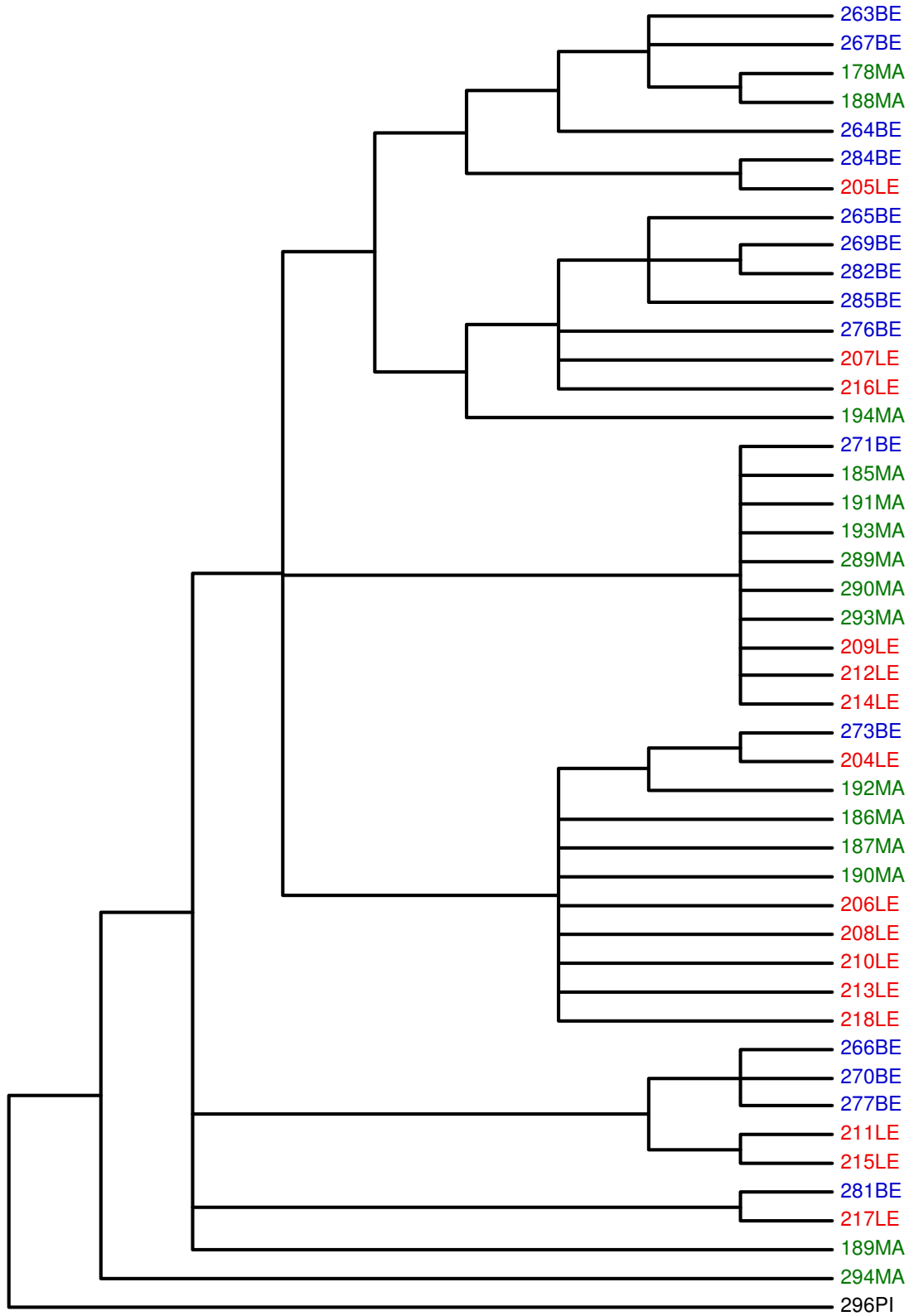


Figura 14 - Árvore obtida por Máxima Verossimilhança (- Ln = 2508.26406) com os indivíduos de *B. flavicans* das 3 localidades. Os táxons em azul foram coletados em Belém, em verde em Manaus e em vermelho em Letícia. Em preto, o táxon *B. vaillantii* utilizado como grupo externo.

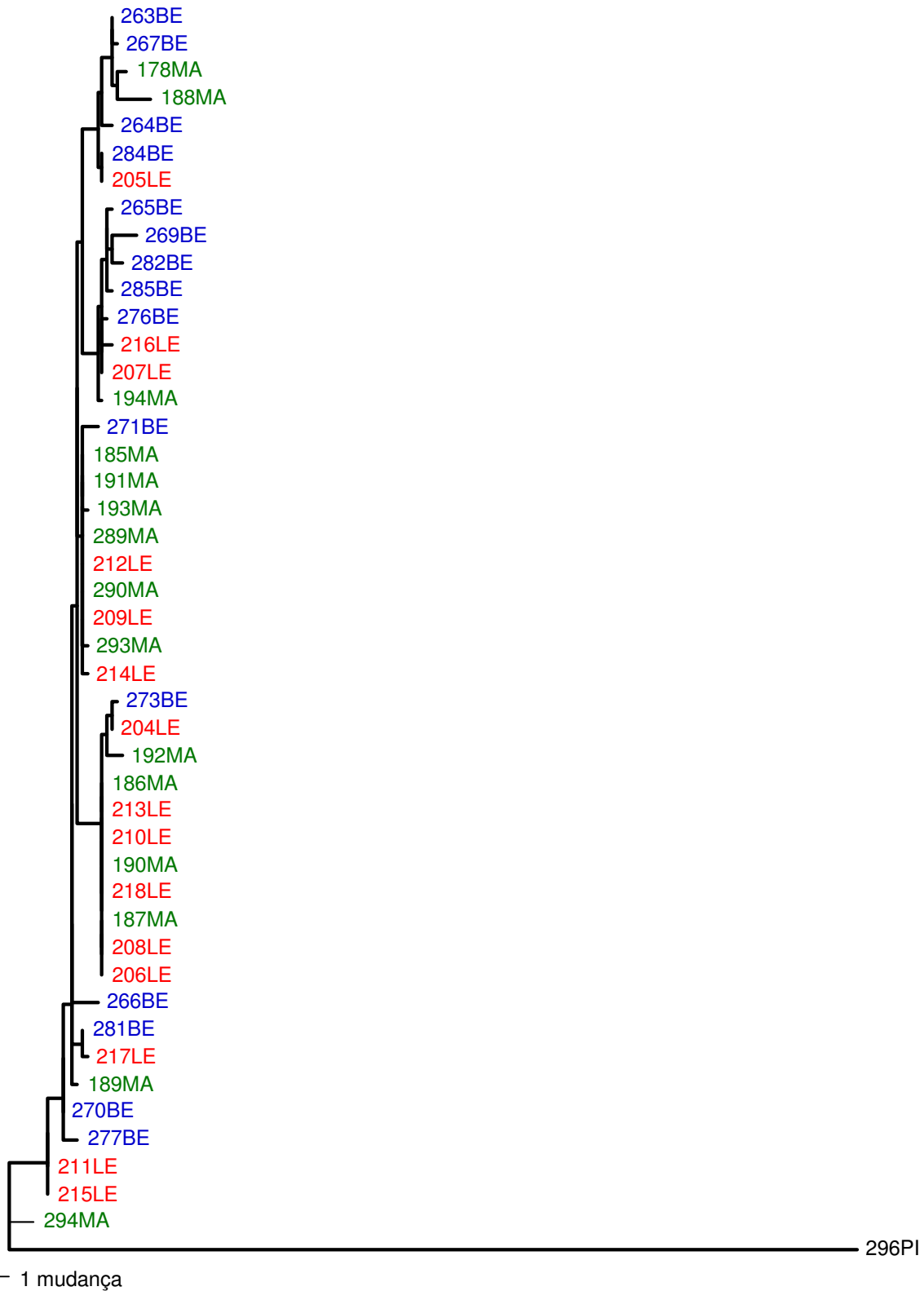


Figura 15 - Árvore de distância genética com os 45 indivíduos de *B. flavicans*, obtida pelo agrupamento dos vizinhos, usando o modelo de correção das distâncias de HKY+ Γ +I. Os táxon em azul foram coletados em Belém, em verde em Manaus e em vermelho em Letícia. Em preto, o táxon *B. vaillantii* utilizado como grupo externo.

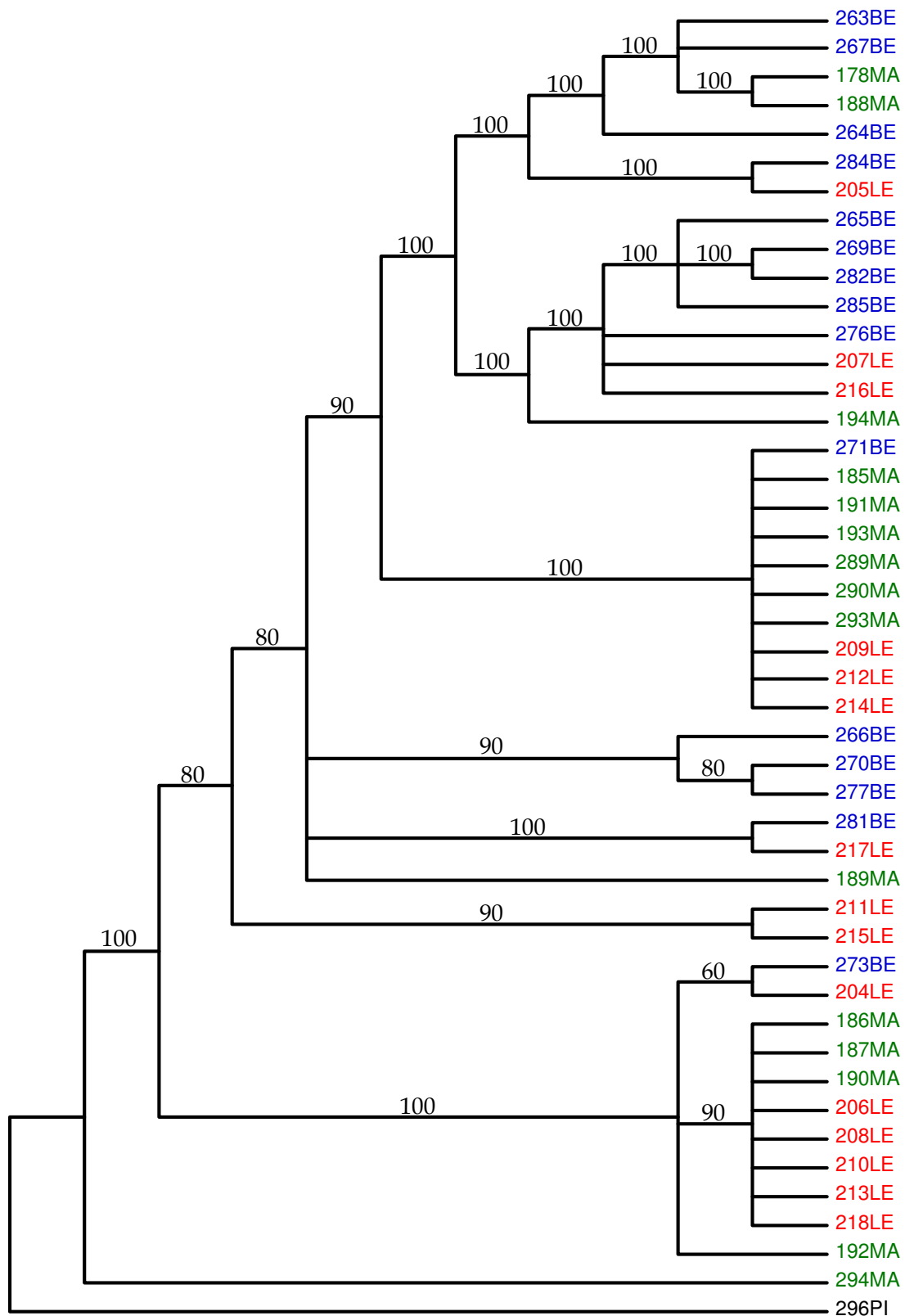


Figura 16 - Consenso pela regra da maioria de 50% de todas as árvores (10 árvores) obtidas por máxima parcimônia, máxima verossimilhança e distância. Os valores acima dos braços foram obtidos pelo mesmo consenso. Os táxons em azul foram coletados em Belém, em verde em Manaus e em vermelho em Letícia. Em preto, o táxon *B. vaillantii* utilizado como grupo externo.

Tabela 03 – Média da distância genética inter e intrapopulacional (em porcentagem) obtida segundo o modelo de HKY dentro e entre as populações de *B. flavicans*.

	Belém	Manaus	Letícia
Belém	1.2 ± 0.5		
Manaus	1.2 ± 0.7	1.0 ± 0.7	
Letícia	1.1 ± 0.4	0.9 ± 0.6	0.8 ± 0.4

4.4 - Análises populacionais

4.4.1 - Análise e distribuição dos haplotipos

Quando as três populações foram consideradas separadamente, 34 haplotipos foram definidos, sendo 15 coletados em Belém, 10 em Manaus e 9 em Letícia. Ao identificar-se os *singletons* (haplotipo representado por uma única seqüência ou indivíduo na população) de cada localidade, Belém teve 15 (nenhum haplotipo se repetiu), Manaus teve 8 (haplotipos D17 e D18 se repetiram 4 e 3 vezes, respectivamente) e Letícia 6 (haplotipo D17 repetiu 2 vezes, D18 5 vezes e D28 2 vezes). Pelo fato de alguns haplotipos estarem presentes em Belém e Letícia (D14) e Manaus e Letícia (D17 e D18), 31 haplotipos e 27 *singletons* foram identificados quando os três locais (45 indivíduos) foram considerados conjuntamente (tabela 04).

Tabela 04 - Haplotipos de *B. flavicans* encontrados entre 45 indivíduos com suas localidades, frequências e espécimens correspondentes.

Haplotipos	Freq.	Localidade	Nº dos espécimens
D1	1	Belém	263BE
D2	1	Belém	264BE
D3	1	Belém	265BE
D4	1	Belém	266BE
D5	1	Belém	267BE
D6	1	Belém	269BE
D7	1	Belém	270BE
D8	1	Belém	271BE
D9	1	Belém	273BE
D10	1	Belém	276BE
D11	1	Belém	277BE
D12	1	Belém	281BE
D13	1	Belém	282BE
D14	2	Belém, Letícia	284BE, 205LE
D15	1	Belém	285BE
D16	1	Manaus	178MA
D17	6	Manaus, Letícia	185MA, 191MA, 289MA, 290MA, 209LE, 212LE
D18	8	Manaus, Letícia	186MA, 187MA, 190MA, 206LE, 208LE, 210LE, 213LE, 218LE
D19	1	Manaus	188MA
D20	1	Manaus	189MA
D21	1	Manaus	192MA
D22	1	Manaus	193MA
D23	1	Manaus	194MA
D24	1	Manaus	293MA
D25	1	Manaus	294MA
D26	1	Letícia	204LE
D27	1	Letícia	207LE
D28	2	Letícia	211LE, 215LE
D29	1	Letícia	214LE
D30	1	Letícia	216LE
D31	1	Letícia	217LE

4.4.2 - Análises de polimorfismo de DNA

As abreviações utilizadas nas análises de polimorfismo de DNA, cujos resultados estão apresentados nas tabelas 05 (populações individuais) e 06 (comparação entre populações), referem-se as seguintes informações: **N**, número de seqüências (indivíduos de cada população); **H**, freqüência haplotípica; **pb**, tamanho das seqüências nucleotídicas em pares de bases; **S**, sítios polimórficos; **ETA**, número total de mutações; **HD**, diversidade haplotípica; **Pi**, diversidade nucleotídica com correção de JC; **K**, média das diferenças nucleotídicas par a par; **V(k)o**, variância observada de **K**; **V(k)e**, variância esperada de **K**; **ETA(t)**, número total de mutações entre as populações; **p1m2**, sítios polimórficos na população 1 e monomórficos na população 2; **p2m1**, sítios polimórficos na população 2 e monomórficos na população 1; **DF**, diferenças fixadas nas populações; **MC**, número de mutações compartilhadas entre as populações; **Pi(t)**, diversidade nucleotídica total; **Dxy**, média de substituições por sítio entre as populações com correção de JC; **Da**, substituição por sítio líquida entre as populações com correção de JC; **K(ep)**, número médio de diferenças nucleotídicas entre as populações e **Nm**, número estimado de migrações por geração.

Tabela 05 - Resultados da análise de polimorfismo de DNA, obtidos através da análise das seqüências nucleotídicas da região controle, entre os indivíduos de *B. flavicans* das três localidades. O valor abaixo dos números é o desvio padrão.

Pop.	N	H	pb	S	ETA	HD	Pi	K	V(k)o	V(k)e
Belém	15	15	1037	38	39	1.000 (0.024)	0.0095 (0.0007)	9.705	12.17	22.24
Manaus	15	10	1037	34	36	0.914 (0.056)	0.0079 (0.0015)	8.143	27.20	16.03
Letícia	15	9	1037	22	23	0.886 (0.069)	0.0064 (0.0007)	6.543	11.93	10.74

Tabela 06 - Resultados da análise de polimorfismo de DNA entre pares de populações de *B. flavicans* obtidos através das seqüências nucleotídicas da região controle.

	N	S	ETA(t)	P1m2	P2m1	DFMC	Pi	k	Dxy	Da	K(ep)	Nm
Belém (1)												
X	3052	55	19	16	0	20	0.00912	9.416	0.0064	0.00093	9,876	5.39
Manaus(2)												
Manaus(1)												
X	3038	40	17	4	0	19	0.00702	7.271	0.0070	-0.00014	7.204	19.52
Letícia(2)												
Belém(1)												
X	3042	43	20	4	0	19	0.00833	8.595	0.0088	0.00089	9.036	5.22
Letícia(2)												

Com o objetivo de resumir a variabilidade nucleotídica dos indivíduos de *B. flavicans*, a figura 17 apresenta um histograma ilustrativo contendo: a frequência haplotípica, *H*; número de sítios polimórficos, *S*; número total de mutações, *ETA* e a média das diferenças nucleotídicas par a par, *K*, em cada uma das localidades amostradas.

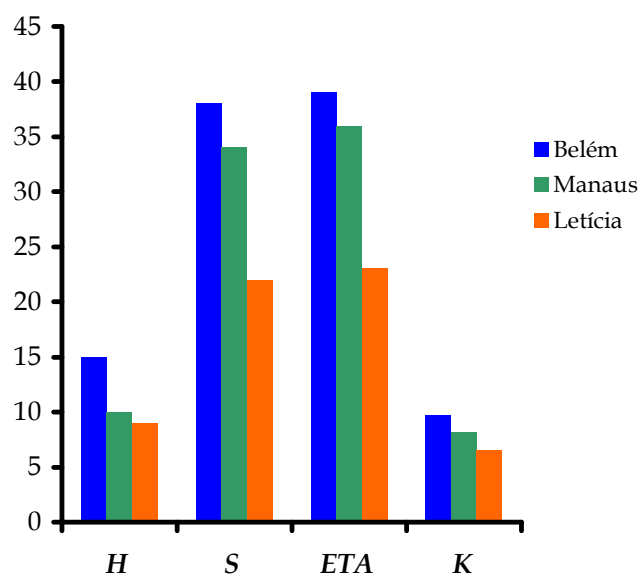


Figura 17 - Histograma representativo da variabilidade nucleotídica observada nas amostras de *B. flavicans* provenientes de Belém (azul), Manaus (verde) e Letícia (vermelho). *H*, frequência haplotípica; *S*, número de sítios polimórficos; *ETA*, número total de mutações; *K*, média da variabilidade nucleotídica par a par.

Nota-se que, para todos os valores representados, os valores relativos à variabilidade genética são maiores em Belém e menores em Letícia.

4.5 - Análise de Variância Molecular (AMOVA)

A tabela 07 apresenta os resultados da análise de variância molecular (AMOVA) obtidos dentro e entre as três populações de *B. flavicans*. Os componentes variantes, *Vb* e *Vc*, expressam, respectivamente, as variâncias resultantes das diferenças inter e intrapopulacionais.

Verificou-se que 93.39% da variância total foi observada dentro das populações e 6.61% distribuída entre elas ($F_{st} = 0.0661$, $P < 0.05$). A variabilidade genética foi significativamente diferente entre as populações de Belém e Manaus ($F_{st} = 0.10$; $P < 0.01$) e Belém e Letícia ($F_{st} = 0.10$; $P < 0.05$). Estatisticamente, a população de Belém possui maior diversidade genética do que as populações de Manaus e Letícia. Não há diferença significativa entre Manaus e Letícia, quanto à diversidade genética.

Tabela 07 - Resultado da análise de variância molecular (AMOVA) inter e intrapopulacional. *Vb* = variância em cada população; *Vc* = variância entre as três populações. O valor de *P* foi estimado mediante 1000 permutações aleatórias.

Tipos de variantes	Componentes variantes	%	F_{st}	<i>P</i>
Interpopulacional	0.288 <i>Vb</i>	6.61	0.0661	<0.05
Intrapopulacional	4.065 <i>Vc</i>	93.39		
Total	4.353 <i>Vt</i>			

4.6 - Análise de clados inseridos (*Nested clade analysis*)

Para a construção do cladograma foi usado o princípio da máxima parcimônia nos limites de conexão entre os 31 haplotipos de *B. flavicans*, de forma que os haplotipos, separados entre si por até 14 passos (cada passo representa uma mutação), tiverem a probabilidade ≥ 0.95 de terem sido conectados parcimoniosamente.

A figura 18 contém o cladograma dos haplotipos, obtidos com o procedimento descrito na metodologia. Os clados e subclados que contém variação genética (mais de um haplotipo) ou geográfica (haplotipos de mais de uma localidade) são numerados em níveis hierárquicos de 1 a 5. Os clados de 1 passo (1-1 até 1-26) são subclados para os clados de 2 passos e assim sucessivamente. No cladograma de haplotipos também é definido se cada clado é localizado no interior ou na extremidade. A estrutura do cladograma usada conjuntamente com a informação geográfica dos haplotipos definem Dc e Dn.

Na tabela 08 estão esquematizados os resultados obtidos com a análise estatística da estrutura do cladograma de haplotipos de *B. flavicans* das três localidades (fig.18). Nessa tabela é possível verificar também os procedimentos seguidos, durante a inferência biológica junto à chave de Templeton (1998), a partir dos resultados estatísticos obtidos com o GEODIS.

Estes resultados mostram que para os clados do passo 1 ao 4 não houve distâncias (Dc e Dn) significativas. Só foram obtidas distâncias significativas para o nível de passo 5 o qual representa todo o cladograma.

A análise realizada com intuito de verificar se havia alguma estruturação genética associada à distribuição geográfica falhou em revelar tal associação.

Portanto, os haplotipos coletados não apresentaram indícios de estruturação genética associada à geografia. Não se pode distinguir (sub) populações isoladas para *B. flavicans*.

Tabela 08 – Resultado da chave de inferência de interpretação biológica (Templeton, 1998) determinado a partir dos resultados estatísticos obtidos da análise de clados inseridos, conforme cladograma da figura 18.

Clado	Passos seguidos na chave	Inferência
Todos os clados dos passos 1 ao 4.	1- Não	Não é possível rejeitar H_0 (não há associação geográfica dos haplotipos)
Passo-5 (Cladograma total)	1-2-3-5-6-7-Sim	Fluxo gênico restrito e/ou dispersão, mas com alguma dispersão de longa distância

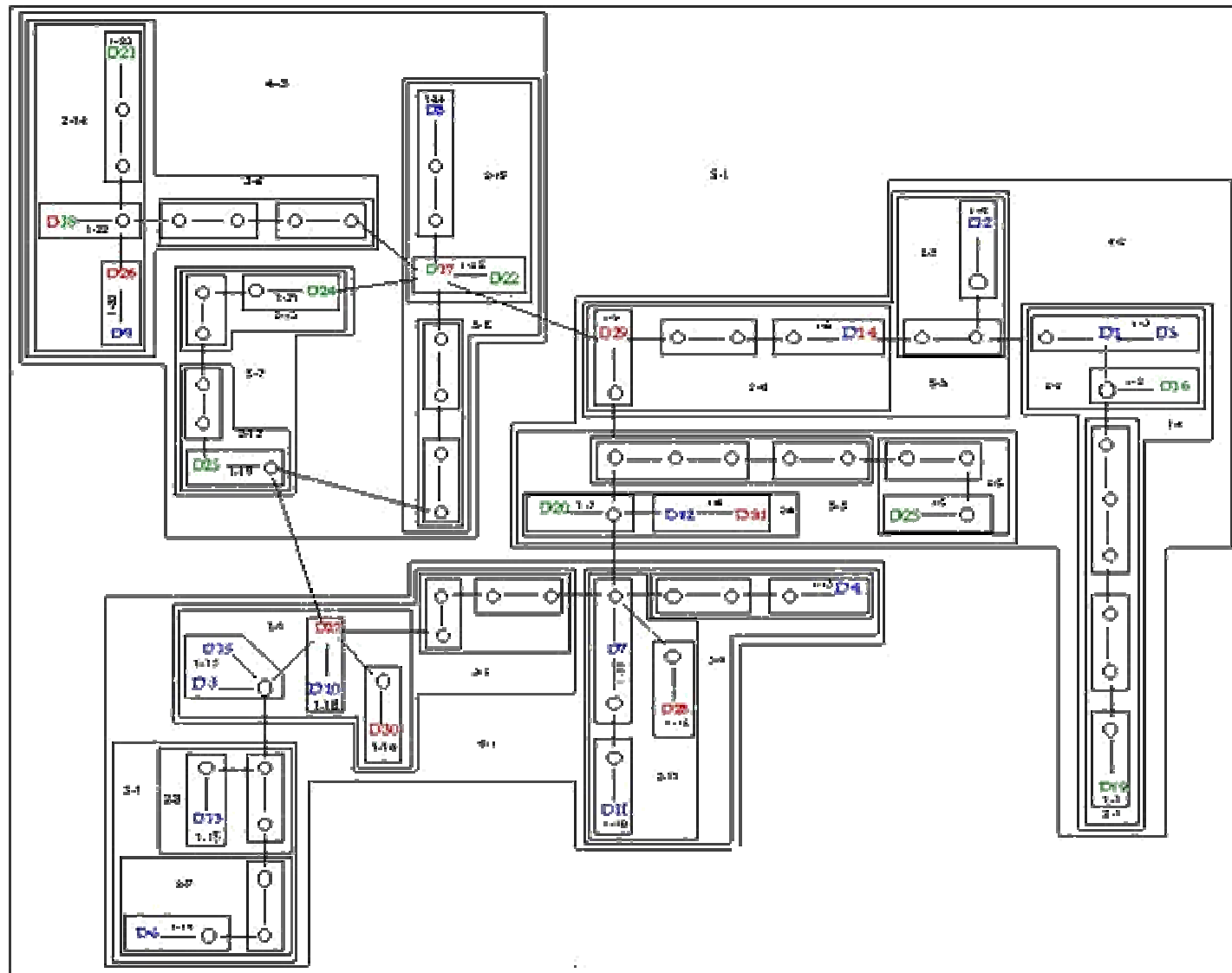


Figura 18 - Estrutura do cladograma com os 31 haplotipos de *B. flavicans*, e seus respectivos níveis de passo, estimado pela análise de clados inseridos. O "0" indica as OTUs ou haplotipos intermediários hipotéticos. Os haplotipos destacados em azul foram coletados em Belém, os em verde em Manaus e os em vermelho em Letícia e os com duas cores em localidades conforme as cores correspondentes às três localidades citadas.

5. DISCUSSÃO

A dourada - *Brachyplatystoma flavicans* - é uma das duas espécies de peixes, pertencente à família Pimelodidae, mais importantes comercialmente ao longo do eixo Estuário-Amazonas-Solimões (EAS), tanto para a pesca local como para a exportação aos mercados internacionais.

A partir da hipótese de migração sugerida por Barthem & Goulding (1997), de que esta espécie possui áreas diferenciadas de reprodução, criação e alimentação, e levando-se em conta que estas áreas estão localizadas em território de cinco países, é necessário avaliar se existe um único estoque, com ampla distribuição incluindo o eixo EAS, ou vários, migrando ao longo de toda essa área. Paralelamente, também é necessário verificar a estrutura e variabilidade genética dessa espécie ao longo da sua área de distribuição. Isso é importante para que se possam traçar metas e estratégias de manejo que considerem não apenas questões biológicas, no seu sentido amplo, como também as de caráter sócio-geográfico e, por conseguinte, políticas.

A hipótese migratória, no entanto, nunca foi testada, até o momento, sob o ponto de vista genético e esse trabalho torna-se pioneiro nesse sentido. Além de testar a hipótese de migração, o pioneirismo desse trabalho também se reflete em seus objetivos, que estão voltados para uma espécie de pescado da região Amazônica, de ampla distribuição e de importância comercial bem estabelecida.

Diante desse contexto, procurou-se, então, acessar as relações filogenéticas, a variabilidade genética e a existência ou não de segregação genética em indivíduos de *B. flavicans* coletados em três localidades ao longo do eixo EAS, sendo elas: Belém, mais especificamente a área estuarina e que, segundo a hipótese de migração, recebe indivíduos gerados em todas as cabeceiras provenientes da Amazônia ocidental,

Manaus que representa a área da Amazônia central onde os jovens, provenientes do estuário, alimentam-se e crescem, e Letícia, área onde são capturados os indivíduos adultos e aptos para a reprodução, vindos da Amazônia central e oriental. Então, com o intuito de verificar se a hipótese migratória também é corroborada do ponto de vista genético, ou seja, uma única população geneticamente homogênea encontra-se na Amazônia, quatro diferentes análises foram realizadas. Tais análises são: análises filogenéticas, análise de polimorfismo de DNA, análise de variância molecular e análise de clados inseridos. Os resultados, mostrados anteriormente, serão discutidos a seguir.

5.1 - Análises filogenéticas

Primeiramente, foram realizadas análises filogenéticas mediante três princípios metodológicos distintos: Máxima Parcimônia, Máxima Verossimilhança e Distância, pois mediante estes métodos, é possível estimar a topologia mais provável que possa refletir a história evolutiva e as relações filogenéticas de um determinado grupo de táxons.

A árvore obtida por máxima parcimônia com a matriz de pesos iguais para transições e transversões, TS1TV1, (fig. 12; L = 208; CI = 0.822; RI = 0.809) e a obtida pela matriz de pesos diferenciados, TV1TV2, (fig. 13; L = 271; CI = 0.838; RI = 0.802) apresentaram exatamente a mesma topologia, sendo que, nesta topologia, indivíduos coletados em Belém, Manaus e Letícia encontraram-se misturados na árvore. Este primeiro resultado, oriundo das análises filogenéticas, é uma evidência forte de que não há segregação genética entre os indivíduos das três localidades. Nas árvores, fica claro que alguns indivíduos, provenientes de uma determinada localidade, são geneticamente mais próximos de indivíduos provenientes de outras localidades do

que indivíduos da mesma localidade. Por exemplo, o espécimen 281BE, coletado em Belém, em todas as árvores filogenéticas (figuras 12, 13, 14, 15 e 16) é o indivíduo mais próximo do espécimen 217LE, que pertence à população de Letícia, do que de outros indivíduos de Belém. Outros exemplos similares podem ser vistos na árvore.

Um estudo realizado por Doukakis *et al.* (1999) também utilizou o método da máxima parcimônia em estrutura populacional das subespécies de duas espécies de esturjão que ocorrem na Eurásia, *Acipenser baerii* e *A. stellatus*. Dentre os quatro segmentos de mtDNA utilizados, os autores verificaram que a região controle era o fragmento mais variável. A topologia obtida com as subespécies de *A. baerii* mostrou estruturação geográfica entre os haplotipos correspondentes, porém não foi verificada nenhuma subdivisão intra-específica com a topologia obtida com as subespécies de *A. stellatus*, como mostram também os resultados obtidos nesse trabalho para os indivíduos de *B. flavicans* das três localidades.

Com relação à topologia obtida por máxima verossimilhança, segundo o modelo de evolução molecular HKY+ Γ +I empregado (fig. 14; $-\ln = 2508.26406$), repete-se de uma maneira geral, a mesma topologia obtida com parcimônia, reforçando o conceito de que não existe um padrão de segregação genética entre os indivíduos de *B. flavicans* coletados em Belém, Manaus e Letícia. Verifica-se, porém, que existem algumas diferenças entre as topologias obtidas por máxima parcimônia (TS1TV1 e TS1TV2, figs. 12 e 13 respectivamente) e a topologia obtida por máxima verossimilhança (fig. 14), quanto à localização de alguns indivíduos nas árvores.

Embora tenham ocorrido algumas diferenças de ordem topológica entre as árvores de MP e MV, esses resultados não modificam a inferência principal

proveniente de ambas, de que não há segregação genética entre os indivíduos de *B. flavicans* coletados em Belém, Manaus e Letícia.

Sivasundar *et al.* (2000) também utilizaram o método de máxima verossimilhança no propósito de estudar a filogeografia e a estrutura genética de *Prochilodus lineatus* (curimatã). Os autores também utilizaram a região controle do mtDNA, obtidas de 26 indivíduos provenientes de 12 localidades da Bacia do Paraná. Verificaram que as relações filogenéticas entre as populações dessa espécie mostraram ser bem resolvidas, no entanto, não sugerem segregação genética entre os diferentes rios.

Resultados obtidos por Porto (1999), utilizando também a região controle em um estudo filogeográfico de *Mylesinus paraschomburgkii* (pacu), proveniente de três bacias de drenagem amazônicas (Uatumã, Trombetas e Jarí), indicam que poderia haver uma estruturação e segregação genética entre as populações dessas bacias. Apesar do número reduzido de espécimens utilizados, indivíduos das diferentes bacias são bem separados nas topologias obtidas por máxima parcimônia e distância genética utilizando o agrupamento dos vizinhos, sugerindo segregação genética em função do rio estudado.

Os resultados, obtidos pelo método de distância (tabela 01) para os 45 indivíduos de *B. flavicans*, demonstraram variação entre 0.0 a 3.5% para valores corrigidos pelo modelo HKY 85. No entanto, as comparações par a par das populações demonstraram que a distância genética corrigida variou entre 0.0 e 2.3 % entre os indivíduos de *B. flavicans* coletados em Belém, entre 0.0 e 3.5% entre os de Manaus, e de 0.0 a 1.5% entre os de Letícia. Quando se analisam as distâncias corrigidas entre os pares de populações, obtem-se distâncias de 0.2 a 3.5% entre os de

Belém e Manaus, de 0.0 a 2.3% entre os de Belém e Letícia e 0.0 a 2.9% entre os de Manaus e Letícia. A distância entre *B. flavicans* e *B. vaillantii* (utilizado como grupo externo) variou entre 36.0 a 48.7%. A maior distância média ocorrida entre os indivíduos de Manaus deu-se em função de dois, entre os 15 indivíduos dessa localidade, possuem os maiores valores de substituições nucleotídicas na matriz. Primeiramente o espécimen 294MA, com o maior número de mutações e, em segundo lugar o espécimen 188MA (tabela 02). A variabilidade média intrapopulacional, porém, foi maior em Belém, como será discutido posteriormente.

Sivasundar *et al.* (2000), puderam verificar que a divergência entre as seqüências nucleotídicas dos haplotipos de *P. lineatus* foi maior na região controle do que no gene mitocondrial ATPase e variou entre 0.3 a 3.6%, enquanto Porto (1999) verificou que a divergência entre as seqüências nucleotídicas de *M. paraschomburgkii*, provenientes das três bacias, variou entre 0.0 a 6.9%, para o mesmo seguimento seqüenciado neste estudo.

A árvore obtida por distância genética (fig. 15) com os 45 indivíduos de *B. flavicans* também demonstra algumas diferenças com relação à posição de alguns táxons ao compará-la às árvores obtidas por MP e MV. Porém, esta também corrobora o que fora observado nas árvores de MP e MV, de que as populações de *B. flavicans* de cada local não estão segregadas geneticamente, uma vez que indivíduos de diferentes localidades ficam agregados em clados monofiléticos na árvore.

No intuito de compilar a informação contida nas árvores obtidas pelos três métodos e ressaltar os grupos monofiléticos obtidos em todas as árvores, foi feito um consenso de todas as árvores obtidas por MP, MV e distância. A figura 16 apresenta esta árvore de consenso, obtida pela regra da maioria de 50%, entre todas as 10

árvores (4 árvores de MP TS1TV1, 4 árvores de MP TS1TV2, 1 árvore MV e 1 árvore de distância genética). Esta árvore de consenso, como o esperado, exprime a inexistência de segregação e/ou estruturação genética associada à distribuição geográfica entre os indivíduos de *B. flavicans* coletados nas três localidades (Belém, Manaus e Letícia) provenientes da calha do rio Solimões/ Amazonas.

Em todas as árvores obtidas pelos três algoritmos, o espécimen 294MA coletado em Manaus foi o táxon mais basal em relação ao grupo externo *B. vaillantii*. Este espécimen de *B. flavicans* obteve uma das maiores substituições nucleotídicas, ao compará-lo com os demais espécimens, variando entre 11 a 23 substituições para a região controle.

5.2 - Análises populacionais

5.2.1 - Distribuição dos haplotipos

Entre os 31 haplotipos identificados entre as 45 seqüências nucleotídicas de *B. flavicans* (tabela 04), englobando os indivíduos das três localidades, verificou-se que 27 são *singletons* e 4 (D14, D17 e D18 e D28) são representados por mais do que uma seqüência nucleotídica. O haplotipo D14 foi encontrado em 1 indivíduo de Belém e outro de Letícia, D17 esteve representado 4 vezes em Manaus e 2 vezes em Letícia e D18 3 vezes em Manaus e 5 em Letícia. Finalmente, o haplotipo D28 foi representado por dois indivíduos coletados em Letícia. A distribuição e ocorrência desses haplotipos sugerem uma maior similaridade entre os indivíduos de Manaus e Letícia.

Dos 27 *singletons* encontrados, 14 são provenientes de Belém (N= 15 e HD = 1.000, ver tabela 05), 8 de Manaus (N = 15; HD = 0.914) e 5 de Letícia (N = 15; HD =

0.886). Desta forma, em termos de diversidade haplotípica, estes resultados sugerem que a maior variabilidade genética está localizada em Belém e a menor em Letícia. Em função desses valores, a variabilidade parece aumentar no sentido das cabeceiras para o estuário (Letícia → Belém). Uma das prováveis explicações para este dado é o fato de a região do estuário amazônico, em Belém, congregar indivíduos provenientes das cabeceiras de todos os afluentes da Amazônia ocidental, portanto, é de se esperar que a variabilidade genética no estuário seja maior. Já a região da Amazônia central, representada pela população de Manaus, apresentou diversidade haplotípica intermediária, ou seja, entre a área de reprodução (cabeceiras) e de criação (estuário) para os indivíduos de *B. flavicans*.

5.2.2 - Análises de polimorfismo de DNA

A figura 17 apresenta um histograma comparativo da variabilidade nucleotídica observada nas amostras de *B. flavicans* provenientes das três localidades. Pode-se notar, em confirmação com os resultados da frequência e distribuição de haplotipos, que em Belém a variabilidade é maior, comparada com as populações de Manaus e Letícia (tabela 05 e 06). Essa maior variabilidade em Belém pode ser inferida em função deste local ter apresentado as maiores estimativas para os seguintes índices: de diversidade haplotípica ($HD = 1.000$; discutida anteriormente), número de sítios polimórficos ($S = 38$) e, por conseguinte o do número total de mutações ($ETA = 39$), diversidade nucleotídica ($Pi = 0.0095$), média de diferenças nucleotídicas ($K = 9.705$) e número de sítios polimórficos não compartilhados entre as populações (ver tabela 06). Esses resultados reforçam também uma das prováveis explicações de que a variabilidade genética é maior no estuário em função dessa

região congregar os indivíduos nascidos nas diferentes cabeceiras do sistema Solimões-Amazonas.

Pode-se sugerir, também, pela análise da figura 17, que a queda da variabilidade nucleotídica entre Belém e Manaus possa ser devido ao fato de uma parte considerável dos cardumes migrantes adentrarem o rio Madeira. Não se sabe com certeza se *B. flavicans* também sobe outros afluentes do rio Amazonas que não sejam de água branca, como Tocantins, Tapajós, Xingu, Trombetas, Uatumã, Jarí e Negro. Relatos esporádicos de *B. flavicans* são conhecidos para o rio Branco (Juan Alonso, com. Pessoal), mas aparentemente as migrações de dourada são associadas com os produtivos rios de água branca (Barthem & Goulding, 1997). Desta maneira, uma queda maior quanto à variabilidade genética pode ser esperada quando se compara Belém e Letícia de que quando se compara Belém e Manaus. Os valores de S e ETA na fig. 17 refletem particularmente esta idéia.

A ausência de diferenças fixadas (DF) entre os indivíduos de *B. flavicans* das três localidades (tabela 06), em termos de variabilidade genética, pode ser considerada como um indicador de que, apesar das diferenças em termos de diversidade haplotípica, estes indivíduos não estão isolados geneticamente.

Segundo Kimura & Maruyama (1971) as populações podem ser diferenciadas, no ponto de vista genético, quando o estimador de fluxo gênico Nm (onde N é o tamanho efetivo da população de fêmeas e m é a taxa de mutação/sítio por geração) assumir valores menores de que 1, ao passo que as mesmas podem ser consideradas como uma única unidade populacional panmítica quando a estimativa de Nm assumir valores maiores de que 4. Nesse estudo as estimativas dos valores das taxas de migração por geração, Nm , estimadas entre as populações, foram maiores de que 4

(tabela 06; 5.39 entre os indivíduos de Belém e Manaus, 19.52 entre os de Manaus e Letícia e 5.22 entre os de Belém e Letícia) sugerindo que ocorrem fortes eventos de migração e/ou mistura, por conseguinte, fluxo gênico entre os indivíduos de *B. flavicans* das três localidades e que estes constituem uma só população. Ademais, os valores relativamente baixos de diversidade nucleotídica (P_i) intra e interpopulacionais, assim como da média de substituições por sítio (D_{xy}) e da substituição líquida entre elas (D_a) parecem reforçar tal hipótese (tabela 05 e 06).

5.3 - Análise de variância molecular - AMOVA

O nível de diversidade genética e diferenciação entre populações é influenciado por fatores como deriva genética, endocruzamento, fluxo gênico e sistema de cruzamento (Wright, 1931, 1943) e dessa maneira, a estimativa da diversidade genética, bem como de sua distribuição intra e interpopulacional, é fundamental para traçar medidas de conservação de espécies.

Ainda que os resultados anteriores apontem para uma situação de alto fluxo gênico e ausência de segregação genética associada à geografia, nesse estudo, procurou-se verificar se a variabilidade genética encontrada nos três locais eram significativamente diferentes. Assim, pela AMOVA, pôde-se verificar que Belém é geneticamente mais diversificado de que Manaus ($F_{st} = 0.09$, $P < 0.01$) e Letícia ($F_{st} = 0.10$, $P < 0.05$). Não houve diferença significativa entre a variabilidade de Manaus e Letícia ($F_{st} = -0.02$, $P > 0.6$). Os resultados da AMOVA corroboram os índices encontrados nas tabelas 05 e 06 e figura 17, que apontam para uma maior variabilidade, e estatisticamente significativa, da população de Belém. O fato de que Manaus e Letícia compartilharam haplotipos, também reforça o resultado obtido pela AMOVA entre Manaus e Letícia.

Pela análise de variância molecular também foi possível verificar que 93.39% da variabilidade genética foi observada dentro das populações e somente 6.61% entre elas (tabela 07).

Nesse contexto, os resultados obtidos pela AMOVA reforçam uma possível explicação sugerida anteriormente, de que o estuário possa congrega os indivíduos gerados nas diferentes cabeceiras. É possível que a região da Amazônia ocidental seja uma área de reprodução, e que cada afluente tenha uma contribuição específica. Por isso, a variabilidade encontrada na calha do rio Solimões/ Amazonas decrescer no sentido Manaus → Letícia.

Outros trabalhos utilizaram também a análise de variância molecular (AMOVA) a fim de acessar a variação e estrutura genética intra e interpopulacional em vertebrados. Nesbo *et al.* (1999) estudaram as rotas de colonização de uma espécie de carpa (*Perca fluviatilis*) na Europa através de marcadores moleculares RAPD e de seqüências nucleotídicas da região controle do mtDNA. Os autores amostraram 55 populações, pertencentes a 20 sistemas de drenagens de toda a Europa, e verificaram uma variabilidade genética maior entre as drenagens para ambos os marcadores moleculares, e um alto grau de estruturação genética entre as populações de carpa. Machordom *et al.* (2000), utilizando marcadores moleculares RFLP do gene mitocondrial citocromo *B*, estudaram a distribuição biogeográfica da truta, *Salmo trutta*, em 507 espécimens correspondentes a 58 localidades da península ibérica e verificaram que as populações estão estratificadas de acordo com a localização geográfica. Wynen *et al.* (2000), a fim de estimar o grau de variabilidade genética e estrutura populacional de duas espécies de leões marinhos, *Arctocephalus gazella* e *A. tropicalis*, a partir de 13 populações (8 de *A. gazella* e 5 de *A. tropicalis*) distribuídos na

região sub antártica, utilizaram um fragmento de 316 bp da região controle e verificaram que as populações das duas espécies mostraram segregação genética significativa.

A AMOVA, no entanto, desconsidera informações que dizem respeito à distância geográfica dos espécimens em questão, considerando somente as de caráter genético proveniente de uma matriz de distância entre os haplotipos bem como suas frequências. Aliado a isso, a análise também desconsidera algumas informações biológicas pertinentes da espécie como, por exemplo, comportamento e fases do ciclo de vida que, no caso da dourada, inclui grandes migrações com fases do ciclo de vida em ambientes distintos.

Neste estudo, pelos limites da AMOVA citados acima, também foi utilizada a análise de clados inseridos, discutida a seguir, para um melhor entendimento entre variabilidade genética e distribuição geográfica.

5.4 - Análise de clados inseridos (*Nested clade analysis*)

O desenvolvimento da teoria da coalescência (Tavaré, 1984; Donnelly & Tavaré 1986) abriu novas perspectivas e proporcionou ferramentas importantes para as análises intra-específicas. Neste sentido, Posada & Crandall (2001) citam que a evolução de genes no nível intra-específico não pode ser sempre representada por árvores dicotômicas, pois as relações evolutivas intra e interespecíficas são diferentes na natureza. Portanto, os métodos mais tradicionais (máxima verossimilhança, máxima parcimônia e evolução mínima) desenvolvidos para estimar as relações interespecíficas, não consideram propriamente, que alguns eventos que ocorrem no nível populacional podem ir de encontro a alguns de seus princípios e,

conseqüentemente, isso pode levar a estimativas filogenéticas de difícil interpretação. Além disso, poucos métodos consideram conjuntamente informações do ponto de vista genético e de distância geográfica, bem como verificar se há correlação entre essas.

Nesse contexto, foi realizada a análise de clados inseridos (Templeton *et al.*, 1992) nos dados populacionais de *B. flavicans*, a partir de um cladograma construído com os 31 haplotipos (fig. 18). A partir desse, é possível verificar que há um padrão de mistura entre os haplotipos das três localidades e também ter uma noção da distância genética entre eles mediante as OTUs conectadas.

Os resultados obtidos nesse estudo (fig. 18 e tabela 08) demonstram que não houve valor significativo para nenhum dos níveis, clados e subclados do passo 1 ao 4. Mediante a inferência obtida com a chave de interpretação biológica de Templeton (1998), não é possível rejeitar a hipótese nula de que não há associação entre a distribuição geográfica e a variabilidade genética entre os haplotipos. A explicação biológica sugerida por Templeton (1998), para os resultados obtidos, seria de uma população intercruzante em panmixia, uma ampla dispersão de população não intercruzante ou tamanho amostral pequeno. Neste estudo, a primeira alternativa parece ser o caso.

O único clado que apresentou resultados significativos, ou seja, que as probabilidades são significativamente maiores e menores do que o esperado, caso não houvesse segregação genética entre os haplotipos, foi o que representa o cladograma total (5-1). Pela inferência na chave, chega-se a explicações de que possa haver fluxo gênico restrito e/ou dispersão de longa distância nas populações/ indivíduos considerados, ou seja, entre indivíduos de Belém e Letícia.

Por se tratar de um tipo de análise descrita nos anos mais recentes (Templeton *et al.*, 1992; Crandall, 1994; Crandall *et al.*, 1996; Templeton *et al.*, 1995; Crandall, 1996), poucos trabalhos utilizaram a análise de clados inseridos até o momento. Dentre esses, pode-se citar o de Nesbo *et al.* (1999) que verificaram que a distribuição geográfica dos haplotipos das populações da carpa, *Perca fluviatilis*, deu-se em função de eventos históricos ligados à expansão geograficamente delimitada. Sivasundar *et al.* (2000), todavia, ao estudar a estrutura populacional de duas espécies do gênero *Prochilodus*, verificaram que a estrutura filogenética de *P. lineatus*, da bacia do Paraná, e *P. nigricans*, da bacia do Amazonas, não está associada com distribuição geográfica dessas espécies, sugerindo a existência de fluxo gênico em cada uma delas.

De acordo com todos os resultados obtidos nas diferentes análises (filogenéticas, polimorfismo de DNA, AMOVA e clados inseridos) com os espécimens de *B. flavicans* coletados nas três localidades, Belém, Manaus e Letícia, sugere-se o seguinte cenário:

Não se pode rejeitar a hipótese de que exista uma única população de dourada migrando ao longo do eixo EAS, como sugerido por Barthem & Goulding, 1997.

De acordo com os resultados obtidos, Belém é o local onde se concentra a maior variabilidade genética dessa espécie. Reforça-se novamente que, uma das principais explicações para isso é de que o estuário congregue os indivíduos oriundos de todos os afluentes da bacia Amazônica. Letícia, por outro lado, possui a menor variabilidade genética entre os pontos amostrados, pois, se a hipótese migratória, em função da fase de reprodução é correta, então é possível que o grande “pool” genético encontrado em Belém vá se fragmentando a medida em que vários cardumes sobem para as cabeceiras de vários afluentes do Solimões-Amazonas,

como por exemplo, os rios Madeira, Purus, Juruá (da margem direita) e Napo, Içá e Japurá (da margem esquerda). Porém, esta fragmentação e menor variabilidade genética encontrada em Letícia só é possível se a escolha dos afluentes onde a dourada vai desovar não for aleatória. Em outras palavras, se os cardumes desta espécie estiverem retornando aos afluentes onde nasceram para desovar. Assim, em Letícia, somente uma fração da variabilidade genética total da espécie é encontrada. Seguindo-se o mesmo raciocínio, Manaus apresenta uma variabilidade maior de que Letícia e menor de que Belém, porque entre Belém e Manaus há um número menor de afluentes de água branca que serviriam como “escape” de variabilidade genética, do que entre Manaus e Letícia.

Dentro deste cenário é importante ressaltar a importância biológica que os diferentes afluentes podem representar para o ciclo de vida de *B. flavicans*. Seria muito importante determinar, por exemplo, se na fase de migração para a reprodução, a escolha por determinado afluente do Solimões/Amazonas ocorre aleatoriamente ou se os indivíduos voltam para o mesmo afluente onde nasceram. Diante dessa situação, são necessários estudos em indivíduos amostrados nas cabeceiras dos diferentes afluentes do Solimões-Amazonas.

Quando se considera somente a calha principal do rio, onde estão localizados os pontos de coleta das amostras, os resultados obtidos apontaram para uma única população de *B. flavicans*, geneticamente misturada, com grande fluxo gênico e ampla área de distribuição. No entanto, de acordo com o exposto anteriormente, não se pode descartar a hipótese de que existam várias sub-populações distribuídas em diferentes afluentes durante o período da reprodução, que se misturam na calha do rio durante o resto do ciclo de vida da espécie.

Políticas de conservação e manejo para *B. flavicans*, e possivelmente para outros bagres migradores como *B. vaillantii* e *B. filamentosum*, devem ter o cuidado de considerar estas possibilidades sugeridas anteriormente. Além de a espécie possuir uma ampla distribuição, é possível que várias sub-populações estejam misturadas na calha do EAS durante a safra pesqueira. Ainda, deve-se considerar que, independentemente do afluente, a espécie usa áreas diferenciadas para reprodução e crescimento.

Essas considerações ganham mais peso se considerarmos que a área de distribuição envolve o território de cinco países. E, conseqüentemente, deve-se levar em conta o fato de que o benefício sócio-econômico, decorrente da atividade pesqueira exercida sobre essa espécie, depende intimamente de medidas de manejo corretas, de forma que isso possa garantir o uso sustentável desse recurso pela sociedade como um todo.

6.CONCLUSÃO

Mediante os resultados obtidos da filogeografia de *B. flavicans* pode-se concluir que:

- As análises filogenéticas foram unânimes em mostrar que não há segregação genética entre as populações de Belém, Manaus e Letícia;
- A população de Belém apresentou a maior variabilidade genética ao longo do eixo EAS, aparentemente em função de reunir os indivíduos gerados em diferentes afluentes do Solimões/ Amazonas;
- Letícia apresentou a menor variabilidade genética. É possível que isso ocorra porque, ao longo da migração no sentido Belém-Letícia, sub-populações segreguem-se não aleatoriamente nos diferentes afluentes para se reproduzirem;
- A análise de variância molecular demonstrou que Belém é geneticamente mais diversificado do que Manaus e Letícia, não havendo diferença significativa entre a variabilidade de Manaus e Letícia. Estes resultados corroboram os índices de polimorfismo de DNA, que apontam para uma maior variabilidade genética da população de Belém.
- Mediante os resultados da análise de clados inseridos, não há correlação genética e geográfica entre os haplotipos de *B. flavicans* das três localidades e a interpretação biológica dos resultados é de que as populações tenham movimentos de dispersão de longa distância/ampla área de dispersão.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- ABI. 1992. SeqEd: Sequence Editor, version 1.0.3. ABI, Foster City.
- Alves-Gomes, J.A.; Orti, G.; Haygood, M.; Heiligenberg, W.; Meyer, A. 1995. Phylogenetic analysis of the South American electric fishes (order Gymnotiformes) and the evolution of their electrogenic system: a synthesis based on morphology, electrophysiology, and mitochondrial sequence data. *Molecular Biology And Evolution*, 12(2):298-318
- Anderson, S.; Bankier, A.T.; Barrel, B.G.; de Bruijin, M.H.L.; Coulson, A.R.; Drouin, J.; Eperon, I.C.; Nierlich, D.P.; Roe, B.A.; Sanger, F.; Schreier, P.H.; Smith, A.J.H.; Staden, R; Young, I.G. 1981. Sequence and Organization of the human mitochondrial genome. *Nature*, 290:457-465
- Aquadro, C.F.; Greenberg, B.D. 1983. Human mitochondrial DNA variation and evolution: Analysis of nucleotide sequences from seven individuals. *Genetics*, 103:287-312
- Arctander, P.; Johansen, C.; Coutellec-Vreto, M.A. 1999. Phylogeography of three closely related African bovids (Tribe Alcelaphini). *Mol. Biol. Evol.*, 16(12):1724-1739
- Attardi, G. 1985. Animal mitochondrial DNA: An extreme example of genetic economy. *Int. Rev. Cyt.*, 93:93-145
- Avise, J. C. 1994. Molecular markers, natural history and evolution. Chapman & Hall, Inc., USA. 511 p.
- Avise, J.C.; Helfman, G.S.; Saunders, N.C.; Stanton, L.H. 1986. Mitochondrial DNA differentiation in north atlantic eels: Population genetic consequences of an unusual life history pattern. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 83:4350-4354

- Avise, J.C.; Neigel, J.E.; Arnold, J. 1984. Demographic influences on mitochondrial DNA lineage survivorship in animal populations. *J. Mol. Evol.*, 20:99-105
- Barthem, R. B.; Goulding, M. 1997. *Os bagres balizadores: Ecologia, Migração e Conservação de peixes amazônicos*. Sociedade Civil Mamirauá; CNPq, Brasília. 140 p.
- Barthem, R.B.; Guerra, H.; Valderrama, M. 1995. Diagnóstico de los Recursos Hidrológicos de la Amazonia. Tratado de Cooperación Amazonica. *Secretaria Pro Tempore*. 162 p.
- Braga, T. M. P.; Fabr , N.N. 2001. Pesca comercial de grandes bagres (Pimelodidae) na Amazônia Central: Municípios de Iranduba e Manacapuru, Amazonas. Resumo. XIV EBI.
- Brown, J.R.; Andrew, T.B.; Smith, M.J. 1993. Intraespecific DNA sequence variation of the mitochondrial control region of white sturgeon (*Acipenser transmontanus*). *Mol. Biol. Evol.*, 10 (2):326-341
- Brown, W.M. 1980. Polymorphism in mitochondrial DNA of human as revealed by restriction endonucleases analysis. *Proceedings of National Academy of Sciences*, 77:3605-3609
- Brown, W.M. 1981. Mechanisms of evolution in animal mitochondrial DNA. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 361:119-134
- Brown, W.M. 1983. Evolution of mitochondrial DNA. *In: Nei, M and Koehn, R.K (Eds). Evolution of genes and proteins*. Sinauer, Sunderland, MA. p.62-88.
- Brown, W.M. 1985. The mitochondrial genome of animals. *In: MacIntyre, R.J. (ed). Molecular Evolutionary genetics*. Plenum Press, New York. p.95-130.

- Brown, W.M.; Gadaleta, G.; Pepe, G.; Saccone, C.; Sbiza, E. 1986. Structural conservation and variation in the D-loop containing region of vertebrate mitochondrial DNA. *J. Mol. Biol.*, 192:503-511
- Brown, W.M.; George, M.Jr.; Wilson, A.C. 1979. Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 76:1967-1971
- Brown, W.M.; Prager, E.M.; Wang, A.; Wilson, A.C. 1982. Mitochondrial DNA sequences of primates: Tempo and mode of evolution. *J. Mol. Evol.*, 18:225-239
- Cann, R.I.; Brown, W.M.; Wilson, A.C. 1984. Polymorphic sites and the mechanism of evolution in human mitochondrial DNA. *Genetics*, 106:479-499
- Clark-Walker, G.D. 1985. Basis of diversity in mitochondrial DNAs. *In: Cavalier-Smith (ed). The evolution of genome size.* New York: Wiley. p.277- 297.
- Clement, M.; Posada, D.; Crandall, K.A. 2000. TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Molecular Ecology*, 9:1657-1659
- Comas, D.; Calafell, F.; Mateu, E.; Pérez-Lezaun, A.; Bertranpetit, J. 1996. Geographic variation in human mitochondrial DNA control region sequence: the population history of turkey and its relationship to the european population. *Mol. Biol. Evol.*, 13(8):1067-1077
- Crandall, K.A. 1994. Intraspecific cladogram estimation: accuracy at higher levels of divergence. *Syst. Biol.*, 43(2):222-235
- Crandall, K.A. 1996. Multiple interspecies transmissions of human and simian T-cell leukemia/lymphoma virus type I sequences. *Mol. Bol. Evol.*, 13(1):115-131
- Crandall, K.A.; Templeton, A.R. 1993. Empirical tests of some predictions from coalescent theory with applications to intraspecific phylogeny reconstruction. *Genetics*, 134:959-969

- Crandall, K.A.; Templeton, A.R. 1996. Applications of intraspecific phylogenetics. *In:* Harvey, P.H.; Brown, A.J.L.; Smith, J.M.; Nee, S. (Eds). *New uses for new phylogenies*. Oxford university press. Oxford, New York. p.81-99.
- Crandall, K.A.; Templeton, A.R.; Charles, F.S. 1994. Intraspecific phylogenetics: problems and solutions. *Models in Phylogeny Reconstruction*, 52:273-297
- De Pinna, M.C.C. 1998. Phylogenetic Relationships of Neotropical Siluriformes (Teleostei: Ostariophysi). Historical overview and synthesis of hypothesis. *In:* Malabarba, L.R.; Reis, R.E.; Vari, R.P.; Lucena, Z.M.; Lucena, C.A. (Eds). *Phylogeny and classification of Neotropical fishes*, EDIPUC, Porto Alegre. p.279-330.
- Densmore, L.D.; Wright, J.W.; Brown, W.M. 1985. Length variation and heteroplasmy are frequent in mitochondrial DNA from parthenogenetic and bisexual lizards (genus *Cnemidophorus*). *Genetics*, 110:689-707
- Donnelly, P.; Tavaré, S. 1986. The ages of alleles and coalescent. *Adv. Appl. Prob.*, 18:1-19
- Doukakis, P.; Birstein, V.J.; Ruban, G.I.; Desalle, R. 1999. Molecular genetic analysis among subspecies of two Eurasian sturgeon species, *Acipenser baerii* and *A. stellatus*. *Molecular Ecology*, 8:S117-S127
- Eigenmann, C.H.; Eigenmann, R.S. 1890. A revision of South American Nematognathi or catfishes. *Occasional Papers of the California Academy of Sciences*, 1:1-8
- Escorza-Treviño, S.; Dizon, A.E. 2000. Phylogeography, intraspecific structure and sex-biased dispersal of dall's porpoise, *Phocoenoides dalli*, revealed by mitochondrial and microsatellite DNA analysis. *Molecular Ecology*, 9:1049-1060

- Excoffier, L.; Smouse, P.; Quattro, J. 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial Dna restriction data. *Genetics*, 131:479-491.
- Fauron, C.M.R.; Wolstenholme, D.R. 1976. Structural heterogeneity of mitochondrial DNA molecules within the genus *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 73:3623-3627
- Fauron, C.M.R.; Wolstenholme, D.R. 1980. Extensive diversity among *Drosophila* species with respect to nucleotide sequences within the adenine + thymine-rich region of mitochondrial DNA molecules. *Nucl. Acids Res.*, 8:2439-2452
- Felsenstein, J.F. 1981. Evolutionary tree from DNA sequences: a maximum likelihood approach. *J. Mol. Evol.*, 17:368-376
- Felsenstein, J.F. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution*, 39:783-791
- Ferreira, E.J.G.; Zuanon, J.A.S.; Santos, G.M. 1998. *Peixes comerciais do médio Amazonas Região de Santarém - PA*. Edições IBAMA, Brasília. 211p.
- Firestone, K.B.; Elphinstone, M.S.; Sherwin, W.B. Houlden, B.A. 1999. Phylogeographical population structure of tiger quolls *Dasyurus maculatus* (Dasyuridae:Marsupialia), an endangered carnivorous marsupial. *Molecular Ecology*, 8:1913-1625
- Fonteles Filho, A. A. 1989. *Recursos pesqueiros: Biologia e dinâmica populacional*. Imprensa oficial do Ceará, Fortaleza. 296 p.
- Giles, R.E., Blanc, H., Cann, H.M., Wallace, D.C. 1980. Maternal inheritance of human mitochondrial DNA. *Proceedings of National Academy of Sciences*, 77:6715-6719

- Gleeson, D.M.; Howitt, R.L.J.; Ling, N. 1999. Genetic variation, population structure and cryptic species within the black mudfish, *Neochanna diversus*, an endemic galaxiid from New Zealand. *Molecular Ecology*, 8:47-57
- Goulding, M. 1979. *Ecologia da Pesca do Rio Madeira*. CNPq/INPA. Manaus, Amazonas. 172 p.
- Gray, M.W. 1989. Origin and evolution of mitochondrial DNA. *Ann. Rev. Cell. Biol.*, 5:25-50.
- Gulland, J. A. 1983. *Fish stock assessment. A manual of basic methods*. John Willey & Sons, England. Vol. 1, 223 p.
- Harrison, R.G.; Rand, D.M.; Wheeler, W.C. 1985. Mitochondrial DNA size variation within individual crickets. *Science*, 228:1446-1448
- Hasegawa, M.; Kishino, H.; Yano, T. 1985. Dating the human-ape splitting by a molecular clock of mitochondrial DNA. *J. Mol. Evol.*, 22:160-174
- Hayashi, J.L.; Tagashira, Y.; Yoshida, M.C. 1985. Absence of extensive recombination between Inter and intraespecies mitochondrial DNA in mammalian cells. *Exp. Cell. Res.*, 160:387-395
- Honeycutt, R.I., Wheller, W.C. 1990. Mitochondrial DNA: Variation in humans and higher primates. In: Dutta, S.K.; Winter. W.P. (ed). *DNA Systematics: Human and higher Primates*. Vol.3. CRC Press inc., Boca Roton, Florida. p.91-124.
- Houlden, B.A.; Costello, B.H.; Sharkey, D.; Fowler, E.V.; Melzer, A.; Ellis, W.; Carrick, P.R.B.; Elphinstone, M.S. 1999. Phylogeographic differentiation in the mitochondrial control region in the Koala, *Phascolarctos cinereus* (Goldfuss 1817). *Molecular Ecology*, 8:999-1011

- Hutchison, C.A.; Newbold, J.E.; Potter, S.S., Edgell, M.H. 1974. Maternal inheritance of mammalian mitochondrial DNA. *Nature*, 251:536-538p.
- Ihlssen, P.E. Booke, H.E., Casselman, J.M., McGlade, J.M. Payne, N.R.; Utter, F.M. 1981. Stock identification: materials and methods. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 38:1838-1855
- James, C.H.; Moritz, C. 2000. Intraspecific phylogeography in the sedge frog *Litoria fallax* (Hylidae) indicates pre-pleistocene vicariance of an open forest species from eastern Australia. *Molecular Ecology*, 9:349-358
- Jamielson, A. 1974. Genetic "tags" for marine fish stocks. In: Harden Jones, F.R. (ed) *Sea Fisheries Research*. Paul Elek Scientific Books Ltd., London. p.91-99.
- Jukes, T.; Cantor, C. 1969. Evolution of protein molecules. In: Munro, H.N. (ed). *Mammalian protein metabolism*. Academic press, New York. p. 21-132.
- Junk, W. J.; Honda, E. M. S. 1976. A pesca na Amazônia. Aspectos Ecológicos e econômicos. *Anais do I Encontro Nacional sobre Limnologia, Piscicultura e Pesca Continental*, Belo Horizonte - Minas Gerais, p.211-216.
- Kimura, M.; Maruyama, T. 1971. Pattern of neutral polymorphism in a geographically structured population. *Genet. Res.*, 1:123-131
- King, M. 1995. *Fisheries Biology, Assessment and management*. Fishing News books. Oxford, England. 341 p.
- Larkin, P. A. 1972. *The stock concept and management of Pacific salmon*. H. R. MacMillan Lectures in fisheries, Univ. British Columbia, Vancouver, B.C. 231 p.
- Lasman, R.A.; Shade, R.O.; Shapira, J.F.; Avise, J.C. 1981. The use of restriction endonucleases to measure mitochondrial DNA sequence relatedness in natural populations. *J. Mol. Evol.*, 17:214-226

- Lehninger, A. L. Nelson D.L., Cox, M.M. 1995. *Princípios de bioquímica*. 2ª edição. Editora Sarvier, São Paulo. 839 p.
- Li, W.H. 1997. *Molecular Evolution*. Sinauer Associates, Inc., Publishers, Sunderland. 284p.
- Marchordom, A.; Suárez, J.; Almodóvar, A; Bautista, J.A. 2000. Mitochondrial haplotype variation and phylogeography of iberian Brown trout populations. *Molecular ecology*, 9:1325-1338
- Margulis, L. 1970. *Origin of eukaryotic cells*. CT: Yale Univ. Press, New Haven.
- Marshall, H.D.; Baker, A.J. 1997. Structural conservation and variation in the mitochondrial control region of fringilline finches (*Fringilla spp.*) and the greenfinch (*Carduelis chloris*). *Mol. Biol. Evol.*, 14(2)173-184
- Meyer, A. 1993. Evolution of mitochondrial DNA in fishes. *Biochemistry and molecular biology of fishes*, 2:1-38
- Moritz, C.; Dowling, T.E.; Brown, W.M. 1987. Evolution of animal mitochondrial DNA: relevance for population biology and systematics. *Ann. Rev. Ecol. Syst.*, 18:269-292
- Mullis, K.; Faloona, F. 1987. Specific synthesis of DNA in vitro via polimerase catalysed chain reaction. *Methods Enzymol.*, 55:335-350.
- Nei, M. 1982. Evolution of the human races at gene level. In: Bonne-Tamir, B.; Cohen, T.; Goodman (eds). *Human genetics, part A: The unfolding genome*. Alan R. Liss, NY
- Nei, M. 1987. *Molecular evolutionary Genetics*. Columbia university Press, New York, NY, USA. 512 p.
- Nelson, J. S. 1994. *Fishes of the World*. 3ª edição: Jonh Wiley & Sons, Inc. USA. 600 p.

- Nesbo, C.L.; Fossheim, T.; Vollestad, L.A.; Jakobsen, S. 1999. Genetic divergence and phylogeographic relationships among European perch (*Perca fluviatilis*) populations reflect glacial refugia and postglacial colonization. *Molecular Ecology*, 8:1387-1404
- Perler, F.; Efstratiadis, A.; Lomedico, P.; Gilbert, W.; Kolodner, R.; Dodgson, J. 1980. The evolution of gene: the chicken preproinsulin gene. *Cell*, 20:555-556
- Pestano, J.; Brown, R.P.; Rodriguez, F.; Moreno, A. 2000. Mitochondrial DNA control region diversity in the endangered blue chaffinch, *Fringilla teydea*. *Molecular Ecology*, 9:1421-1425
- Porto, J.I.R. 1999. *Análises cariotípicas e sequenciamento de mtDNA de populações de Mylesinus paraschomburgkii (Characiformes, Serrasalminidae) da Bacia Amazônica*. Tese de doutorado, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia/Universidade do Amazonas. Manaus, Amazonas. 120p.
- Posada, D.; Crandall, K.A. 1998. MODELTEST: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics*, 14(9):817-818
- Posada, D.; Crandall, K.A. 2001. Intraspecific gene genealogies: trees grafting into networks. *Trends in Ecology & Evolution*, 16(1):37-44
- Posada, D.; Crandall, K.A.; Templeton, A.R. 2000. GeoDis: a program for the cladistic nested analysis of the geographical distribution of genetic haplotypes. *Molecular Ecology*, 9:487-488
- Rossiter, S.J.; Gareth, J.; Ransome, R.D.; Barratt, M. 2000. Genetic variation and population structure in the endangered greater horseshoe bat *Rhinolophus ferrumequinum*. *Molecular Ecology*, 9:1131-1135

- Rozas, J. And Rozas, R. 1999. DnaSP version 3: an integrated program for molecular population genetics and molecular evolution analysis. *Bioinformatics*, 15:174-175.
- Ruffino, M. L.; Barthem, R. B. 1996. Pespectivas para el Manejo de los Bagres Migradores de la Amazonia. *Boletin Cientifico*, 4:19-28
- Ruffino, M. L.; Barthem, R. B.; Fischer, C.F.A. 2000. Perspectivas do manejo dos bagres migradores na Amazônia. In: *Recursos pesqueiros do médio Amazonas: Biologia e estatística pesquiara*. Edições IBAMA, Brasília. p.141-152.
- Salinas, Y. 1994. *Aspectos de la biología pesquera de las poblaciones de los grandes bagres (Ostariophysi: Siluriformes, Pimelodidae) en el sector colombiano del río Amazonas*. Tesis Lic. Biología. Universidad Pedagógica Nacional. Santa Fé de Bogotá. 160p.
- Schneider, S.; Roessli, D.; Excoffier, L. 2000. Arlequin Version 2.000: A software for population genetic data analysis. Genetics and biometry laboratory, University of Geneva, Switzerland.
- Serb, J.M.; Phillips, A.; Iverson, J.B. 2001. Molecular phylogeny and biogeography of *Kinosternon flavescens* based on complete mitochondrial control region sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 18(1):149-162
- Shedlock, A.M.; Parker, J.D.; Crispin, D.A.; Theodore, W. P.; Burmer, C. 1992. Evolution of Salmonid mitochondrial control region. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 1 (3):179-192
- Sivasundar, A.; Bermingham, E.; Guilherme, O. 2000. Population structure and biogeography of migratory freshwater fishes (*Prochilodus*: Characiformes) in major south american rivers. *Molecular Ecology*, 10:407-417

- Sparre, P.; Venema, S.C. 1995. *Introducción a la evolución de recursos pesqueros tropicales*.
Parte 1. Manual. FAO Documento Técnico de Pesca. N° 306. 440 p.
- Strachan, T., Read, A. P. 1996. *Human molecular genetics*. Bios Scientific Publishers Ltd,
Oxford. 610 p.
- Stryer, L. 1988. *Bioquímica*. 3ª edição: Editora Guanabara Koogan S. A., Rio de Janeiro.
595 p.
- Swofford, D. L. 1999. PAUP: Phylogenetic Analysis using parsimony, version 4.0.
Sinauer Associates, Sunderland.
- Tajima, F. 1983. Evolutionary relationship of DNA in finite populations. *Genetics*,
105:437-460
- Tajima, F. 1993. Measurement of DNA polymorphism. *In*: Takahata, N.; Clark, A.G.
(Eds). Mechanisms of molecular evolution. Introduction to molecular
paleopopulation biology. Japan scientific societies press, sinauer associaters,
inc., Tokyo, Sunderland, MA. p.37-59.
- Tarr, C.L.; Fleischer, R.C. 1999. Population boundaries and genetic diversity in the
endangered Mariana crow (*Corvus kubaryi*). *Molecular ecology*, 8:941-949
- Tavaré, S. 1984. Line-of-descent and genealogical process and their applications in
population genetic models. *Theoret. Popul. Biol.*, 26:119-164
- Templeton, A.R. 1998. Nested clade analysis of phylogeographic data: testing
hypotheses about gene flow and population history. *Molecular Ecology*, 7:381-
397
- Templeton, A.R.; Boerwinkle, E.; Sing, C.F. 1987. A cladistic analysis of phenotypic
associations with haplotypes inferred from restriction endonuclease mapping. I.

- Basic theory and an analysis of alcohol dehydrogenase activity in *Drosophila*.
Genetics, 117:343-351
- Templeton, A.R.; Crandall, K.A.; Sing, C.F. 1992. A cladistic analysis of phenotypic association endonuclease mapping and DNA sequence data. III. Cladogram estimation. *Genetics*, 132:619-633
- Templeton, A.R.; Routman, E.; Phillips, C.A. 1995. Separating population structure from population history: a cladistic analysis of the geographical distribution of mitochondrial DNA haplotypes in the tiger salamander, *Ambystoma tigrinum*.
Genetics, 140:767-782
- Templeton, A.R.; Sing, C.F.; Kessling, A.; Humphries. 1988. A cladistic analysis of phenotypic associations with haplotypes inferred from restriction endonuclease mapping. II. The analysis of natural populations. *Genetics*, 120:1145-1154
- Tzeng, C.S.; Hui, C.F.; Shen, S.C.; Huang, P.C. 1992. The complete nucleotide sequence of the *Crossostoma lacustre* mitochondrial genome: Conservation and variations among vertebrates. *Nucleic Acids Research*, 20 (18):4853-4858
- Upholt, W.B.; Dawid, I.B. 1977. Mapping of mitochondrial DNA of individual sheep and goats: Rapid evolution in the D-loop region. *Cell*, 11:571-583
- Vaughn, K.C.; DeBonte, L.R.; Wilson, K.G. 1980. Organelle alteration as a mechanism for maternal inheritance. *Science*, 208:196-197
- Wang, J.Y.; Chou, L.S.; White, N.B. 1999. Mitochondrial DNA analysis of sympatric morphotypes of bottlenose dolphins (genus: *Tursiops*) in Chinese waters. *Molecular ecology*, 8:1603-1612

- Weir, B. S.; Cockerham, C.C. 1984. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution*, 38:1358-1370
- Wenink, P.W.; Baker, A.J; Tilanus, G.J. 1994. Mitochondrial control region sequences in two shorebird species, the turnstone and the dunlin, and their utility in population genetic studies. *Mol. Biol. Evol.*, 11(1):22-31
- Wolstenholme, D.R.; Clary, D.O. 1985. Sequence evolution of *Drosophila* mitochondrial DNA. *Genetics*, 109:725-744
- Wright, S. 1931. Evolution in mendelian populations. *Genetics*, 16:97-159
- Wright, S. 1943. Isolation by distance. *Genetics*, 28:114-138
- Wynen, L.P.; Goldsworthy, S.D.; Guinet, C.; Bester, M.N.; Boyd, I.L.; Gjertz, I; Hofmeyr, G.J.G.; White, R.W.G.; Slade, R. 2000. Postsealing genetic variation and population structure of two species of fur seal (*Arctocephalus gazella* and *A. tropicalis*). *Molecular Ecology*, 9:299-314
- Yang, D.; Oyaizu, Y.; Oyaizu, H.; Olson, G.J.; Woese, C. R. 1985. Mitochondrial origins. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, (82):4443-4447

ANEXOS

ANEXO I

Seqüência da região controle do DNA mitocondrial com 1037 pb de 45 espécimens de *B. flavicans*. Sendo 15 provenientes de Belém (em azul), 15 de Manaus (em verde) e 15 de Letícia (em vermelho). As bases destacadas em vermelho são os sítios polimórficos.

263BE AGCTTAATTAAGCATAAACTGAAGATGTTAAGATG
264BE AGCTTAATTAAGCATAAACTGAAGATGTTAAGATG
265BE AGCTTAATTAAGCATAAACTGAAGATGTTAAGATG
266BE AGCTTAATTAAGCATAAACTGAAGATGTTAAGATG
267BE AGCTTAATTAAGCATAAACTGAAGATGTTAAGATG
269BE AGCTTAATTAAGCATAAACTGAAGATGTTAAGATG
270BE AGCTTAATTAAGCATAAACTGAAGATGTTAAGATG
271BE AGCTTAATTAAGCATAAACTGAAGATGTTAAGATG
273BE AGCTTAATTAAGCATAAACTGAAGATGTTAAGATG
276BE AGCTTAATTAAGCATAAACTGAAGATGTTAAGATG
277BE AGCTTAATTAAGCATAAACTGAAGATGTTAAGATG
281BE AGCTTAATTAAGCATAAACTGAAGATGTTAAGATG
282BE AGCTTAATTAAGCATAAACTGAAGATGTTAAGATG
284BE AGCTTAATTAAGCATAAACTGAAGATGTTAAGATG
285BE AGCTTAATTAAGCATAAACTGAAGATGTTAAGATG
178MA AGCTTAATTAAGCATAAACTGAAGATGTTAAGATG
185MA AGCTTAATTAAGCATAAACTGAAGATGTTAAGATG
186MA AGCTTAATTAAGCATAAACTGAAGATGTTAAGATG
187MA AGCTTAATTAAGCATAAACTGAAGATGTTAAGATG
188MA AGCTTAATTAAGCATAAACTGAAGATGTTAAGATG
189MA AGCTTAATTAAGCATAAACTGAAGATGTTAAGATG
190MA AGCTTAATTAAGCATAAACTGAAGATGTTAAGATG
191MA AGCTTAATTAAGCATAAACTGAAGATGTTAAGATG
192MA AGCTTAATTAAGCATAAACTGAAGATGTTAAGATG
193MA AGCTTAATTAAGCATAAACTGAAGATGTTAAGATG
194MA AGCTTAATTAAGCATAAACTGAAGATGTTAAGATG
289MA AGCTTAATTAAGCATAAACTGAAGATGTTAAGATG
290MA AGCTTAATTAAGCATAAACTGAAGATGTTAAGATG
293MA AGCTTAATTAAGCATAAACTGAAGATGTTAAGATG
294MA AGCTTAATTAAGCATAAACTGAAGATGTTAAGATG
204LE AGCTTAATTAAGCATAAACTGAAGATGTTAAGATG
205LE AGCTTAATTAAGCATAAACTGAAGATGTTAAGATG
206LE AGCTTAATTAAGCATAAACTGAAGATGTTAAGATG
207LE AGCTTAATTAAGCATAAACTGAAGATGTTAAGATG
208LE AGCTTAATTAAGCATAAACTGAAGATGTTAAGATG
209LE AGCTTAATTAAGCATAAACTGAAGATGTTAAGATG
210LE AGCTTAATTAAGCATAAACTGAAGATGTTAAGATG
211LE AGCTTAATTAAGCATAAACTGAAGATGTTAAGATG
212LE AGCTTAATTAAGCATAAACTGAAGATGTTAAGATG
213LE AGCTTAATTAAGCATAAACTGAAGATGTTAAGATG
214LE AGCTTAATTAAGCATAAACTGAAGATGTTAAGATG
215LE AGCTTAATTAAGCATAAACTGAAGATGTTAAGATG
216LE AGCTTAATTAAGCATAAACTGAAGATGTTAAGATG
217LE AGCTTAATTAAGCATAAACTGAAGATGTTAAGATG
218LE AGCTTAATTAAGCATAAACTGAAGATGTTAAGATG

ANEXO II

Seqüência da região controle do DNA mitocondrial com 1069 pb de um espécimen de *B. flavicans*, proveniente de Letícia (218LE), e um espécimen de *B. vaillantii* (296PI), coletado em Belém. As bases nucleotídicas em vermelho são os sítios polimórficos entre as duas seqüências.

218LE TCCCTCCTAGTGCCAGAAAAAGGAGATTCTAACTCCTACCTCTAACTCCCAAAGCTAGAATTCTAAATTA
296PI TCCTCCCAAGTGCCAGAAAAAGGA?ATTCTAACTCCAACCCCTAACTCCCAAAGCTAGGATTCTAAATTA

218LE AACTATTTTCTGATAACTTTGCGTCCT - TTCCCATGCTATGGTATAGTACATAAATATGTATATGATCTAGT
296PI AACTATTTTCTGGCA - TTTATGTCATACTTACACGTCGTGGTGTGGTACATGGTGTGTAT - -GGTTTAGT

218LE ACATATTATGTATAAATATTACATCATGGTCTAG - TACATATCATTTACA - TGTTACATGTGAGCTACCCC
296PI ACATAATATGTATAAATATTACATCATGGTTTAAATACATAAAATTCGTAATATTACATGTGGGGTTAACCC

218LE ATAACATGTGATGCATTATTTAAGT - AAAAATGTTCAATTAAGATTGATATCGACATTAAACCTAAACGC
296PI ATATTATGCAATGTAATATTTAACTGAAAAAT - TTAATTTAAGATTGATATCGACATTAAACCTATACGC

218LE ATATGAACTCATCTCGACAAGAAGACAGTCTGAGTACTCCATCTAACATTTCTCACGCTCATATTTCTCTT
296PI ATATGAACTCATCTCGACAAGAAGACAGTCTGAGTACTCCATCTCCTTCTCTTTCTCGCTCATATTTTCTT

218LE GTGTTATTTGACATAAATTGAATAAGTATATATTACCCAGTAAGAACCGACCAACGAGATATTTAAATAC
296PI GTGTTATTTAACACGTMTTGAATAAATTCCTATTACACAATAAGAACCGACCAATCCGATGTTTAAATAC

218LE ATGATATGATTGAAGGGTCAGGGACAATAAATATTGGGGGTTTCACAACCTTGCACTATTACTGGCATTG
296PI ACCACATGATTGAAAGGTCAGGGACATTAACCTTGGGGG - TTCACAACCTTGCACTATTACTGGCATT - GG

218LE TTCCTATTTTCAGGGCCACACATTTATTTATCCCCTTTCATTCCATTACATTGGCATTAAATGATTGGTGTA
296PI - TCCTACTTTCAGGGCCACACGTTGTAATAATCCCCTCTCGTTC - A - TAAC - TGGCATTAATGATTGGTGTA

218LE ACTAATAATTAGCACAAACCCCCCATGCAAAGCGTTCTTTCTAAAGTGTATGGGGGTTTTTTTTTTTCGG
296PI AC - AATA - - TAGCACAAACCCCCCATGCAAAGCGTTCTT - C - AAAGTGTATGGGGTTTTTTCTTTTTTCGG

218LE GTTGCCCTCCATTTGACATTCTTCCCTGCACGCTACCAAGGATTAATGTAGGTAGTCCAT - - ATAAGTTTG
296PI GT - GC - TCCATTTGACATTCTTCCCGCACGCTACCAA - TTATCATGTAGGTAGTCCATTAAATAA - TGTT

218LE TCCGCCCAAGTTAATGTAATGATTTAATGA - - - - - CATATACTTAATAATTGC
296PI CTCTAACACGTTAGATGCAATGATTTAATGATATAAGATTAATGGTTTAATGACATATACTTAATAACCAC

218LE ATTCTAT - TATAGAGTGCATACACTATATTTATCTTTCCCCATATACCTACTA - TCAATCCCCCCCGGTA
296PI ATCCTGTGTATTCTGTACATACACTGTATATACCTCTCCCCACATATTTACCACTTAATCCCCCCCGGTG

218LE TCCTAAAAATTTATTCACGTAAACCCCCCTTACCCCCC - AACTAAACGAATCCTCATAATCCTGTCAAAC
296PI CTCCAAAAATTTATTTATGCAAACCCCCCTTACCCCCCAATTAAACGAATCCTCATAATCCTGTCAAAC

218LE CCCTAAACCAGGCCAGGCTCGATTAGCATCATCAATAAACAAAATTTCTACTGATATACATTATTAATAAAA
296PI CCCTAAACCAGGCTAGGCTCGATTAGCGTCATCAATAAACAAAATTTCTACTGATATATATTATTAATAAAA

218LE ACTGAATTTTATTCTACAGCTGGGAAAACCTCAGGTGTTTACACAGCTAGTGTAGCTTAATTAAGCATAA
296PI ACTGAATTTTATTTTACAGCTGGGAAAACCTCAGGTGTTTACACAGCTAGTGTAGCTTAATTAAGCATAA

218LE CACTGAAGATGTTAAGATG
296PI CACTGAAGATGTTAAGATG