



ESCOLA SUPERIOR BATISTA DO AMAZONAS

CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**Estimativa da variabilidade genética da dourada-
Brachyplatystoma rousseauxii (Pimelodidae- Siluriformes)
do rio Japurá na Amazônia**

SANDRA ALVES MAGALHÃES

Manaus-Am 2003

Sandra Alves Magalhães

**Estimativa da variabilidade genética da dourada-
Brachyplatystoma rousseauxii (Pimelodidae- Siluriformes)
do rio Japurá na Amazônia**

Trabalho de Monografia de conclusão do curso de Ciências Biológicas, da Escola Superior Batista do Amazonas -ESBAM.

Orientadora: Jacqueline da Silva Batista,
MSc. - CPBA/INPA.

Co-orientador: Anderson da Silva Lamêgo,
MSc.- Profº - ESBAM

Manaus-Am 2003

Dedico este trabalho monográfico a minha família:

Em especial a minha mãe Santana, meu amado filho Augusto e meu amado esposo César, meus irmãos José, Celeste, Elbia, Diego.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, pela a força que me deu, para que eu sempre persistisse desde o início para realização de meus conhecimentos obtidos durante a minha graduação;

Agradeço a todas as pessoas que contribuiu direta ou indiretamente para realização deste trabalho em especial:

Ao Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia-INPA, que colaborou amplamente com o meu trabalho, para que eu pudesse realizar as minhas análises.

Ao Provárzea–PNUD/IFS que foram os financiadores diretos para o desenvolvimento deste trabalho.

A Escola Superior Batista do Amazonas-ESBAM

Em especial a minha orientadora Msc. Jacqueline da Silva Batista, que deu -me oportunidade de desenvolver este trabalho monográfico no Laboratório Temático de Biologia Molecular, onde a mesma está lotada, e me recebeu carinhosamente e ensinando-me com paciência todas as etapas metodológicas e análise, para que pudesse desenvolver este trabalho, contribuído para o meu futuro profissional. No entanto sou muito grata por ter me proporcionado todo o aprendizado realizado.

Aos meus professores de graduação por terem contribuído e preparado para a futura profissão e pela amizade, incentivo, oportunidade, sabedoria em seus ensinamentos profissionais.

Aos meus colegas de graduação que desde o início vem acompanhando e colaborando com meu desenvolvimento e aprendizado para que juntos nos tornemos bons profissionais entre eles estão: Ariane Pantoja, Alessandra Kariza, Antonio Pires, Alexandre Barbosa, Célia Regina, Célia Dias, Giizelle Viera, Maria de Nazaré, Michelle Façanha desde já fico grata de estar no rol de suas amizades.

A amiga em especial Kyara Formiga, que me ajudou com paciência desde o início que entrei no laboratório, ensinando, orientando muitas vezes com seu conhecimento amplo, me doando muitas vezes seu tempo precioso, buscando me orientar com o conhecimento científico, desde já obrigado pela disponibilidade e compreensão dedicada.

A amiga Renata Schmitt, que colaborou com sua informação e dedicação, por ter cedido o seu precioso tempo, desde já fico muito grata com a sua atenção e colaboração.

A cara amiga Audrey d'Assunção, que muitas vezes compartilhou com seu conhecimento.

A cara colega Alexandra, que complementou com seu aprendizado.

A amiga Daniela, que proporcionou da sua disponibilidade, ensinando-me e buscando complementar a perfeição do meu aprendizado, na minha vida profissional e na prática.

A minha família, em especial a minha amada mãe Santana por ela ter me proporcionado a minha vida, e nunca desistido de seus filhos, pedindo sempre divina sabedoria, força e saúde para o desenvolvimento profissional de seus filhos.

Ao meu filho Augusto e meu esposo César, por terem esperado com paciência o término de minha graduação e demonstrado a sua amizade e companheirismo.

Aos meus irmãos José, Diego, Celeste, Elbia, por terem me incentivado para que eu não desistisse do meu sonho.

Obrigado a todos por tudo!

Sandra Alves Magalhães

Listas de tabela

Tabela 01 - Concentrações finais dos reagentes utilizados na amplificação da região controle do DNAm dos espécimens de dourada.....11

Tabela 02 - Índices de polimorfismo de DNA obtidos da seqüência nucleotídica da região controle do DNA mitocondrial de 37 indivíduos de *B. rousseauxii* coletados em 03 localidades do rio Japurá.....17

Tabela 03 - Resultados da análise de polimorfismos de DNA obtidos entre pares de populações do *B.rousseauxii* do rio Japurá.....19

Tabela 04 - Matriz de compartilhamento de haplótipos e indivíduos entre os indivíduos de *B. rousseauxii* provenientes das três localidades no rio Japurá.....20

Lista de figuras

Figura 01- Dourada, <i>Brachyplatystoma rousseauxii</i> .(Cortesia de Batista).....	2
Figura 02- As migrações da dourada. 1) Área hipotética da desova; 2) Área de criação; 3) Área de Alimentação dos pré-adultos e adultos. Adaptado de Barthem & Goulding, (1997).....	3
Figura 03- Esquema com as etapas envolvidas no presente trabalho (Batista, 2001).....	9
Figura 04- Eletroforese em gel de agarose 1% do DNA total dos 37 espécimens de <i>B.rousseauixii</i>	15
Figura 05- eletroforese em gel de agarose 1% dos produtos amplificados de alguns espécimens de <i>B. rousseauxii</i>	15
Figura 06- Porcentagem da frequência de bases nucleotídicas da seqüência nucleotídica da região controle dos 37 indivíduos de <i>B. rousseauxii</i> amostrados.....	16
Figura 07- Histograma representativo da variabilidade nucleotídica observada nas amostras de <i>B.rousseauixii</i> provenientes de Vila Bitencourt (alto rio Japurá) em amarelo, a boca do lago do Jacaré (Verde) e Cuiu Cuiu (Azul); onde S é número de sítios polimórficos; ETA é o número total de mutações e K é a média da variabilidade nucleotídica par a par.....	18

Resumo

A dourada (*Brachyplatystoma rousseauxii*), é um bagre migrador que ocorre em toda a bacia Amazônica. Vem sendo explorada com intensidade fora do estuário. É uma espécie de grande importância na pesca comercial e artesanal. Essa espécie é composta por uma única população que sazonalmente migra desde as áreas de alimentação e crescimento até área de reprodução. O objetivo principal deste trabalho foi estimar a variabilidade genética entre os indivíduos de *Brachyplatystoma rousseauxii*, coletados em três localidades do rio Japurá (Vila Bitencourt; Boca do lago do Jacaré, comunidade do Cuiu cuiu) totalizando 37 indivíduos amostrados. Foram seqüenciados 911 pb da região controle do DNA mitocondrial dos 37 indivíduos os quais foram utilizados nas Análises de polimorfismo de DNA e estimados vários índices de variabilidade genética. A menor variabilidade genética encontrada foi entre os indivíduos da localidade do Cuiu cuiu e a maior na Boca do jacaré. As três localidades apresentaram alto fluxo gênico supondo que *Brachyplatystoma rousseauxii*, possa formar uma única população migradora ao longo do rio Japurá. Os lagos de várzea da região entre Tefé-Solimões até o alto Japurá possam ter uma relativa importância por está servindo como “mini-berçários” de dourada.

Palavras-chave: DNA mitocondrial; Região controle; Dourada; Amazônia; rio Japurá.

ABSTRACT

The gold (Brachyplatystoma rousseauxii), it is a catfish migratory that happens in the whole Amazon basin, it has been explored out with intensity of the estuary. It is a type of great importance in the commercial and handmade fishing. it is captured in Letícia and in the river Japurá and both in the Amazonian Colombian. That species is composed for only population that sazonalmente it migrates from the feeding areas and growth to reproduction area. The objective principal of this work: To esteem the genetic variability among individual of Brachyplatystoma rousseauxii, collected at three places (I laugh Japurá; Mouth of the alligator, Cuiu-cuiu being analyzed 37 analyzed individuals). it Verified - if that are correlated with genetic and geographical distribution. The sequence of 911 pb of the area controls of the 37 individuals' of Brachyplatystoma rousseauxii DNA mitochondrial, they were used: Analysis biogenetical of the sequences nucleotídicas, analysis of the haplótipos and polimorfismos of DNA, was accomplished with aid of the programs DNAsp (Rozas and Rozas, 1999), it Programs TCS for verification of the haplótipos among the individuals of Brachyplatystoma rousseauxii. Of the 37 individual seqüenciados, the river Japurá possesses 12 haplótipos, mouth of the alligator 11 haplotipos and Cuiu-cuiu 9 haplótipos totaling 32 haplótipos of individual seqüenciados. The smallest found genetic variability was in the high river Japurá Vila Bitencourt and the largest in the Mouth of the alligator in the community of Maraã, it supposes that Brachyplatystoma rousseauxii, possesses an only population migratory along the river Japurá, Mouth of the Alligator, Cuiú-Cuiú.

Key Word: DNA; Gold; Amazonian; migration; haplótipos.

ÍNDICE

DEDICATÓRIA.....	I
AGRADECIMENTOS.....	II
LISTA DE TABELAS.....	IV
LISTA DE FIGURAS.....	V
RESUMO.....	VI
ABSTRACT.....	VII
1.INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Biologia da dourada.....	2
1.2 Importância comercial da dourada	3
1.3 Uso do DNA em estudos de genética de populacionais.....	5
2. OBJETIVOS.....	8
2.1 Objetivo geral.....	8
2.2 Objetivos específicos.....	8
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	9
3.1 Locais de coleta, obtenção e preservação do material.....	9
3.2 Método laboratoriais.....	9
3.2.1 Extração de DNA.....	10
3.2.2 Digestão.....	10
3.2.3 Extração do DNA a partir do material digerido.....	10
3.2.4 Amplificação in vitro do DNA pela PCR(Mullis & Fallona, 1987).....	11
3.2.5 Purificação do produto amplificado.....	12
3.2.6 Reação de sequenciamento.....	12
3.2.7 Precipitação do produto da reação de sequenciamento.....	13
3.2.8 Eletroforese de seqüenciamento.....	13
3.2.9 Edição e alinhamento das seqüências nucleotídicas.....	14
3.2.10 Análises estatísticas dos haplótipos e polimorfismo de DNA.....	14
4.RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	15
4.1 Extração e amplificação da região controle.....	15
4.2 Comparação da freqüência de bases nucleotídicas.....	16
4.3 Análise das seqüências nucleotídicas da região controle.....	17
4.4 Análise de polimorfismos de DNA	17
5.CONCLUSÃO.....	22
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	23

1. INTRODUÇÃO

A Amazônia forma a maior Bacia hidrográfica do mundo com cerca de 1400 espécies de peixes descritas, sendo que as estimativas indicam que este número varia entre 1500 a 5000. Esta riqueza dar-se também em função da própria composição físico-química dos rios Amazônicos. Neste contexto, ressalta-se a importância comercial e social de uma significativa parcela desta ictiofauna por gerar renda e ser fonte protéica na dieta da população (Barbosa, 1962; Salati *et al.*, 1983; Lowe-McConnel, 1999).

A bacia Amazônica tem como rio principal o Amazonas, com cerca de 6.400Km de extensão. Ele nasce nos Andes peruanos, com o nome de Ucayali e entra no território brasileiro com o nome de Solimões e volta a se chamar Amazonas ao receber o rio Negro. Os afluentes do rio Amazonas de maior destaque são: Javari, Juruá, Purus, Madeira, Tapajós, Xingu, Içá, Japurá, Negro, Trombetas, Paru e Jarí. Recebe ainda as águas da bacia do Tocantins-Araguaia. O ciclo hidrológico na bacia Amazônica é fortemente influenciado pela vasta floresta úmida que recicla aproximadamente a metade das chuvas que caem estabilizando o ciclo hidrológico e diminui o escoamento superficial (Salati&Vose, 1984).

Um dos grupos mais significativos da biodiversidade ictiofaunística na região neotropical é os grandes bagres migradores que pertencem à ordem dos Siluriformes da família Pimelodidae. É de notável interesse para pesca comercial (Barthem & Goulding, 1997), tem sido alvo de vários estudos na Amazônia. São piscívoros e migram para os paranás da várzea durante a seca e possuem diferentes estratégias para ocupar áreas alagadas disponíveis e são abundantes nos produtivos rios de águas brancas(Junk & Honda, 1976; Barthem & Goulding, 1997).

Alguns dos pimelodídeos de maior valor comercial são: a Dourada (*Brachyplatystoma rousseauxii*), a Piraíba (*Brachyplatystoma filamentosum*), a Piramutaba (*B. Vaillantii*), o Jaú(*Paulicea luetkeni*), o Surubim (*Pseudoplatystoma fasciatum*) e o Caparari (*Pseudoplatystoma tigrinum*). (Eigenmann & Eigenmann,1971).

1.1 Biologia da Dourada

A dourada (figura 01) foi classificada em 1855 por Castelnau e taxonomicamente revisada recentemente por Lundberg *et al.* (1991) e seu nome específico modificado de *Brachyplatystoma flavicans* para *Brachyplatystoma rousseauxii*. Possui grande porte tendo o maior tamanho conhecido de 192 cm e possui como principais características morfológicas: cabeça prateada e achatada, corpo dourado e presença de barbilhões maxilares curtos. É diferente de outras espécies do gênero *Brachyplatystoma* não só pela cor mas também pelo tamanho dos barbilhões e pela maxila e mandíbula serem de iguais dimensões (Ferreira *et al.*, 1998).



Figura 01 – Dourada, *Brachyplatystoma rousseauxii*. (Cortesia de Batista).

A espécie é similar a da bacia do rio Orinoco, talvez a mesma. É comum nas águas doces e de baixa salinidade da foz Amazônica habitando com mais frequência o canal dos principais rios e afluentes de águas brancas como os rios Madeira, Japurá, Solimões e Ucayali (Eigemann & Eigenmann, 1971; Goulding, 1979, Zuanon, 1990; Barletta, 1995, Sanyo, 1998).

A dourada é um peixe migrador que parece se desenvolver em três regiões diferentes: 1. As cabeceiras – locais de reprodução ; 2. O estuário – área de criação e 3. O médio Amazonas para alimentação e crescimento (figura 02) (Barthem & Goulding, 1997). Esse bagre em sua migração percorre mais de 4.000 Km do estuário até as áreas de desova a fim de completar o seu ciclo de vida (Barthem, 1990).

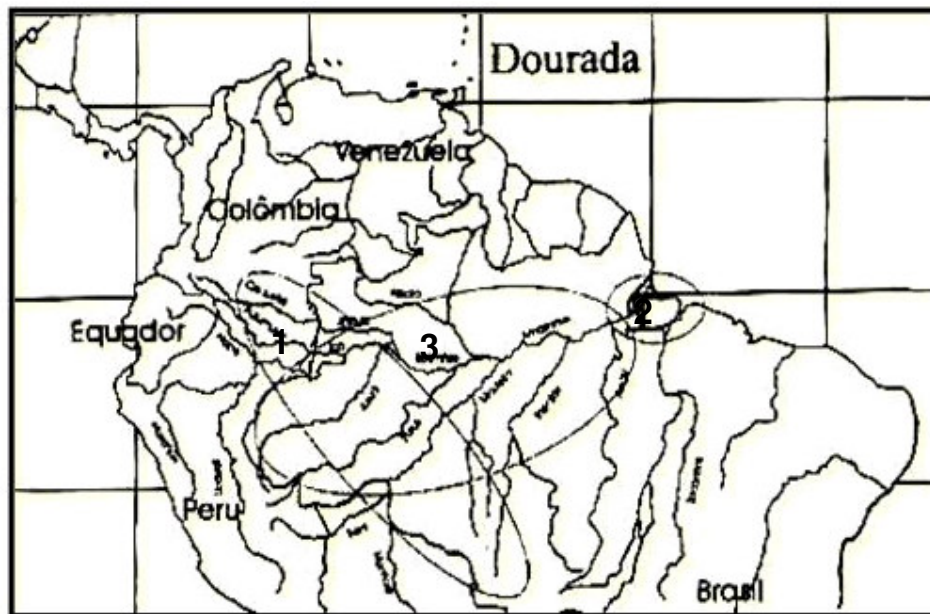


Figura 02 - As migrações da dourada. 1) Área hipotética da desova; 2) Área de criação; 3) Área de Alimentação dos pré-adultos e adultos. Adaptado de Barthem & Goulding, (1997).

1.2 Importância comercial da Dourada

A atividade pesqueira movimenta anualmente cerca de US\$ 100 bilhões em todo o mundo, produzindo aproximadamente 85.000.000t/ano. Destes 13.000.000t/ano são provenientes da pesca em águas doces de todo o mundo (Bone *et al.*, 1995). A maior parte da pesca continental é realizada na Ásia, seguida pela África. Em terceiro lugar, encontra-se a América Latina, produzindo anualmente em torno de 800.000t de pescado, sendo que cerca de 10% deste total é produzido nas águas doces da Amazônia (Welcomme, 1996).

A dourada é uma das duas espécies de bagres mais importantes para pesca comercial e artesanal na Amazônia e capturada em cinco países: Brasil, Colômbia, Peru, Venezuela e Equador (Barthem & Goulding, 1997). Devido à ampla distribuição na Amazônia Central é explorada pelas frotas pesqueiras das maiores cidades e vilas ao longo do rio Amazonas-Solimões, desde Iquitos, no Peru, até a região do estuário do rio Amazonas, em Belém e nos rios Madeira, Purus, Juruá, Japurá (Salinas, 1993; Barthem & Goulding, 1997).

Dados de desembarque, ainda que atualmente insipientes, mostram o seguinte cenário para alguns dos locais onde a pesca da dourada é intensa ao longo de sua área de distribuição: A região do alto Solimões, que inclui Amazônia peruana e colombiana, são regiões complexas por compreenderem zonas de fronteira. Seus

principais centros de desembarque de pescado são Iquitos, no Peru, Letícia, na Colômbia, e Tabatinga, no Brasil (Bayley, 1981).

As espécies de exploração comercial são mais de 200, porém a composição do desembarque é baseada em um número reduzido de espécies. Em 1992, na cidade de Iquitos, na Amazônia peruana, foi registrado um desembarque de cerca de 5.000t de pescado e verificou-se que a dourada se encontrava entre as 13 espécies que representaram 82% da captura comercial total (Barthem, 1992).

A estimativa de desembarque de pescado na cidade de Tabatinga foi em torno de 8.500t de dourada em 1987(SUDEPE). Na cidade de Letícia, do outro lado da fronteira, o desembarque foi em torno de 3.200t/ano nos anos de 1977 e 1982 e onde a pesca ocorre o ano inteiro (Petrere Jr., 1983; Ruffino *et al.* 2000; Salinas, 1993).

Os mercados de Tefé e Alvarães anualmente comercializam cerca de 90t a 1.500t de pescado, onde esta estatística não inclui o peixe seco e salgado e nem o que é comercializado pelos frigoríficos da região, tendo em vista que este tipo de pescado é desembarcado fora do mercado e tende a abastecer consumidores de outras regiões (Goulding, 1993).

Na Amazônia central, a pesca é selecionada e na cidade de Manaus o consumo de bagres possui um certo tabu, que pode está relacionado com interpretações bíblicas aversas ao consumo de peixes sem escamas, além de credices interioranas dizerem que esses bagres causam ou pioram inúmeras doenças dentre as quais estão as inflamações da pele e danos ao fígado, embora não se tenham evidências científicas (Barthem & Goulding, 1997, Begossi, 1992; Smith, 1979).

Petrere Jr. (1978) mostrou com dados de desembarque pesqueiro, que os bagres representam menos de que 1% dos peixes comercializados em Manaus, conseqüentemente, possui baixo valor econômico, comparado com a situação em Belém, onde os bagres são peixes populares no mercado e bastante consumidos.

Em Belém, Santarém e Manaus, entre agosto e novembro ocorre um pico de captura de dourada quando as mesmas, em cardume, estão subindo o rio. (Ruffino *et al.*, 2000).

Em função da exploração comercial deste recurso ocorrer em diversas áreas, que abrange o território de cinco países, estudos populacionais precisam ser realizados ao longo de toda a área de migração a fim de conhecer melhor o seu ciclo de vida. Neste intuito Batista (2001) realizou um trabalho pioneiro no qual a hipótese,

anteriormente postulada por Barthem & Goulding (1997), baseada em dados morfométricos e merísticos, foi testada pela primeira vez, sob o ponto de vista genético. Este estudo verificou que na calha do rio Solimões-Amazonas há uma mistura dos indivíduos provenientes das regiões de desova. Porém, a decrescente variabilidade genética apresentada no sentido estuário Amazônico-Letícia (alto Solimões) dar-se em função da escolha não aleatória dos rios para reproduzir, sendo os afluentes vias de “diluição e distribuição” dessa variabilidade.

Diante deste cenário, este trabalho objetiva-se também em melhor conhecer as razões que possam explicar o decréscimo da variabilidade genética entre o médio e o alto Solimões, contribuindo assim para a melhor compreensão do ciclo de vida da dourada na Amazônia baseados em dados genéticos. Para tanto, foram analisados indivíduos de dourada proveniente de três localidades ao longo do rio Japurá, um dos afluentes utilizados na rota migratória para desovar. Os resultados obtidos poderão contribuir na elaboração de um plano de conservação e manejo que visa explorar esse recurso de forma sustentável em toda a área de distribuição e exploração da dourada.

1.3 Uso de DNA em estudos de genética de populações

Os DNAs de vários seres vivos são extremamente grandes, porém, toda a informação gênica está contida praticamente dentro do núcleo celular. O DNA possui um alto grau de organização estrutural. Ele está muito bem empacotado formando hélices em espirais (Lehninger, 1995).

O uso das informações contidas no DNA vem proporcionando estudos sobre a história evolutiva de populações e espécies abrindo novos horizontes nos estudos de biologia molecular. Esses estudos podem gerar subsídios primordiais para fins de conservação e manejo de vários organismos (Moritz *et al.*, 1987).

Um dos marcadores moleculares mais utilizados em estudos populacionais é a seqüência nucleotídica de um ou mais genes ou fragmentos de DNA. Os mais freqüentemente estudados para este fim é o DNA mitocondrial (DNAMt) (Awise, 1994).

O DNAMt dos animais é circular, de fita dupla e de múltiplas cópias na mitocôndria. Seu tamanho é em torno de 16500 ± 500 pares de bases (pb) (Moritz, *et al.*, 1987). Sua organização inclui 13 genes codificadores de proteínas, 22 de RNA

transportador (tRNAs), 2 de RNAs ribossômicos (12S e 16S rRNA) e uma região não codificadora chamada de região controle ou alça-D (*D-loop*) (Meyer, 1993).

A herança mitocondrial é distinta da cromossômica, assim na contribuição biológica para a fecundação não é igual para fêmeas e machos. Só elas transmitem o chamado “outro genoma”, o DNA mitocondrial, que só existe nos óvulos. Ou seja, sabe-se que o DNA mitocondrial (DNAm_t) de filhas e filhos é herdado apenas da mãe. (Oliveira, 1997).

O desenvolvimento acelerado das técnicas de sequenciamento nas últimas duas décadas permitiu uma grande revolução no uso das ferramentas moleculares. Hoje é cada vez mais comum o sequenciamento de genomas no campo recém-batizado de “genômica” (Wilson *et al.*, 1999).

Entre os genomas que já foram seqüenciados, os genomas mitocondriais se destacam em número e abrangência dos estudos realizados. Entre os filós, há mais 200 genomas mitocondriais completamente seqüenciados, e vem sendo publicada a taxa de um genoma por mês (Curole e Kocher, 1999). Em um avanço que seria imprescindível à uma década, a técnica hoje é utilizada inclusive em estudos intraespecíficos (Ingman *et al.*, 2000; Rand, 2001). A importância dos estudos da “mitogênica” vem aumentando de forma crescente, devido as propriedades únicas do DNAm_t (Ingman *et al.*, 2000; Rand, 2001).

Essa estrutura econômica de conteúdo da maioria dos genomas mitocôndrias animais é atribuída a uma intensa seleção a favor de um genoma pequeno (Moritz *et al.*, 1987).

Por outro lado, essa molécula apresenta uma alta taxa de evolução por mutação (Brow, 1985), cerca de 5 a 10 vezes mais rápida do que a taxa de mutação de um gene nuclear de cópia única (Moritz *et al.*, 1987; Harrison, 1985). Os erros de replicação e as altas concentrações de compostos de oxigênio, capazes de danificar o DNA, aliado a um sistema de reparo ineficiente, parecem ser os responsáveis pelo acúmulo de mutações do DNAm_t (Wilson *et al.*, 1999). Há uma hipótese de que tais substituições devam ser menos restritas em relação ao DNA do núcleo, porque o genoma mitocondrial codifica poucas cadeias polipeptídicas e nenhuma delas é diretamente envolvida com sua replicação e transcrição (Moritz *et al.*, 1987).

Além de todos esses genes há uma região rica em AT (em vertebrados, é chamado D-Loop), não codificadora e que parece conter o controle da replicação e transcrição do DNAm_t (Wolstenholme, 1985). Essa região é muito variável nos organismos em termos de conteúdo e tamanho ao contrário dos genes, que se

apresentam similares em tamanho em ampla gama de espécies, entre invertebrados e vertebrados (Brown, 1983; Moritz *et al.*, 1987).

2 - OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL:

Estimar a variabilidade Genética da Dourada (*Brachyplatystoma rousseauxii*) do rio Japurá na Amazônia, através da seqüência nucleotídica da região controle, de indivíduos provenientes de três localidades situadas ao longo do referido rio: Boca do lago do Jacaré, Vila Bittencourt (alto Japurá) e da comunidade pesqueira do Cuiu-Cuiu localizada próximo ao município de Maraã.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- ✓ Determinar a seqüência nucleotídica da região controle do DNA mitocondrial dos indivíduos de dourada coletados em três localidades: Boca do lago do Jacaré, cuiu cuiu e Vila Bitencourt;
- ✓ Definir a distribuição da variabilidade genética em (*Brachyplatystoma rousseauxii*) dos três locais de coletas ao longo, Boca do jacaré, cuiú-cuiú e Vila Bittencourt ao longo do rio Japurá, complementando os dados já obtidos por Batista (2001).
- ✓ Identificar os haplotipos dos indivíduos coletados e sequenciados de dourada do rio Japurá;
- ✓ Verificar geneticamente se os indivíduos coletados nas três localidades Boca do jacaré, cuiú-cuiú, pertencem a um mesmo estoque pesqueiro.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Locais de coleta, obtenção e preservação do material

Foram coletadas 37 amostras de tecido muscular de dourada junto a desembarques pesqueiros em três localidades: sendo 17 em Vila Bitencourt alto do rio Japurá; 11 da boca do lago do jacaré, e 09 na comunidade ribeirinha do Cuiu Cuiu, sendo este próximo ao município de Maraã, e a Reserva de Desenvolvimento Sustentável de Mamirauá-RDSM na Amazônia. As amostras de tecido (músculo) dos espécimens foram retiradas com material cirúrgico esterilizado e preservadas em álcool 70% e levadas ao Laboratório Temático de Biologia Molecular do INPA até a extração do DNA em laboratório.

3.2 Métodos laboratoriais

As etapas laboratoriais seguidas para a obtenção das seqüências nucleotídicas e dos resultados podem ser visualizadas na figura 03.

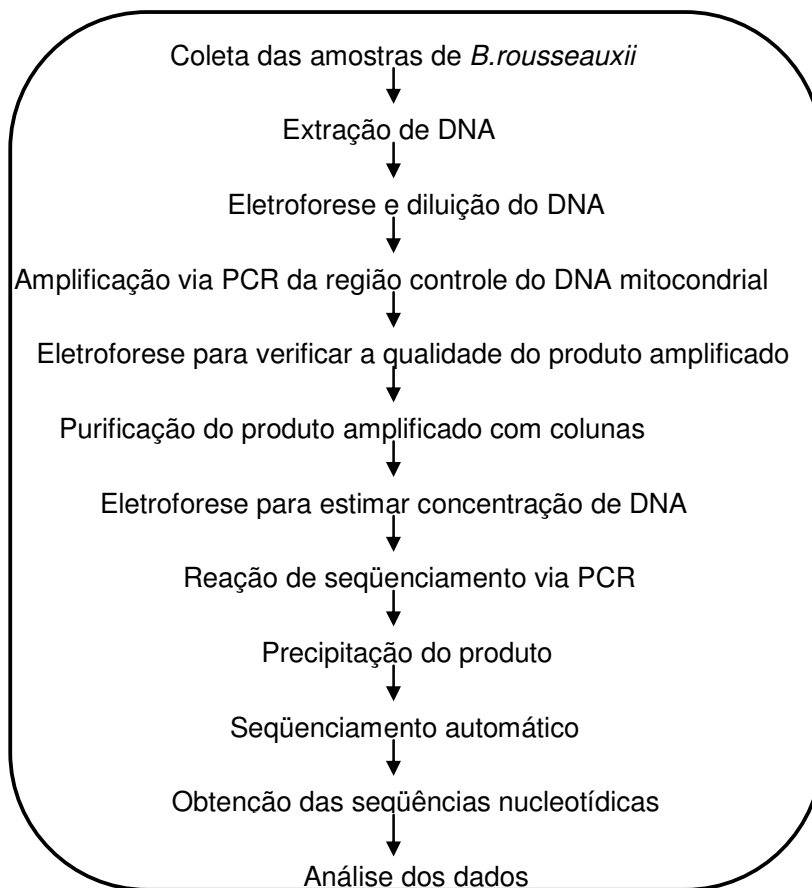


Figura 03 - Esquema com as etapas envolvidas no presente trabalho (Batista, 2001).

3.2.1 Extração de DNA

O DNA total (DNA mitocondrial + DNA nuclear) de cada indivíduo foi extraído seguindo o protocolo descrito em Alves-Gomes *et al.* (1995) com modificações de Batista (2001).

3.2.2 Digestão

É retirada uma quantidade de aproximadamente 200mg de tecido, o mesmo é macerado e colocado em um tubo eppendorf de 1,5 ou 2,0 ml, adiciona-se 330µL de tampão de extração a base de cloreto de sódio, Tris, Hcl e EDTA, 15µL de proteinase K, 10µL de DTT em seguida a amostra é levada para o banho-maria a uma temperatura de 37°C durante 12 horas sendo dado início ao processo de digestão, nesta fase haverá o rompimento de membranas com a degradação das proteínas, lipídeos e outras macromoléculas.

3.2.3 Extração do DNA a partir do material digerido

Após o período de digestão, cada tubo foi centrifugado durante 5 minutos a 13000g e depois o sobrenadante foi transferido para um novo tubo e adicionou-se uma solução de 180µL cloreto de sódio(NaCl) 5M ao sobrenadante a fim de precipitar substâncias orgânicas com exceção do DNA. O tubo foi novamente centrifugado durante 5 minutos a 13000g e transferiu-se o sobrenadante para um novo tubo. Em seguida o DNA foi precipitado com isopropanol 100%, nesse momento é possível a visualização de uma “nuvem” que se pressupõem ser o DNA, centrifugou-se e houve posteriormente a formação de um *pellet* que foi lavado com álcool 70% e centrifugado por 1 minuto a 13000g e em seguida descartado o álcool e levado a estufa para secar. Por fim a amostra ressuspensa em 150 µL de água *milli-Q*.

A análise da concentração e qualidade do DNA total extraído foi estabelecida através de comparações com marcadores moleculares de concentrações conhecidas em eletroforese de gel de agarose a 1%. O gel foi colocado em uma cuba eletroforética sob uma voltagem de 70 Volts e corrente de 30 miliAmperes por aproximadamente 40 minutos. Após a corrida, o gel foi corado em uma solução de brometo de etídio, colocado em transluminador UV, e fotografado em sistema de foto

documentação *Eagle Eye*. A concentração da amostra foi estimada visualmente mediante a comparação da amostra com marcador molecular em diferentes concentrações.

Uma vez extraído e checada a qualidade, o DNA de cada espécime foi armazenado em tubos de eppendorf, rotulado e mantido em freezers -20°C até uso posterior. O DNA extraído foi utilizado como substrato nas etapas seguintes.

3.2.4 Amplificação in vitro do DNA pela PCR (Mullis & Fallona, 1987).

A PCR (*Polimerase Chain Reaction*) é uma técnica da reação de polimerase em cadeia, consiste na amplificação em milhares de cópias do fragmento a ser estudado, que em questão é a região controle do DNA mitocondrial, com a utilização de *primers* específicos.

A reação foi realizada em tubos de eppendorf de 0.2 ml, com os seguintes reagentes e suas concentrações finais como mostra tabela 01:

Tabela 01- Concentrações finais dos reagentes utilizados na amplificação da região controle do DNAmt dos espécimens de dourada.

Reagentes	Concentração Final
Cloreto de magnésio	2 mM
Tampão	1X
DNTPs	[0,2 mM]
F-TTF	0,2 μM
F-12R	[0,2 μM]
Taq DNA polimerase	[0,03 U/ μL]
DNA total do espécime	[0,4 – 4 ng/ μL]

Os “*primers*” (iniciadores) (Sivasundar, 2000) utilizados localizam-se adjacentes à região controle do DNA mitocondrial, e tem as seguintes seqüências:

- F-TTF: 5' - GCC TAA GAG CAT CGG TCT TGT AA – 3';

- F-12R: 5' – GTC AGG ACC ATG CCT TTG TG – 3'.

Cada tubo foi colocado em termociclador, programado para realizar 30 ciclos com o seguinte perfil de temperatura: os primeiros cinco ciclos constituídos de um minuto a 94°C para a desnaturação das fitas complementares do DNA, um minuto a 53°C para anelamento dos primers complementares a região controle 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.

Ao término da reação, o produto de PCR foi avaliado quali-quantitativamente com a aplicação de 3µL do produto em gel de agarose 1%, sendo efetuada a eletroforese durante 40 minutos com corrente de 70 amperes, corado em 10% brometo de etídio e verificado o tamanho do fragmento comparando-o com marcador molecular.

3.2.5 Purificação do produto amplificado

O processo de purificação tem por objetivo retirar produtos que não foram incorporados durante o processo de PCR, como *dNTPs*, *primers*, sais entre outros. A purificação foi realizada com o Kit GFX PCR (*Amersham Biosciences*), de acordo com as especificações do fabricante.

No tubo de PCR contendo a amostra já amplificada, foi adicionado o reagente para captura do produto amplificado e transferido para a coluna de purificação. Em seguida foi centrifugado por 30s à 13000g e adicionada um tampão de lavagem a base de etanol; posteriormente centrifugou-se por 30s transferiu-se a coluna de purificação para um novo tubo eppendorf, e a ela acrescentou-se 50µL de água quente, em média 90°C, para o DNA. A coluna foi novamente centrifugada por 30s, e por fim o DNA amplificado e purificado é avaliado quali-quantitativamente em gel de agarose 1%, posteriormente armazenado a – 20°C, para ser utilizado na reação de sequenciamento.

3.2.6 Reação de seqüenciamento

O DNA das amostras de *B.rousseauxii* foi seqüenciado utilizando o kit de seqüenciamento *MegaBACE Dynamic ET*. Em função de a região controle ter em torno de 1000pb, cada amostra foi seqüenciada em duas etapas, uma com o *primer* F, obtendo-se em torno de 600pb e outra com *primer* R obtendo-se mais 600pb iniciando-se, a partir da extremidade F do gene. Desta forma, foram geradas duas seqüências para cada indivíduo.

A reação de seqüenciamento foi realizada através da técnica de PCR, da qual para um volume final de 10 μ L foram utilizados os seguintes reagentes:

- 4 μ L de *Dyynamic dye terminator (ET)*;
- *Primer (F)* ou (R) a [0.4 μ M];
- 120 ng de DNA purificado
- Água *Milli-Q* autoclavada.

A reação foi realizada em uma placa tipo saia para seqüenciamento contendo 96 *Wells*. A mesma foi levada ao termociclador por 30 ciclos com um perfil de temperatura de 20 segundos à 95°C para desnaturar as fitas complementares, 15 segundos à 50°C, para o anelamento do *primer* e 1 minuto e 20 segundos para extensão da região a ser seqüenciada.

3.2.7 Precipitação do produto da reação de seqüenciamento

Após a reação de seqüenciamento é dado início ao processo de precipitação das amostras, com a finalidade de eliminar reagentes não incorporados na reação.

Cada produto da reação de sequenciamento é precipitado com 1 μ l acetato de amônio, 7,5 M e 27,5 μ l etanol 100%, seguido de incubação a temperatura ambiente por 10 minutos. Em seguida é centrifugado por 45 minutos a 4000rpm, descartado o sobrenadante por inversão, o "*pellet*" (DNA purificado) foi lavado com 120 μ l etanol 70%. Centrifugado novamente por 10 minutos a 4000 rpm, descartado novamente o sobrenadante por inversão e secar em temperatura ambiente por aproximadamente 15 minutos. A amostra foi ressuspensa em 10 μ l formamida (agente desnaturante das fitas de DNA), e em seguida eletroinjetada.

3.2.8 Eletroforese de seqüenciamento

Para a obtenção da seqüência nucleotídica final, o DNA foi submetido a uma eletroforese capilar em gel de policrilamida, a reação foi eletroinjetada no seqüenciador automático *megaBace* 1000 do Laboratório Temático de Biologia molecular do INPA, seguindo a metodologia padrão do fabricante, sendo feitas eletroforeses com parâmetros de injeção de 2Kv durante 100 segundos e de corrida com 6 Kv por 220 minutos.

3.2.9 Edição e alinhamento das seqüências nucleotídicas

Após a obtenção das seqüências nucleotídicas, a partir do seqüenciador automático, elas foram editadas (conferência, compilação e alinhamento) com auxílio dos programas computacionais *Bioedit* Hall (1999), e *Chromas* 2,23 (www.technelysium.com.au/chromas.html). Foi originada uma matriz de dados contendo 37 indivíduos de *B.rousseauixii* coletados.

3.2.10 Análises estatísticas dos haplotipos e polimorfismos de DNA

Foram estimados as análise dos haplotipos e índices de polimórficos de DNA, com auxílio do programa Arlequin 2.0(Schneider *et al.*, 2000) e *DNAsp 3.0* (Rozas & Rozas, 1999).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 – Extração e amplificação da região controle

Foram extraídos o DNA total de 37 espécimens de *B.rousseauxi* coletados em três localidades: sendo 17 de Vila Bittencourt (alto rio Japurá), 11 da boca do lago do Jacaré e 09 da comunidade do Cuiu cuiu. As duas últimas localidades ficam próximas ao município de Maraã e da reserva de desenvolvimento sustentável Mamirauá.

A eletroforese, em gel de agarose 1%, do DNA total dos 37 espécimens de *B.rousseauxii* coletados pode ser visualizada na figura 04.

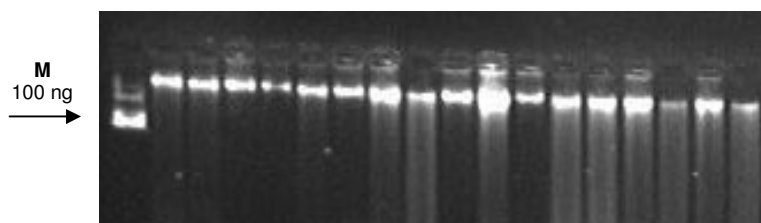


Figura 04 – eletroforese em gel de agarose 1% do DNA total dos 37 espécimens de *B.rousseauxii*.

Na figura 05 consta o produto amplificado de 1000 pb da região controle de alguns indivíduos de *B.rousseauxii* coletados.

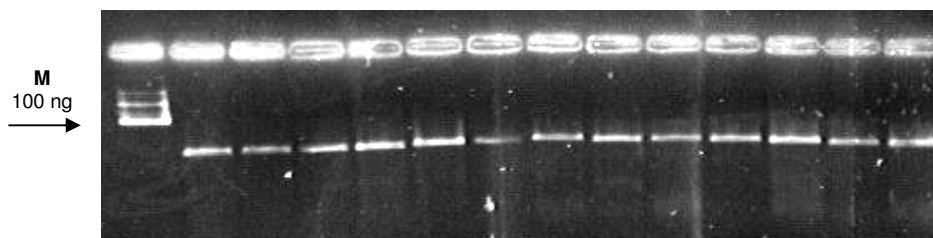


Figura 05 – eletroforese em gel de agarose 1% dos produtos amplificados de alguns espécimens de *B.rousseauxii*.

4.2 – Composição da frequência de bases nucleotídicas

A figura 06 mostra a frequência de bases obtidas a partir da matriz de dados contendo os 37 indivíduos seqüenciados de dourada. A porcentagem da composição das bases nucleotídicas foi: 21,24% de adenina; 31,76% de citosina; 32,95% de guanina e 14,05% de timina. As maiores porcentagens foram de citosina e guanina.

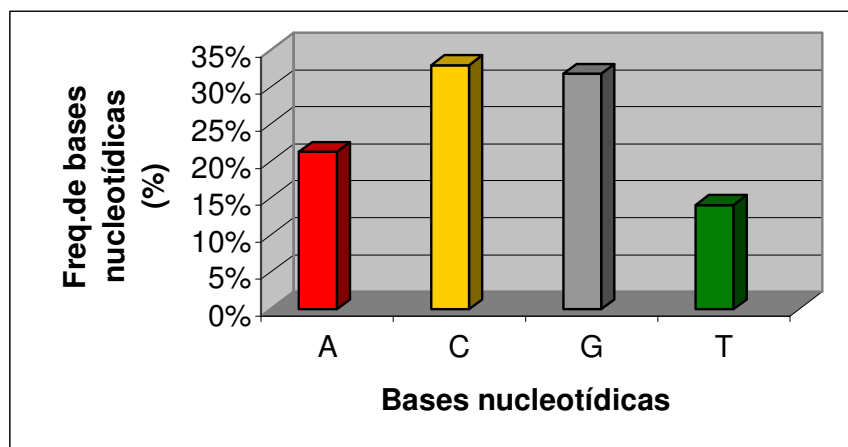


Figura 06- Porcentagem da frequência de bases nucleotídicas da seqüência nucleotídica da região controle dos 37 indivíduos de *B. rousseauxii* amostrados.

4.3 - Análise das seqüências nucleotídicas da Região controle

Ao término da corrida eletroforética, as seqüências nucleotídicas foram obtidas, conferidas, alinhadas, editadas e compiladas com o auxílio dos programas Bioedit (Hall, 1999) e Chromas 2.23 (www.technelysium.com.au/chromas.html). Após a compilação foi gerada uma matriz de dados contendo a seqüência nucleotídica dos 37 indivíduos de *B. rousseauxii*. Cada seqüência totalizou 911 pb para cada indivíduo seqüenciado, nos quais não foi necessário introduzir nenhum *gap* (inserções e/ou deleções).

4.4 - Análises de Polimorfismo de DNA

A tabela 02 mostra os índices de polimorfismo de DNA para cada localidade amostrada de *B. rousseauxii*. Os seguintes índices foram obtidos com o auxílio dos programas Arlequin 2.0 (Schneider *et al.*, 2000) e DNAsp 3.51 (Rozas & Rozas, 1999): **N** = número de indivíduos amostrados e seqüenciados; **H** = frequência haplotípica; **TS** = número de transições; **TV** = número de transversões; **ETA** = número total de mutações; **S** = número de sítios polimórficos e **K** = número de diferenças nucleotídicas par a par.

Dentre os 911 pb de cada um dos 17 indivíduos seqüenciados provenientes de Vila Bittencourt, foram observadas 29 mutações, distribuídas em 28 sítios, sendo 27 transições, 2 transversões e 12 haplotipos.

Entre os 11 indivíduos coletados na boca do lago do Jacaré verificou-se um total de 33 mutações distribuídas em 29 sítios sendo 29 eventos de transição e 4 de transversões. Para cada espécimen seqüenciado obteve-se um haplotipo.

Nos 09 indivíduos seqüenciados, procedentes da comunidade do Cuiu cuiu, foram verificadas 26 mutações, 24 transições e 02 transversões, distribuídas em 25 sítios. Nessa localidade também obteve 01 haplotipo para cada espécimen coletado.

Tabela 02 – Índices de polimorfismo de DNA obtidos da seqüência nucleotídica da região controle do DNA mitocondrial de 37 indivíduos de *B. rousseauxii* coletados em 03 localidades do rio Japurá.

População	N	H	TS	TV	S	ETA	K
Vila Bittencourt	17	12	27	2	28	29	7.985±3.904
Boca do Jacaré	11	11	29	4	29	33	9.290±4.627
Cuiu Cuiu	9	9	24	2	25	26	8.166±4.185

A figura 07 mostra um histograma comparativo entre os indivíduos seqüenciados de dourada proveniente das três localidades do rio Japurá amostradas. A fim de melhor visualizar a variabilidade genética desses indivíduos o mesmo foi construído com base em três índices de polimorfismos de DNA obtidos para cada localidade tais como: o número total de sítios polimórficos, **S**; o número total de mutações, **ETA**; e a média das diferenças nucleotídicas par a par, **K**.

Mediante o histograma apresentado na figura 07 e os resultados apresentados na tabela 02, pode-se visualizar que os maiores índices de polimorfismos de DNA foram encontrados entre os indivíduos de dourada, provenientes da localidade da boca do lago do Jacaré ($S = 29$, $ETA = 33$ e $K = 9.290$), apresentando, assim a maior variabilidade genética entre as 03 localidades amostradas. No entanto, os espécimens oriundos da comunidade do Cuiu Cuiu apresentaram os menores índices de variabilidade genética ($S = 25$ e $ETA = 26$).

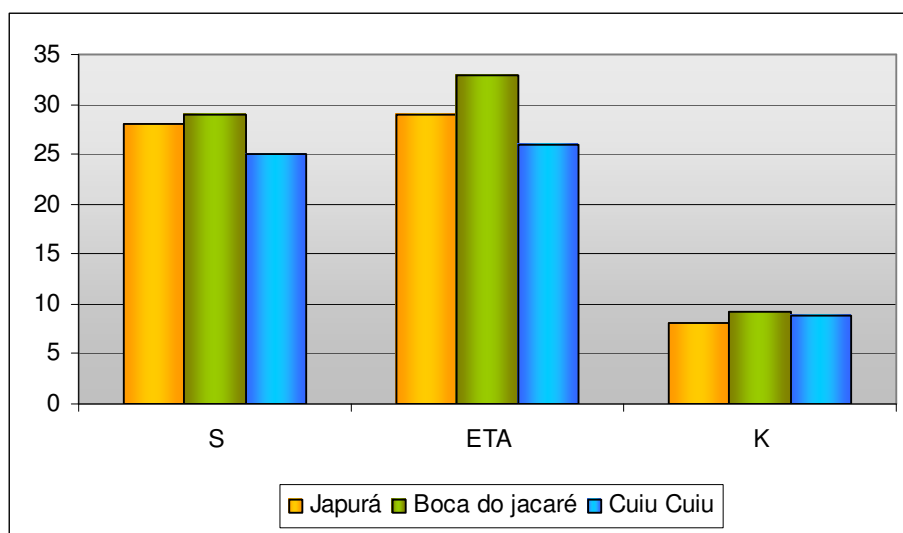


Figura 07 - Histograma representativo da variabilidade nucleotídica observada nas amostras de *B.rousseauxii* provenientes de Vila Bitencourt (alto rio Japurá) em amarelo, a boca do lago do Jacaré (Verde) e Cuiu Cuiu (Azul); onde **S** é número de sítios polimórficos; **ETA** é o número total de mutações e **K** é a média da variabilidade nucleotídica par a par.

Na tabela 03 constam os índices de polimorfismo de DNA estimados para cada comparação par a par das localidades amostradas de *B. Rousseauxii* do rio Japurá. Os índices são: **N** = número de indivíduos amostrados e sequenciados; **S** = número de sítios polimórficos; **ETA** = número total de mutações; **P1m2** = sítios polimórficos na população 1 e monomórficos na população 2; **P2m1** = sítios polimórficos na população 2 e monomórficos na população 1; **DF** = diferença fixadas nas populações; **MC** = número de mutações compartilhadas entre as populações; **K** = média das diferenças nucleotídicas par a par.

Verifica-se, mediante os valores de S = 39, ETA = 43, p1m2 = 17, p2m1 = 10 e MC = 16 (tabela 03), que a maior distância genética ocorreu entre os indivíduos coletados na boca do lago do jacaré e da comunidade do Cuiu cuiu. Enquanto que os valores de ETA = 26, p1m2 = 10, p2m1 = 7 e MC = 19 (tabela 03) demonstram que a menor variabilidade genética está entre as localidades de Vila Bitencourt e a comunidade do Cuiu-cuiu.

Tabela 03- Resultados da análise de polimorfismos de DNA obtidos entre pares de populações do *B.rousseauuxii* do rio Japurá.

	N	S	ETA	P1m2	P2m1	DF	M C
Vila Bitencourt (1)							
X	28	35	39	6	10	0	23
Boca do Jacaré (2)							
Vila Bitencourt (1)							
X	26	35	26	10	7	0	19
Cuiu Cuiu(2)							
Boca do Jacaré (1)							
X	20	39	43	17	10	0	16
Cuiu Cuiu(2)							

Não foram encontradas diferenças fixadas entre os indivíduos sequenciados para cada localidade. Essa pode ser uma medida indireta de que possa haver fluxo gênico entre os mesmos.

A fim de verificar o compartilhamento de indivíduos e haplotipos entre os espécimens provenientes da três localidades amostradas do rio Japurá, foi gerada uma matriz genética de compartilhamento (tabela 04), com o auxílio do programa ARLEQUIN 2.0 (Schneider *et al.*, 2000). Verifica-se que houve compartilhamento de haplotipos, representados por 03 indivíduos, entre as localidades provenientes de Vila Bittencourt e a boca do lago do Jacaré e também entre a primeira e a

comunidade do Cuiu cuiu. Não houve haplotipos compartilhados entre as localidades da boca do lago do Jacaré e da comunidade do Cuiu cuiu. No entanto, esse resultado não é um índice estimador de segregação genética entre tais localidades. Essa hipótese é corroborada pelos resultados de diferenças fixadas obtidas (DF = 0, tabela 03).

Tabela 04 – Matriz de compartilhamento de haplótipos e indivíduos entre os indivíduos de *B. rousseauxii* provenientes das três localidades no rio Japurá.

	Japurá	Boca do Jacaré	Cuiu-Cuiu
Japurá	*		
Boca do Jacaré	3	*	
Cuiu-Cuiu	1	0	*

Alguns trabalhos já foram realizados com genética de populações, filogenia e filogeografia de peixes amazônicos, utilizando também como marcador molecular seqüências nucleotídicas da região controle do DNA mitocondrial. Dentre os quais pode-se destacar: o realizado por Porto (1999), ao utilizar a alça-D, e outros genes mitocondriais e dados cariotípicos, com o objetivo de caracterizar geneticamente três populações de *Mylesinus paraschomburkii* (uma espécie de pacu) da bacia de drenagem do Uatumã, trombetas e Jarí, e tentar traçar relações filogenéticas com algumas espécies da família Serrasalminidae. Foi verificado que a região controle tem um índice maior de divergência interpopulacional de 5,2%.

Já o trabalho realizado por Lucena & Alves-Gomes (2003) foi realizado no intuito de estudar a filogeografia de *Hypopygus lepturus* (Rhamphichthyidae, Gymnotiformes) com o objetivo de Testar a hipótese do rio Negro ser uma Barreira de dispersão bem como verificar o nível de variabilidade intraespecífica entre os indivíduos dessa espécie.

O trabalho pioneiro em genética de *B.rousseauxii* foi realizado por Batista (2001). Até então a hipótese de migração e a existência de um único estoque pesqueiro para essa espécie, postulada por Barthem & Goulding (1997), ainda não havia sido testada. Mediante esse estudo, ao estudar indivíduos de dourada proveniente do estuário Amazônico, sendo uma localidade representativa da área de criação, Manaus, sendo da área de alimentação e crescimento e Letícia, alto Solimões, representativa da área de reprodução, foi verificado que há um decréscimo da variabilidade genética no sentido estuário – alto Solimões. Segundo a

autora isso decorre em função de durante a migração para desovar, os indivíduos migram em direção ao tributário do Solimões – Amazonas chegando uma menor fração da população na região de Letícia (alto Solimões). Foi verificado que na calha principal do Solimões-Amazonas há a congregação dos indivíduos gerados nos diferentes tributários, inclusive o rio Japurá.

A fim de complementar esses resultados esse trabalho objetivou estimar a variabilidade genética de *B. rousseauxii* do rio Japurá no intuito de melhor entender as razões pelas quais há o decréscimo da variabilidade genética entre a Amazônia central (Manaus) e o alto Solimões (Letícia). Outro tributário há entre essas duas regiões, porém, objetivou-se também e pioneiramente verificar a variabilidade genética de dourada em um tributário onde há uma reserva de desenvolvimento Sustentável, a de Mamirauá em Tefé-AM. Em outras palavras, tinha-se o intuito de estudar a variabilidade genética oriunda de uma área manejada, já que um dos objetivos primordiais do estudo genético populacional de *B.rousseauxii*, na Amazônia, é contribuir na elaboração de políticas e medidas de manejo para essa espécie.

Desta forma, interessante verificou-se, para duas localidades amostradas nesse trabalho, boca do lago do Jacaré e a comunidade do Cuiu cuiu, níveis relevantes de variabilidade genética, ainda que tenham sido estudados um numero reduzido de indivíduos.

Mediante os resultados obtidos é possível visualizar o seguinte cenário: o rio Japurá detém uma grande fração da variabilidade genética de *B.rousseauxii* na Amazônia, não só por ser uma das rotas migratórias enquanto tributário por hora da desova, como também haver uma reserva de desenvolvimento sustentável e por tanto, manejada; verifica-se também a relevante importância dos lagos de várzea daquela região que podem está servindo como “mini-berçários” da dourada.

5. CONCLUSÃO

Dos resultados obtidos com a estimativa da variabilidade genética de *B.rousseauxii* do rio Japurá, pode-se concluir que;

- Os indivíduos do lago do jacaré apresentaram os maiores níveis de variabilidade genética do rio Japurá e a localidade do Cuiu cuiu os menores níveis;
- Para as localidades da boca do lago do Jacaré e a comunidade do Cuiu cuiu verificou-se níveis relevantes de variabilidade genética em se tratando de serem próximos a uma área manejada;
- O rio Japurá detém uma grande fração da variabilidade genética de *B.rousseauxii* na Amazônia, não só por ser uma das rotas migratórias enquanto tributário por hora da desova, como também haver uma reserva de desenvolvimento sustentável;
- Verificou-se uma relativa importância dos lagos de várzea daquela região que podem está servindo como “mini-berçários” de dourada;
- O estudo da variabilidade genética entre os indivíduos de *B.rousseauxii* abriu novas perspectivas para futuras pesquisas, demonstrando a necessidade de aprofundar conhecimentos, no intuito também de subsidiar o manejo e conservação dos estoques não só de dourada, mas também de outras espécies de peixe na Amazônia.

6- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES-GOMES, J.A.; ORTI, G.; HAYGOOD, M.; HEILIGENBERG, W. AND 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, elctrophysiology, and mitochondrial sequence data*. Molecular Biology And Evolution, 12(2): 298-318.

AVISE, J.C. Molecular Markers, Natural History and Evolution. Chapman & Hall, London, 1994.

BAYLEY, P.B., PETRERE JR., M. Amazon fisheries: assessment methods, current status, and managemen options. (Dodge, D. P. ed.). Proceeding of the international large river symposium. Can. Spec. Publ. Fish. Aquat. Sci., v.106, 1989, p.385-398.

BARBOSA, R. P. Rios brasileiros com mais de 500 km de extensão. Revista BRASILEIRA DE Geografia, v.1, n.º 126, 1962, p. 134.

BARLETTA, M. Estudo da comunidade de peixes bentônicos em três áreas do canal principal, próximos a confluência dos rios negro e solimões-amazonas (Amazônia Central – Brasil) Tese de Mestrado, INPA/FUA, Manaus.

BARTHEM, R ; Goulding, M. 1997. Os Bagres Balizadores: Ecologia, migração e conservação de peixes amazônicos, Sociedade Civil Mamirauá; CNPQ, Brasília p.140.

BATISTA, J. S. 2001. Estimativa da Variabilidade intraespecífica da dourada (*Brachyplatystoma flavicans*) (Castelnau,1855) no eixo estuário, Amazonas-Solimões. Dissertação de Mestrado. INPA/UA. Manaus, Amazonas.p.116.

BEGOSSI, A., BRAGA, F.M.S. Food taboos and folk medicine fishermen from the Tocantins river (Brasil). Amazoniana, v. 12, n.1, 1992, p. 101-118.

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. 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. Th mitochondrial genome of animals. In: MacIntvre, R.J.(ed). Molecular Evolutionary genetics. Plenum Press, New York. P. 95-130.

BONE, Q., MARSHALL, N. B., BLAXTER, J.H.S. Biology of Fishes. 2nd. Edition. Blackie Academic, Professional. Glasgow. 1995, 332 p.

BARTHEM , R.B.1990. Ecologia e pesca da piramutaba(*Brachyplatystoma vaillanti*). Tese de Doutorado. Campinas, Instituto de Biologia da Unicamp . 286p.

BARTHEM, R.B.1992. Desenvolvimento da pesca comercial na bacia amazônica e conseqüências para os estoques pesqueiros e a pesca de subsistência. In: Desenvolvimentos sustentável nos trópicos úmidos (Aragon, L. E. Ed.), Belém: UNAMAZ/UFGA. Série Cooperação Amazônica, n. 13 p. 1-643.

BAYLEY, P.B. 1981. Fish yield from the Amazon in Brasil: copmparisons with africam river yields and management possibilities. Trans. Am. Fish. Soc., n. 110, p. 351-359.

CUROLE, P. Jason. JP and TD KOCHER. Mitogenomics: digging deeper with mitochondrial genomes. Trends in ecology and evolution. 1999.

EIGENMANN, C. H., EIGENMANN, R.S. A revision of South American Nematognathi, or catfishes. Occasional Papers of the California Academy of Sciences, n,1, 1971.

FERREIRA, E. J. G. Alimentação dos adultos de doze espécies de ciclídeos (Perciformes, Cichlidae) do rio negro, Brasil, PPG, Manaus. INPA/FUA. 1998, p. 254.

GOULDING, M. 1979. Ecologia da pesca do rio Madeira. Trad. De Naércio Menezes. Manaus, INPA, p.172.

GOULDING, M. 1993. Flooded Forest of the Amazon. *Scientific American*, n. 268, p. 114-120.

HONDA, E.M.S. Contribuição ao conhecimento da biologia de peixes do Amazonas. II Alimentação do tambaqui, *Colossoma bidens* (Spix). *Acta Amazônica*, n.4, 1976, p.47-53.

HARRISON, R.G., D.M., WHEELER, W.C. 1985. Mitochondrial DNA size variation within individual crickets. *Science*, 228: 1446-1448.

JUNK, W. J. Investigations on the ecology and production-biology of the "floating meadows"(Paspalo-Echinochloetum) on the middle Amazon. Part II. The aquatic fauna in the root zone of the floating vegetation. *Amazoniana*. n. 4, 1973, p. 9-102.

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.

LOWE-MCCONNEL, R.H. 1999. Estudos Ecológicos de Comunidades de Peixes Tropicais – São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo, (Coleção Base).p.536.

LEHNINGER, A. L NELSON D.L., COX, M.M. Princípios de bioquímica. 2^o edição. São Paulo: Sarvier, 1995, 839p.

LUNDBERG, G. JOHN; LITTMANN W. MICHAEL.*et al*,1991. Check List of the Freshwater Fishes of South and America, 435p.

LUCENA & ALVES-GOMES(2003). Filogeografia de *Hypopigus lepturus*(Rhamphichthyidae: Gymnotiformes): testando a hipótese do Rio Negro como barreira de dispersão. CNPq/INPA. Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica(PIBIC).

MATIOLI, S. R.; PASSOS-BUENO, M. R. S. 2001. Métodos baseados em PCR para análise de polimorfismo de ácidos nucléicos. *In: Matioli, S. R. Biologia molecular e evolução*. Holos Editora, Ribeirão Preto, p. 153-171.

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. Evolution of animal mitochondrial DNA: relevance for population biology and systematics. *Ann. Rev. Ecol. Syst.*, 1987.

MULLIS, K.; FALOONA, F. 1987. Specific synthesis of DNA in vitro via polimerase catalysed chain reaction. *Methods Enzymol.*, 55:335-350.

NEI, M. Molecular evolutionary Genetics. Columbia University Press, New York, NY, USA, 1987, 512p.

OLIVEIRA, C. Citotaxonomia de peixes. *In: V SIMPÓSIO DE CITOGENÉTICA EVOLUTIVA E APLICAÇÃO DE PEIXES NEOTROPICAIS*, 1997, Botucatu. V Simpósio de Citogenética Evolutiva e aplicação de peixes Neotropicais. Botucatu: Instituto de Biociências, 1997. v, 1, p. 2-5.

PORTO, J.I.R. 1999. Análises cariotípicas e sequenciamento de mtDNA de populações de *Mylesinus paraschomburgkii* (Characiformes, Serrasalminidae) da Bacia Amazônica. Tese de doutorado, INPA/UA, Manaus, Amazonas. p.120.

PETREIRE JR., M. 1978. Pesca e esforço no estado do Amazonas. II. Locais, aparelhos de captura e estatística de desembarque. *Acta Amazonica Supl.*, v. 2, n. 3, p. 1-54 .

PETREIRE JR., M. 1983. Yield per recruit of the tambaqui(*Colossoma macropomum* Cuvier, 1818) in the Amazonas State, Brasil. *J. Fish Biol.*, n. 22, p. 133-144.

RAND, T. G. "An assessment of mold contamination problems in Atlantic Canada schools: mold burdens, amplifying sites and benefits of proactive school inspection policies", *In "Bioaerosols, Fungi and Mycotoxins: Health Effects, Assessment,*

Prevention and Control", Edited by Johannings, E., Boyd Printing, Albany, New York. 2001.

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 pesqueira*. Edições IBAMA, Brasília.p.141-152.

RUFINO, M. L.; ISAAC, V. J. 2000. Ciclo de vida e parâmetros biológicos de algumas espécies de peixes da Amazônia. *In: IBAMA 2000. Recursos pesqueiros do médio Amazonas: biologia e estatística pesqueira*. Coleção Meio Ambiente. Série estudos da pesca. 22. Brasília: Edições IBAMA. 350p.

ROZAS, J. AND ROZAS, R. 1999. DNAsp version 3: an integrated program for molecular population genetics and molecular evolution analysis. *Bioinformatics*, 15:174-175.

SALATI, E. VOSE, P. B 1984,. Amazon basin: a system in equilibrium. *Science*, n.235, p.1062-1064.

SALATI, E., JUNK, W. J., SCHUBART, H. O., OLIVEIRA, A. E. 1983. Amazônia: desenvolvimento, integração e ecologia. São Paulo: Brasiliense, CNPq. 328p.

SALINAS, Y.1994. Aspectos de la biologia pesquera de las poblaciones de los grandes bagres (Ostariophysi: Siluriformes, Pimelodidae) en el sector colombiano del rio Amazonas. Tese de Graduação, Universidad Pedagógica Nacional, Santafé de Bogotá.

SANYO TECHNO MARINE. 1998. The fishery resources study of the Amazon and Tocantins River mouth areas in the Federative Republic of Brazil: Final report. Japan *International Cooperation Agency (JICA)*; *Museu Paraense Emílio Goeldi (MPEG)*; *Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Renováveis (IBAMA)*.p. 331.

SMITH, N.J.H. A pesca no rio Amazonas. CNPq/INPA. Manaus, 1979.

SCHNEIDER, S; ROESSLI, D.; EXCOFFIER, L. Arlequin Version 2000: A software for population genetic data analysis. Genetics and biometry laboratory, University of Geneva, Switzerland, 2000.

SIVASUNDAR, A.; BERMINGHAM, E.; GUILHERMO, O. 2000. Population structure and biogeography of migratory freshwater fishes (Prochilodus: Characiformes) in major south american rivers. *Molecular Ecology*, 10:407-417.

WILSON, G.A. E STROBECK, C. 1999. Genetic variatin within and relatedness among wood and plains bison populations. *Genome* 42: 483-496.

WELCOMME, R. L. Fisheries ecology of floodplain rivers. 2nd. Edition. Longman. London 317p.

WOLSTENHOLME, D. R; CLARY, D.O 1985. Sequence evolution of Drosophila mitochondrial DNA. *Genetics*, 109:725-744.

ZUANON, J. A.S. Aspectos da biologia, ecologia e pesca de grandes bagres (Pisces: Siluriformes, Siluroide) na área da ilha de Marchantaria – rio solimões, Am. Tese de Mestrado, INPA/FUA, Manaus. 1990.