INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA – INPA

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS – UFAM

PROGRAMAS DE PÓS GRADUAÇÃO DO INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA – PPG-INPA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA, CONSERVAÇÃO E BIOLOGIA EVOLUTIVA – PPG-GCBEV

ANÁLISE DA VARIABILIDADE GENÉTICA DAS POPULAÇÕES DE PIRARUCU (*Arapaima gigas,* SCHINZ 1822) DOS PRINCIPAIS TRIBUTÁRIOS DO RIO AMAZONAS ATRAVÉS DO USO DE MARCADORES MICROSSATÉLITES

ADAM SOUZA DE ALENCAR LEÃO

Manaus, Amazonas

Agosto, 2009

ADAM SOUZA DE ALENCAR LEÃO

ANÁLISE DA VARIABILIDADE GENÉTICA DAS POPULAÇÕES DE PIRARUCU (*Arapaima gigas,* SCHINZ 1822) DOS PRINCIPAIS TRIBUTÁRIOS DO RIO AMAZONAS ATRAVÉS DO USO DE MARCADORES MICROSSATÉLITES

ORIENTADORA: IZENI PIRES FARIAS, DRA.
Co-orientador: Tomas Hrbek, PhD.

Dissertação apresentada ao Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Genética, Conservação e Biologia Evolutiva.

Fonte Financiadora:

CNPq/PPG7	Processo No. **55326012005-7**
CT-Amazônia	Processo No. **557090/2005-0**
CT-Amazônia	Processo No. **554057/2006-9**
FAPEAM	**Temático**

Manaus, Amazonas
Agosto, 2009

FICHA CATALOGRÁFICA

L433 Leão, Adam Souza de Alencar
Análise da variabilidade genética das populações de pirarucu (Arapaima gigas, SCHINZ 1822) dos principais tributários do rio Amazonas através do uso de marcadores microssatélites / Adam Souza de Alencar Leão. --- Manaus : [s.n.], 2009.
xi, 72 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) --- INPA, Manaus, 2009.
Orientadora : Izeni Pires Farias
Coorientador : Tomas Hrbek
Área de concentração : Genética, Conservação e Biologia Evolutiva.

1. *Arapaima gigas.* 2. Genética de populações. 3. Variabilidade genética. 4. Pirarucu. I. Título.

CDD 19. ed. 597.50415

Sinopse:

Neste trabalho foi desenvolvido um estudo de genética de populações para a espécie *Arapaima gigas* Schinz, 1822 (*Arapaimidae*) com amostras coletadas em 20 localidades nos rios da calha e principais tributários da bacia Amazônica. Foram avaliados aspectos sobre a distribuição da variabilidade genética, estruturação genética e efeito de redução populacional.

Palavras-chave: Genética de populações, Conservação,

Sobrexploração pesqueira, estruturação genética, unidades de manejo, conservação.

Dedico este trabalho à minha querida mãe,
Marleide Oliveira, e a toda minha família, por ter me proporcionado condições de galgar na carreira acadêmica.

AGRADECIMENTOS

Não só nesta trajetória, mas durante toda minha vida, gostaria de agradecer a Deus, que me fornece vida, força, coragem e tudo que preciso.

Agradeço a toda minha família pelo apoio, compreensão, carinho, paciência e aprendizado em especial ao Alcimar, Erika, Ariel e Marleide.

Agradeço aos professores que puderam contribuir com sugestões para este trabalho, possibilitando a melhora deste e meu crescimento profissional. Acredito que as críticas quando bem usadas permitem o crescimento de quem as recebe, por isso um muito obrigado à Doutora Maria Zucchi, Doutora Maristerra Lemes, Doutor Fausto Foresti, Doutor Jorge Porto e ao Doutor Rodrigo Torres.

Agradeço carinhosamente a minha orientadora Doutora Izeni Pires Farias, pela dedicação e pelos mais diversos e valiosos ensinamentos, por estar sempre disposta a ajudar e a contribuir com o meu crescimento. Sou especialmente grato também ao meu co-orientador o Doutor Tomas Hrbek por todos os valiosos ensinamentos e pela valiosa contribuição nas análises estatísticas e na produção das figuras desta dissertação.

Agradeço aos colegas de turma, com quem compartilhei preciosos momentos de aprendizado: Marcos, Letícia, Isaura e Leandra.

Sou grato aos meus colegas do LEGAL (Laboratório de Evolução e Genética Animal) pelo ótimo ambiente de trabalho e pelos momentos de confraternização; Adriano, Andréia, Arthur, Áureo, Carlinha, Carlos, Cleiton, Concy, Dani, Daniel, Deyla, Eduardo, Edvaldo, Fabinho, Fabíola, Igor, Jaque, Kelmer, Liza, Mário, Mauro, Marina, Natasha, Nicole, Olavo, Pedro Ivo, Pedro Senna, Patrícia, Rafaela, Themis, Valéria, Wal, Will, e aos colegas do LEGAL de Porto Rico; Adrian, Ana Rita, Dannia, Pascal, Silvia e Ximena.

Agradeço as pessoas que contribuíram diretamente com este trabalho por meio das coletas, são elas: membros do Projeto Pirada, Jaqueline e a Kyara; membros do Projeto Arapaima/FAPEAM-Temático; aos professores Fabio Foresti, Fausto Foresti, José Senhorini e Jorge Porto; ao Éderson, Fandinho, Cândido e Mano Velho, Arco Verde, Vera e Marcelo Crossa.

Agradeço aos membros do Programa de Pós-graduação em Genética, Conservação e Biologia Evolutiva (PPG-GCBEv/INPA) e à Universidade de Federal

do Amazonas (UFAM). Agradeço aos pesquisadores e docentes dessas instituições, pelos conhecimentos adicionados durante essa jornada.

Agradeço à atual coordenadora do PPG-GCBEv Doutora Vera Scarpassa, às professoras conselheiras Doutora Eliana Feldberg, Doutora Maristerra Lemes e a Doutora Izeni Farias.

Agradeço ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) e a FAPEAM (Fundação de Amparo à Pesquisa no Estado do Amazonas) pelo financiamento deste trabalho e pela bolsa de estudos concedida.

Muito Obrigado a Todos!

Resumo

O pirarucu (*Arapaima gigas)* é um dos maiores peixes de água doce do mundo, podendo crescer até 3 metros de comprimento e pesar até 200 quilos. É um peixe de grande importância econômica usado como fonte de alimento pela população tradicional na bacia Amazônica. É marcado por uma longa história de exploração comercial, o que reduziu a variabilidade genética de muitos grupos de indivíduos desta espécie. O presente trabalho reporta um estudo de genética de populações para o *Arapaima gigas* objetivando estimar níveis de variabilidade genética de espécimes coletados em 20 localidades ao longo da bacia Amazônica e Tocantins/Araguaia, investigar se há existência de estrutura genética e verificar se houve redução populacional. Para isso foram utilizados 11 marcadores microssatélites que devido ao seu elevado polimorfismo atendem às necessidades deste estudo. A heterozigosidade média observada sobre todos os locos para cada localidade amostrada variou de 0,32 para os espécimes coletados no rio Araguaia a 0,70 para para os espécimes coletados em Mamirauá. Considerando apenas localidades da calha principal do rio Amazonas, a heterozigosidade observada foi de 0,45 em Iquitos a 0,70 em Mamirauá. Enquanto que para os tributários da bacia Amazônica amostrados foi verificado 0,32 no rio Araguaia a 0,62, no rio Tapajós. Os resultados da análise de ANOVA, utilizada para testar se há diferenças significativas na distribuição da heterozigosidade observada em relação às localidades amostradas e em relação às amostras coletadas na calha e nos principais tributários da bacia Amazônica, mostraram um padrão heterogêneo na distribuição da variabilidade genética para a referida espécie, sendo que altos e baixos valores são distribuídos de maneira não uniforme entre as localidades amostradas para o presente estudo e foi encontrado um maior valor de variabilidade genética para as amostras coletadas na calha do que nos tributários amostrados. O fato de haver maior variabilidade genética nos indivíduos coletados na calha pode ser devido ao fato de a calha funcionar como um ponto de encontro de *Arapaimas* de várias localidades, com deslocamento favorecido pelas transgressões e introgressões das águas de várzea. Os resultados de AMOVA demonstram que os grupos analisados no presente estudo encontram-se moderadamente estruturados. Resultado condizente com os hábitos de baixa migração da referida espécie. Os resultados da análise Bayesiana mostram que há estrutura populacional na forma de gradiente ao longo da bacia amazônica, esses resultados também mostram que os rios tributários não comportam populações geneticamente diferenciadas em relação à calha principal. A estruturação genética encontrada para a espécie *Arapaima gigas* nos permite dividir a bacia Amazônica em três macroregiões que devem ser manejadas de maneira diferenciada devido às suas particularidades genéticas, essas regiões são Amazônia ocidental compreendendo as localidades Iquitos, Letícia, Eirunepé, Mamirauá, Tapauá, Lábrea, Manuel Urbano e Borba; Amazônia central compreendendo as localidades Carauarí, Coarí, RDS Piagaçu-Purus, Manacapuru, Careiro da Várzea, Nhamundá, Santarém (Ilha de São Miguel) e Jacaréacanga; e Amazônia oriental e bacia do Araguaia / Tocantins compreendendo as localidades de Macapá, Mexiana, Marabá e Ilha do Bananal (rio Araguaia). O teste de auto-correlação espacial mostrou que entre toda a amostragem deste estudo há fluxo gênico para a espécie *Arapaima gigas*. Foi observada redução populacional recente significativa através do teste de M*value* para 11 das 20 localidades amostradas, sendo que reduções mais drásticas foram observadas para as amostras da Ilha de Mexiana na foz do rio Amazonas e Ilha do Bananal, no rio Araguaia. Esses resultados devem ser vistos como um aviso importante sobre a fragilidade genética dos grupos de *Arapaima gigas* dessas localidades. Desta forma, com base nos dados apresentados, é fortemente aconselhável que sejam implementados programas de manejo e conservação desta espécie de maneira diferenciada nas três macroregiões da bacia Amazônica, levando em conta as particularidades genéticas da espécie em cada região.

Abstract

The pirarucu (*Arapaima gigas*) is one of the largest freshwater fishes of the world; it can grow to up to 3 meters, and weight up to 200 kg. It is an economically important fish used as a traditional food source in the Amazon basin. It has suffered a long history of commercial exploitation, which has resulted in various populations with critically low levels of genetic variability. The current work is a population genetic study of this specie with the goal of estimating levels of genetic variability for the principal tributaries of the Amazon River, comparing them to those observed in the main channel of the Amazon River, analyzing if there has been a reduction of genetic diversity in the analyzed localities, and if *Arapaima gigas* is a genetically structured species. With this goal in mind, 11 microsatellite markers were used due to their high levels of polymorphism and those are sufficiently informative for this type of a study. Average heterozygosity calculated across all loci for each sampling locality varied from 0.32 in Araguaia River to 0.70 in Mamirauá. Considering only localities from the main channel of the Amazon River, observed heterozygosity was 0.45 in Iquitos and 0.70 in Mamirauá. Observed heterozygosities in the tributaries of the Amazon River ranged from 0.32 in the Araguaia River to 0.62 in the Tapajós River. The ANOVA results showed a heterogeneous pattern in the distribution of genetic diversity in *Arapaima gigas* among all sampled localities, and between localities from the main stream of the Amazon River and its tributaries. On average, however, higher average heterozygosities were observed in the main stream Amazon River compared with tributaries. This pattern could be explained by the main stream Amazon River may be a zone of contact for *Arapaima* from different regions which could be facilitated by the ebb and flow of várzea waters. AMOVA demonstrated that 76.46% of genetic variance is explained by within individual contrasts, while 20.28% is explained by among locality contrasts. The among locality contrast is consistent with low migration rates of this species. A Bayesian analysis shows that there is population structuring in the form of a gradient along the length of the Amazon basin; this analysis also shows that tributaries do not contain genetically differentiated populations with respect to the main stream of the Amazon River. The observed genetic structuring of *Arapaima gigas* allows us to divide the Amazon basin in three macro-regions that should be differentially managed due to their genetic particularities; these regions are western Amazon comprising the localities of Iquitos, Letícia, Eirunepé, Mamirauá, Tapauá, Lábrea, Manuel Urbano e Borba; central Amazon comprising the localities of Carauarí, Coarí, RDS Piagaçu-Purus, Manacapuru, Careiro da Várzea, Nhamundá, Santarém (São Miguel Island) and Jacaréacanga; and eastern Amazon and the Araguaia/Tocanins basin comprising the localities of Macapá, Mexiana, Marabá and Bananal Island (Araguaia River). However, the spatial autocorrelation analysis shows that across the length of its distribution, this species is connected by gene flow. We observed a signature of recent population reduction using the M value test in 11 localities of the 20 localities sampled for this study. The most drastic reductions were observed for samples collected in Mexiana Island and in the Araguaia River (Bananal Island). These results should be viewed as an important signal of genetic fragility of *Arapaima gigas* individuals from these localities. Based on the presented data, it is strongly recommended that one implements a differentiated management and conservation strategy for this species for the three macro-geographic regions of the Amazon basin identified through the genetic particularities of *Arapaima gigas* in each of these three regions.

Sumário

FICHA CATALOGRÁFICA.....I

SINOPSE.....I

DEDICATÓRIA..... II

AGRADECIMENTOS.....III

RESUMO.....V

ABSTRACT.....VI

LISTA DE FIGURAS.....IX

LISTA DE TABELAS.....X

1. Introdução 01

1.1 Considerações gerais 01

1.2 Biologia da espécie *Arapaima gigas* 03

1.3 Pirarucu, um peixe Amazônico, um breve histórico de exploração 05

1.4 Marcadores moleculares para estudos de conservação 08

2. Hipóteses 10

3. Objetivos 11

3.1 Objetivo geral 11

3.2 Objetivos específicos 11

4. Material e Métodos 12

4.1 Amostragem 12

4.2 Extração de DNA 16

4.3 Visualização do DNA extraído em gel de agarose 17

4.4 Amplificação *in vitro* do DNA via PCR e genotipagem 17

4.5 Coleta de dados 21

4.6 Análises populacionais 22

4.6.1 Análise de variabilidade genética e equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) 22

4.6.2 Análise de efeito de redução populacional 23

4.6.3 Análise de conectividade genética 24

4.6.4 Análise de estruturação genética 25

5. Resultados 28

5.1 Dados gerados 28

5.2 Diversidade genética e equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) 28

5.3 Análise de efeito de redução populacional 37

5.4 Distribuição da variabilidade genética e diferenciação populacional 40

5.5 Correlação entre distância genética e distância Geográfica 45

5.5.1 Análise de Autocorrelação 45

6. Discussão 47

6.1 Diversidade genética da espécie *Arapaima gigas* 47

6.2 Redução populacional na espécie *Arapaima gigas* 51

6.3 Estrutura populacional da espécie *Arapaima gigas* 53

6.3.1 Isolamento por distância na espécie *Arapaima gigas*.....57

7. Conclusão 59

8. Referências Bibliográficas 60

Lista de Figuras

Figura 1. O pirarucu, *Arapaima gigas,* Schinz (1822).....04

Figura 2. Mapa das localidades amostradas.....14

Figura 3. Representação dos alelos vistas no *Fragment Profiler* 21

Figura 4. Distribuição das freqüências de heterozigosidade em amostras de *Arapaima gigas* para todas as localidades analisadas.....31

Figura 5. Distribuição das freqüências de heterozigosidade das amostras de *Arapaima gigas* da calha (Calha), e amostras dos rios tributários (Tributários). 31

Figura 6. Distribuição das freqüências de heterozigosidade para todas as amostras de *Arapaima gigas* analisadas (Todas, na cor preta), amostras da calha (Calha, na cor azul), e amostras dos rios tributários (Tributários, na cor verde).....32

Figura 7a. Gráfico correlacionando os valores de K e Δ*K*.....41

Figura 7b. Estrutura populacional com base em 11 locos de microssatélites de *Arapaima gigas* estimada pelo programa *Structure*. Cada indivíduo é representado por uma linha vertical. Cada cor indica um *cluster* baseados em semelhanças genotípicas.....41

Figura 8. Distribuição dos três grupos de *Arapaima gigas* de acordo com o resultado da aplicação programa *Structure*.....44

Figura 9. Gráfico de auto-correlação espacial entre distância genética (F_{ST}) e distância geográfica (Km).....46

Lista de Tabelas

Tabela 1. Lista de pontos de coletas das amostras de pirarucu analisadas neste estudo.....15

Tabela 2. Principais características dos *primers* dos locos de microssatélites desenvolvidos por Farias *et al.* (2003) para a espécie *Arapaima gigas*, utilizados neste estudo.....20

Tabela 3. Combinações do pares de *primers* para PCR e seqüenciamento tipo *multiplex*.....20

Tabela 4. Características dos 11 locos microssatélites analisados para *Arapaima gigas* considerando todos os indivíduos amostrados**.** Número total de alelos (N), Heterozigosidade Observada (H_o) e Heterozigosidade Esperada (H_e), por loco para todas as amostras de *Arapaima gigas*.....32

Tabela 5. Heterozigosidade Observada e Esperada por loco por população analisada de *Arapaima gigas.* Na: Número de alelos; H_O: Heterozigosidade Observada; H_E: Heterozigosidade Esperada; Locos Monomórficos (mono); * indica valor de P significativo após a correção de Bonferroni (P<0,000237).....33, 34 e 35

Tabela 6. Índice de diversidade genética, média do número de alelos e média do Equilibrio de Hardy – Weinberg total considerando os 11 locos analisados neste estudo por grupos de *Arapaima gigas* de cada localidade. Número Amostral (N); Diversidade Genética; Média do Número de Alelos; Média do Equilibrio de Hardy - Weinberg (Média HWE), Heterozigosidade Observada (Ho) e Heterozigosidade Esperada (He); Locos que foram Monomórficos.....36

Tabela 7. Valores de M obtidos através do programa M*value*, sendo θ (calculado a partir do banco de dados atual) = **1,61**. **a)** Valores de M calculados para grupos de espécimes de cada localidade. **b)** Valores de M calculados para grupos de espécimes considerando-se os agrupamentos obtidos pela análise Bayesiana no programa *Structure* e os valores médios de Q nas localidades analisadas (ver tópico 5.4).....39

Tabela 8. Análise de Variância Molecular, aplicando-se o FST de Wright (1969), para os espécimes de *Arapaiama*. Soma dos quadrados (Ss); Porcentagem de variação (%); Valor de P significativo (*****).....40

Tabela 9. Resultado do programa *Structure* para K=2 *clusters*, com os valores de atribuição (Q) dos espécimes de cada localidade para cada um dos dois *clusters* (Cluster 1, verde e Cluster 2, vermelho).....42

1. Introdução

1.1 Considerações gerais

A bacia Amazônica é um dos ecossistemas biológicos com maior diversidade do mundo, abrangendo cerca de um terço da América do Sul. Ocupa mais de 6,8 milhões de quilômetros e estende-se por nove países (Brasil, Peru, Bolívia, Colômbia, Equador, Venezuela, Suriname e nas duas Guianas). De toda essa área de drenagem, 63% estão em território brasileiro. Situa-se nos trópicos entre 5º N e 17º S e sua descarga anual (175.000m3/seg.) equivale a quase 20% de toda a água doce que deságua no oceano em todo o planeta. O principal rio dessa bacia, o rio Amazonas, encontra-se dividido em quatro porções principais: começando na nascente que se localiza no Peru e lá é chamado de rio Ucayali, seguido pelo baixo Amazonas, que atravessa o Peru e a Colômbia, e a partir do território brasileiro, no estado do Amazonas, é chamado de Solimões até a confluência com o rio Negro, onde é chamado novamente de rio Amazonas (Goulding *et al.*, 2003).

O rio Amazonas é o único no mundo que apresenta três tributários maiores que 3.000 Km (rio Purus, rio Juruá e rio Madeira). O rio Madeira com 3.352 Km é o maior deles. A bacia do Tocantins é formada por dois rios principais, o Tocantins e o Araguaia, mais seus tributários. A bacia do Tocantins pode ser considerada como um tributário a parte da bacia

Amazônica, pelo fato de estar conectada à calha principal (rio Amazonas) pela baía de Marajó e possuir fauna e flora relacionadas (Goulding *et al*., 2003).

Os extensos sistemas de rios da bacia Amazônica apresentam uma das mais diversas faunas de peixes do mundo (Stiassny, 1999). Lundberg *et al.* (2000) estimaram que, apenas aproximadamente 40% dessa fauna de peixes de água doce da bacia Amazônica seja conhecida, sendo que, espécies novas estão sendo descritas constantemente.

Em parte, devido ao enorme tamanho e expressiva biodiversidade, a Amazônia, e em particular a sua diversidade de peixes, sofre com o mito de superabundância (Goulding *et al.,* 1988; Goulding *et al.,* 2000). Esse simples mito declara que os recursos naturais da Amazônia são abundantes e inesgotáveis. As baixas densidades ocupacionais na Amazônia tendem a suportar essa falácia, uma vez que a abundância de recursos naturais de uma região é diretamente relacionada à densidade humana e a intensidade de exploração (Goulding *et al.,* 2000). O mito de superabundância tem sido promulgado de várias formas desde a colonização da bacia amazônica pelos portugueses (Prang, 2001a; Prang, 2001b), difundindo-se particularmente durante o período áureo da borracha com milhares de funcionários desta indústria vivendo na região. Esse mito favorecia particularmente os barões da borracha que o usavam para atrair trabalhadores empobrecidos de outras partes do Brasil, e ao mesmo tempo para desassociá-los de qualquer obrigação social e responsabilidades para com seus trabalhadores (Prang, 2001a).

Existem casos bem documentados de reduções populacionais drásticas de espécies que são vistas como infinitas ou com grande capacidade de exploração na Amazônia. Entre essas espécies estão incluídas: o jacaré-açú (*Melanosuchus niger*) e o jacaré-tinga (*Caiman crocodilus*) (Smith, 1980; Medem, 1983; Best, 1984), o peixe boi amazônico (*Trichechus inunguis*) (Smith, 1980; Best, 1984), muitas espécies de tartarugas (*Podocnemis* spp.) (Best, 1984) e, provavelmente, o maior peixe de água doce da América do Sul, o pirarucu (*Arapaima gigas*) (Goulding, 1980), sobre o qual a presente proposta está focada.

1.2 Biologia da espécie *Arapaima gigas*

O *Arapaima* é um dos maiores peixes de água doce da América do Sul. Ele pode chegar a medir três metros de comprimento e a pesar mais de 200 kg (Saint-Paul, 1986; Nelson, 1994) (Figura 1). Ele é essencialmente piscívoro (Fontenele, 1948; Menezes, 1951; Pinese & Peret, 2001) e o hábito alimentar desta espécie faz com que esta tenha um importante papel ecológico, além do econômico, já que espécies predadoras participam do equilíbrio ambiental como reguladoras das populações de outras espécies.

Com respiração do tipo aérea obrigatória, o pirarucu vai regularmente à superfície para renovar o ar de sua bexiga natatória, bastante vascularizada, onde se dá a troca gasosa (Val & Almeida Val, 1995). Entretanto, esta adaptação que lhe dá vantagens para viver em ambientes pobres em oxigênio,

o torna vulnerável aos pescadores que o esperam vir à superfície para arpoá-lo (Veríssimo, 1895).

Figura 1 - O pirarucu, *Arapaima gigas*, em ambiente natural. Foto de Luiz Claúdio Margarido.

A maturação sexual ocorre do terceiro ao quinto ano de vida, quando atinge em média 1,6 metros de comprimento e cerca de 40 a 50 Kg de peso. Fontenele (1953) sugere que durante a época da desova notam-se características sexuais secundárias extragenitais nos reprodutores, o macho passa a apresentar uma coloração escura na parte superior da cabeça e dos flancos, o ventre e a parte caudal apresentam uma coloração avermelhada. Baca (2001), entretanto, notou que essas características nem sempre são observadas em todos os espécimes.

A desova é realizada de maneira parcelada e apresenta baixa fecundidade, compensada pelos cuidados dispensados à prole que objetiva evitar a predação da ninhada por outros peixes (Fontenele, 1948). Os ovos

são depositados em ninhos e os machos são os responsáveis pela proteção dos filhotes.

Em relação ao tipo de migração, o pirarucu é caracterizado como sendo sedentário, significando que ele não realiza longas migrações (Isaac *et al*., 1993). Queiroz (2000) relata que os pirarucus habitam lagos durante a estação seca, onde os adultos desenvolvem as gônadas, realizam a corte, constroem ninhos e cruzam. Durante o período de cheia, a água previamente concentrada nos rios, lagos e canais, transborda, formando áreas alagadas, o ambiente favorito desta espécie. O pirarucu aparentemente migra para as florestas de várzea onde os machos exercem cuidado parental. Durante o inicial e rápido declínio das águas, o cuidado parental cessa e o pirarucu migra de volta ao rio, canal ou lagos (onde geralmente são pescados). E o ciclo então se repete.

1.3 Pirarucu, um peixe Amazônico, um breve histórico de exploração

Tradicionalmente o pirarucu faz parte da dieta dos ribeirinhos Amazônicos, sendo que no início do século 18 começou o comércio pesqueiro para esta espécie. Desde então, a manta (produto formado da carne de pirarucu salgada e desidratada) é exportada para os principais centros de venda em Manaus, Santarém e Belém, no Brasil, como um substituto local para o bacalhau (*Gadus morhua*) normalmente utilizado para o preparo de um prato típico de mesmo nome (Veríssimo, 1895; Kurlansky, 1998).

Com base nos estudos de Veríssimo (1895), Menezes (1951) e Crossa & Petrere Júnior (1999), Hrbek *et al.* (2005) relataram a importância comercial do pirarucu, estimando que cerca de 150.000 *espécimes* por ano foram comercializados na bacia Amazônica desde o início do século 18.

Devido à pesada pressão de pesca, decorrente de sua importância comercial, o pirarucu tem se tornado gradativamente escasso a partir da década de 1960. Na década de 1980 ele tornou-se comercialmente extinto próximo às grandes cidades da Amazônia (Goulding, 1980). Em algumas áreas ele parece ter sido extinto completamente (Goulding, 1979).

Em 1975 o *Arapaima gigas* foi listado no apêndice II da CITES (Convenção sobre o Comércio Internacional de Espécies da Flora e Fauna Selvagens em Perigo de Extinção), o qual define uma espécie que não está necessariamente ameaçada de perigo de extinção, mas em uma situação na qual o seu uso comercial deve ser controlado para evitar uma utilização incompatível com a sobrevivência da espécie. Entretanto, na *Red List* da IUCN (União Internacional para a Conservação da Natureza) ainda é classificado na categoria de *Data deficient*, ou seja, uma espécie que não possui dados biológicos suficientes para enquadrá-lo em umas das categorias existentes. A proteção formal e a regulação da pesca pelo IBAMA (Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis), agência Brasileira protetora do meio ambiente, estimulou esforços para aqüicultura na década de 1990. No início do ano de 2001 o governo brasileiro proibiu a pesca do pirarucu, exceto na Reserva de Desenvolvimento Sustentável de Mamirauá

(RDS Mamirauá). A RDS Mamirauá está localizada na confluência dos rios Solimões e Japurá, e é uma das histórias de sucesso de manejo participativo de recursos naturais coordenados por habitantes locais e membros da comunidade científica. Nos lagos onde vivem, os espécimes são monitorados e a pesca ocorre em bases rotacionais, prevenindo assim a sobrexploração local (Queiroz & Crampton, 1999; Castello, 2004). O maior benefício deste sistema é a regulação do preço que resultou no aumento da renda local para uma menor quantidade de peixe pescado. Esse sistema gera um benefício que comprovadamente não provocou alteração genética nos espécimes dessa região (Silva *et al*,. 2008). Devido ao sucesso desse sistema participativo, a estratégia de manejo tem sido aprovada em outras partes da bacia Amazônica, incluindo as comunidades de Fonte Boa (Amazonas) e ilha de São Miguel (Pará). Dados de censo e dados demográficos de 1970 e 1980 indicam que a espécie *Arapaima gigas* sofreu um profundo declínio nos 30 anos anteriores a estes trabalhos (Goulding, 1979, 1980). Isto corresponde a aproximadamente 5 a 6 gerações. Mas a pressão da pesca comercial que começou no século 18 e que continuou na primeira metade do século 20 pode também ter propiciado um declínio populacional em longo prazo.

Hrbek *et al*. (2005) utilizando seqüências de DNA mitocondrial de 120 indivíduos realizaram um estudo pioneiro de genética de populações para a espécie *Arapaima gigas* em seis localidades da calha principal da bacia Amazônica e mais o rio Tocantins. Os autores observaram uma maior diversidade haplotípica nas áreas distantes dos grandes centros urbanos da

Amazônia. E maior diversidade haplotípica indica maior variabilidade genética. Tais resultados também sugeriram que a espécie poderia ter sofrido uma redução do tamanho efetivo populacional, o que foi confirmado mais recentemente, com marcadores microssatélites, analisados por Hrbek *et al.* (em revisão), onde observou-se o efeito de exploração que a espécie sofreu por mais de dois séculos por meio da observação de redução populacional e heterogeneidade nos níveis de variabilidade genética nos espécimes das localidades analisadas. Esse efeito de sobrexploração afetou principalmente as áreas próximas aos grandes centros urbanos onde se concentram os centros de venda e distribuição da carne de pirarucu. Com os dados de microssatélites no estudo de Hrbek *et al.* (em revisão) foi observada uma forte estrutura do tipo de isolamento por distância, sugerindo um gradiente na distribuição da variabilidade genética das populações da área amostrada no estudo em questão que corresponde ao longo da calha do rio Amazonas.

1.4 Marcadores microssatélites

De acordo com Allcock *et al*. (1995) a variabilidade genética é uma variação de natureza herdável que se perpetua em gerações subseqüentes. A variabilidade genética pode ser detectada por meio do uso de diversos tipos de marcadores moleculares, cada tipo com características e aplicações específicas.

O uso de marcadores moleculares em estudos genético-populacionais e filogeográficos são importantes no auxílio da implementação de programas para a conservação das espécies, sendo o objetivo central da genética da conservação o estudo da variabilidade genética nas populações naturais das espécies sob impacto antropogênico (Frankham *et al.*, 2002).

O uso de *primers* flanqueadores de regiões repetitivas (microssatélites) é a técnica atualmente mais difundida na análise de polimorfismos devido a diversas vantagens, como alto grau de polimorfismo. Os microssatélites são seqüências no DNA que possuem de um a seis nucleotídeos de comprimento repetidos consecutivamente, raramente excedem 200 pares de base no comprimento total, estão distribuídos ao acaso no genoma, possuem expressão co-dominante, são multialélicos, são encontrados com alta freqüência nos genomas de eucariotos, apresentando o maior conteúdo informativo por loco gênico entre todas as classes de marcadores moleculares disponíveis (Goldstein & Schlötterer, 1999). A taxa de mutação é muito mais freqüente em regiões de DNA repetitivo que em outras regiões, isso explica o fato dos microssatélites serem tão polimórficos. Sendo assim, os microssatélites são marcadores excelentes para detecção de estrutura populacional (Avise, 2004), níveis de variabilidade genética e eventos de redução do tamanho efetivo populacional (Frankham *et al*, 2002).

2. Hipóteses

No presente trabalho, foram testadas as seguintes hipóteses:

- H0= Os níveis de variabilidade genética da espécie *Arapaima gigas* amostradas em rios da calha principal e dos principais Tributários da bacia Amazônica são iguais;
- H1= Os níveis de variabilidade genética da espécie *Arapaima gigas* amostrada em rios da calha principal e dos principais Tributários da bacia Amazônica não são iguais.

- H0= Os espécimes de *Arapaima gigas* provenientes das localidades amostradas não apresentaram evidências de redução do tamanho populacional (efeito gargalo-de-garrafa);
- H1= Os espécimes de *Arapaima gigas* provenientes das localidades amostradas apresentam evidências de redução do tamanho populacional.

- H0= Não existem diferenças genéticas entre grupos de indivíduos de *Arapaima gigas* dos principais tributários da bacia Amazônica comparados com os grupos de indivíduos da calha principal;
- H1= Existem diferenças genéticas entre grupos de indivíduos de *Arapaima gigas* dos principais tributários da bacia Amazônica comparados com os grupos de indivíduos da calha principal.

3. Objetivos

3.1 Objetivo Geral

Este estudo teve como objetivo analisar a variabilidade genética de grupos de indivíduos de *Arapaima gigas* usando 11 marcadores moleculares genéticos do tipo microssatélites para esclarecer os fatos sobre a dinâmica populacional na calha principal e nos principais tributários da bacia Amazônica e assim subsidiar futuros programas de manejo e conservação.

3.1 Objetivos Específicos

- Comparar os níveis de variabilidade genética entre os grupos de piararucu amostrados nos rios da calha e dos principais rios tributários da bacia Amazônica.

- Verificar se ocorre presença do efeito gargalo de garrafa nos agrupamentos de indivíduos de *Arapaima gigas*.

- Inferir se os rios tributários comportam populações de pirarucu geneticamente diferenciadas se comparadas aos espécimes coletados nos rios da calha.

4. Material e Métodos

4.1 Amostragem

Foram analisados 436 indivíduos de 18 localidades da bacia Amazônica e 2 localidades da bacia Araguaia / Tocantins. Esse número é resultado da combinação do banco de dados do presente estudo com o banco de dados do estudo de Hrbek *et al.* (em revisão). Para este estudo foram coletadas 247 amostras em 13 localidades. De cada localidade foram coletados em média 19 indivíduos. As coletas foram realizadas por colaboradores. Estes, ou estavam associados às comunidades pesqueiras das respectivas localidades ou coletaram amostras de *Arapaima gigas* para este estudo juntamente com amostras de outras espécies. Todos os espécimes coletados para este estudo foram sacrificados com exceção dos espécimes coletados na bacia do Araguaia / Tocantins, destes foi coletado uma alíquota de sangue de cada individuo. As amostras desta localidade foram coletadas por um grupo de pesquisadores em expedição.

Para este estudo foram amostradas as seguintes localidades: Médio Rio Juruá (N=18) com o ponto de coleta em Carauarí – AM; Alto Rio Juruá (N=13) com o ponto de coleta em Eirunepé – AM; Médio rio Solimões (N=9), com ponto de coleta em Coarí – AM; Rio Purus com pontos de coleta na Reserva de Desenvolvimento Sustentável Piagaçu - Purus (N=20) em Aiapuá - AM, na cidade de Tapauá – AM (N=20), na cidade de Lábrea - AM (N=15) e

em Manuel Urbano – AM (N=18); rio Amazonas com ponto de coleta em Manacapuru – AM (N=30); Rio Madeira (N=30) com o ponto de coleta na cidade de Borba - AM; Baixo Nhamundá (N=7) com o ponto de coleta na cidade Nhamundá - AM; Rio Tapajós (N=15) com o ponto de coleta em Jacareacanga – PA; Foz do Rio Amazonas na Ilha de Mexiana - PA (N=17) a noroeste da ilha de Marajó; e Rio Araguaia (N=35) com indivíduos coletados em seis lagoas que perfazem a ilha do Bananal. As amostras de tecidos coletados foram preservadas em álcool 95% e as mesmas estão depositadas na Coleção de Tecidos de Genética Animal – CTGA do Laboratório de Evolução e Genética Animal (ICB / UFAM).

Os dados obtidos destas amostras foram combinados e comparados ao banco de dados genético já analisado por Hrbek *et al.* (em revisão) para as seguintes localidades: Iquitos - Peru (N=16); Letícia – Colômbia (N=22); Confluência dos Rios Japurá e Solimões na Reserva de Desenvolvimento Sustentável de Mamirauá em Tefé – AM (N=32); Careiro da Várzea (N=21) com amostras coletadas em Careiro da várzea – AM; Ilha de São Miguel em Santarém - PA (N=31); Macapá – AP, entorno do Rio Macapá (N=30); e Marabá - TO com o ponto de coleta no rio Tocantins (N=37). Pode ser observado na Figura 2 o mapa com a localização das amostras coletadas e detalhes sobre os pontos de coleta podem ser vistos na Tabela 1.

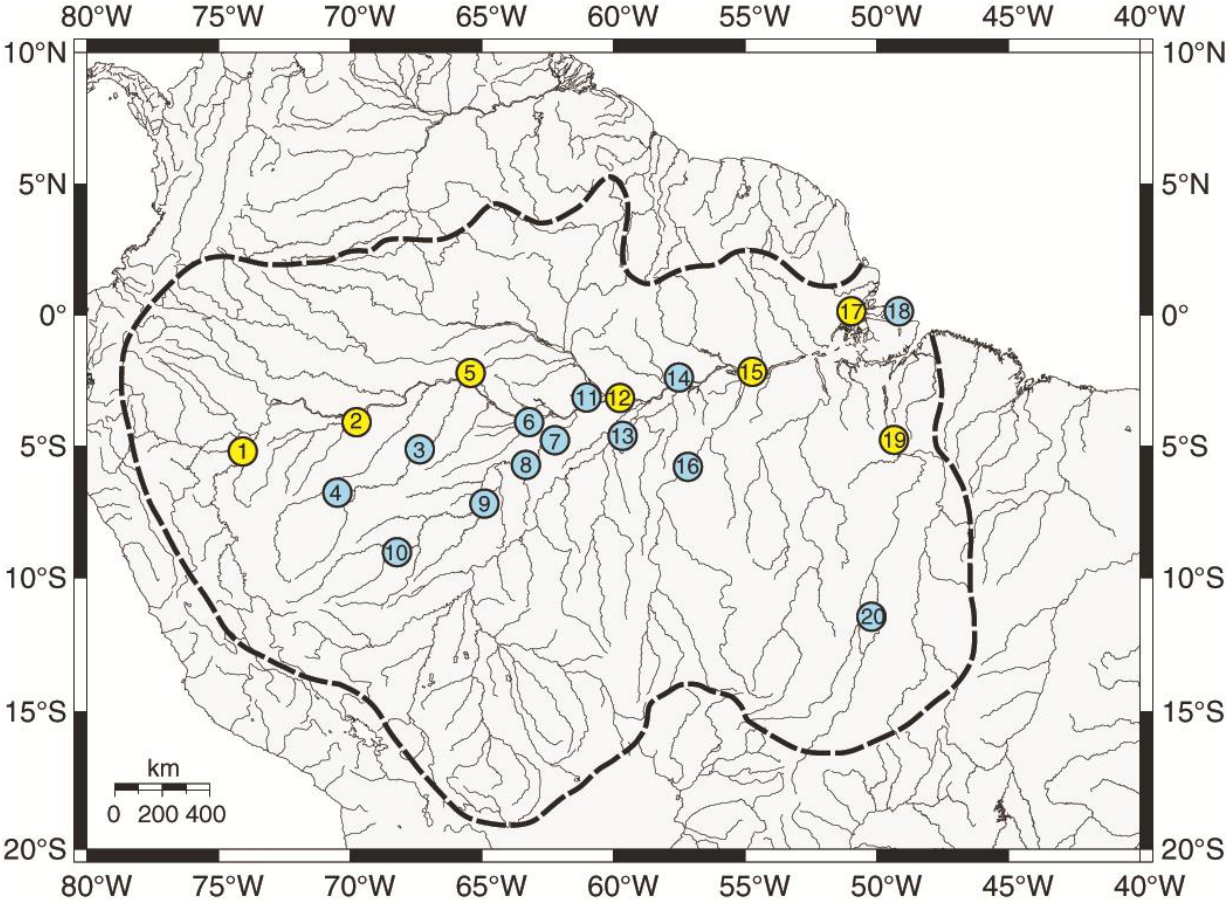


Figura 2 - Mapa da bacia hidrográfica amazônica, destacada pela linha pontilhada, indicando em pontos amarelos as localidades já analisadas por Hrbek *et al.* (em revisão) e em azul localidades amostradas para o presente estudo. Detalhes sobre pontos de coleta ver Tabela - 1.

Por se tratar de uma espécie que tem a pesca controlada pelo IBAMA em determinadas áreas e proibida em outras, as coletas foram realizadas com o aval deste órgão, uma vez que temos licença permanente do mesmo para as coletas (Lic. No. 11325-1).

Tabela 1 - Lista de pontos de coletas das amostras de pirarucu analisadas neste estudo.

Ponto no Mapa	Localidade (código utilizado)	País	Estado	Rio	Número Amostral
1	**Iquitos (IQ)**	Peru	LO	Rio Ucayali	16
2	**Letícia (LE)**	Colômbia	AM	Rio Amazonas	22
3	**Carauarí (CA)**	Brasil	AM	Médio Juruá	18
4	**Eirunepé (EI)**	Brasil	AM	Alto Juruá	13
5	**Mamirauá (MM)**	Brasil	AM	Confluência Rio Solimões/ Juruá	32
6	**Coarí (CO)**	Brasil	AM	Médio Solimões	9
7	**RDS Piagaçu (PI)**	Brasil	AM	Rio Purus	20
8	**Tapauá (TA)**	Brasil	AM	Rio Purus	20
9	**Lábrea (LA)**	Brasil	AM	Rio Purus	15
10	**Manuel Urbano (MU)**	Brasil	AM	Rio Purus	18
11	**Manacapuru (MN)**	Brasil	AM	Rio Amazonas	30
12	**Careiro da Várzea (CV)**	Brasil	AM	Rio Amazonas	21
13	**Borba (BO)**	Brasil	AM	Rio Madeira	30
14	**Nhamundá (NH)**	Brasil	AM	Baixo Nhamundá	7
15	**Santarém (SN)**	Brasil	PA	Rio Amazonas	31
16	**Jacareacanga (JA)**	Brasil	PA	Rio Tapajós	15
17	**Macapá (MP)**	Brasil	AP	Rio Macapá	30
18	**Mexiana (MX)**	Brasil	PA	Foz rio Amazonas	17
19	**Marabá (MR)**	Brasil	PA	Rio Tocantins	37
20	**Ilha do Bananal (IB)**	Brasil	TO	Rio Araguaia	35
Total					436

4.2 Extração de DNA

O procedimento utilizado para a extração do DNA de tecido muscular foi através do método fenol - clorofórmio (Sambrook *et al*, 1989) com algumas modificações.

As amostras de tecido muscular foram cortadas, utilizando-se lâminas descartáveis, em pequenos pedaços de aproximadamente quatro milímetros cúbicos sendo estes fragmentos de tecido, posteriormente colocados em microtubos plásticos descartáveis. Estes fragmentos de tecido muscular foram expostos a uma solução de lise contendo: SDS (5%), NaCl (5M), Tris-KCl (1M), EDTA (0.5M pH8), Proteinase K e RNAse.

Após o processo de lise celular, iniciou-se à etapa de separação dos ácidos nucléicos pela remoção das proteínas e de outros componentes celulares. Através de sucessivas lavagens em fenol, fenol/clorofórmio/álcool isoamílico e clorofórmio hidratado.

O próximo passo consiste na precipitação do DNA utilizando NaCl (3M) e álcool etílico a 70%. Esse processo resulta em um sedimento composto por DNA, sendo este, finalmente, eluído em ddH_2O.

Em alguns casos, o DNA genômico total foi extraído utilizando-se o Kit de extração da *Qiagen DNeasy Blood and Tissue*, seguindo-se o protocolo do fabricante.

4.3 Visualização do DNA extraído em gel de agarose

O DNA extraído eluído em ddH_2O foi visualizado através da técnica de eletroforese em gel de agarose a 0,8%. Misturou-se 2µL do DNA extraído de cada amostra com 2µL de corante Bromofenol para posterior adição desta mistura no gel. O gel foi então submetido a uma corrente elétrica de 80 Volts, na qual os fragmentos de DNA (que são eletronegativos) migram por repulsão do pólo negativo para o pólo positivo da cuba eletroforética. Após aproximadamente 60 minutos de corrida eletroforética, o gel foi corado com brometo de etídio por 15 minutos e em seguida observado em um transluminador de luz UV *Image Master* (*Pharmacia Biotech*). Como parâmetro para comparação de concentração das amostras, foram utilizados 2µL de marcadores de peso molecular conhecido (100, 50 e 30ng/µL). Quando necessário, as amostras foram diluídas, e então mantidas a concentração aproximada de 10-30ng/µL.

4.4 Amplificação *in vitro* do DNA via PCR e genotipagem

A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) é uma técnica que permite a amplificação exponencial de um fragmento gênico de interesse (Mullis & Fallona, 1987). Neste estudo foram amplificados 11 locos de microssatélites selecionados dos 14 pares de *primers* desenvolvidos por Farias *et al.*, (2003), cujas principais características dos 11 selecionados estão na tabela 2. O motivo pelo qual esses pares de *primers* foram selecionados foi pelo fato de estes

serem os mais polimórficos e por não apresentarem desequilíbrio de ligação e alelos nulos (Farias *et al.,* 2003). Para as reações de PCR foram testadas combinações do tipo *multiplex*. As reações de PCR tipo *multiplex* combinam mais de um par de *primers* em uma única reação, o que permite economizar tempo e reagentes. Isso é possível devido ao fato de os *primers* combinados ou possuírem alelos em faixas de tamanho diferentes (respeitando uma diferença média de 50 pares de bases entre os alelos dos diferentes pares de bases) ou estarem marcados por diferentes fluorescências, estes assim serão distinguidos no seqüenciamento das genotipagens. As combinações que foram utilizadas podem ser vistas na tabela 3. As reações de PCR foram realizadas em um termociclador ABI da fabricante *Applied Biosystems*.

Para amplificação *in vitro* de todos os lócus foi utilizado o mesmo conjunto de ciclos e temperaturas, estas foram: 93 ºC por 1 minuto para desnaturação seguido de 35 ciclos, sendo cada ciclo composto por três fases, a primeira com 93 ºC por 30 segundos, a segunda com 58 ºC por 30 segundos para o anelamento dos *primers* e a terceira com 72 ºC por 1 minuto e 30 segundos para extensão, e finalmente têm-se o ciclo de extensão final com 72ºC por 30 minutos. De cada um dos pares de *primers* usados, o *primer forward* estava marcado com fluorescência do tipo FAM ou HEX. Os *primers forward* CTm3, CTm4, CTm5 e CAm20 foram marcados com fluorescência tipo FAM e os *primers forward* CTm8, CAm2, CAm15, CAm13, CAm16, CTm7 e CAm16 foram marcados com fluorescência tipo HEX (Tabelas 2 e 3).

O produto de PCR para cada uma das combinações *multiplex* dos pares de *primers* foi diluído 20X em ddH_2O. Em 3µl de cada produto diluído foram adicionados 7µl de *Tween* (20%) e 2,5µl de ET-400 ROX. O ET-400, padrão de peso molecular conhecido e foi incluído em todas as amostras para posterior cálculo do tamanho das bandas amplificadas. A leitura foi realizada no seqüenciador automático de DNA Megabace 1000 (GE-Healthcare) seguindo o protocolo do fabricante.

Tabela 2 - Principais características dos *primers* dos locos de microssatélites desenvolvidos por Farias *et al.,* (2003) para a espécie *Arapaima gigas*, utilizados neste estudo.

Loco	Tipo de Repetição	Pares de bases (pb)	Região Flanqueadora (pb)	Número de alelos	Heterozigosidade Observada	Heterozigosidade Esperada
CTm3	$(CT)_{15}$	293-299	169	3	0.40	0.46
CTm4	$(CT)_{22}$	275-283	233	3	0.73	0.66
CTm5	$(CT)_{29}$	258-280	200	8	0.67	0.87
CTm7	$(CT)_{29}$	277-299	239	6	0.67	0.71
CTm8	$(CT)_5$at$(CT)_5$at$(CT)_4$ ta$(CA)_{13}(CT)_{13}$	272-274	220	2	0.53	0.42
CAm2	$(CA)_{22}$	295-323	267	7	0.60	0.85
CAm13	$(GTA)_2(CA)_{27}$	300-334	270	6	0.73	0.80
CAm15	$(CA)_{19}$	226-244	186	5	0.67	0.61
CAm16	$(CA)_{19}$	247-273	213	6	0.40	0.50
CAm20	$(CA)_{12}$	263-267	243	3	0.80	0.80
CAm26	$(CA)_{14}$	213-217	189	3	0.53	0.66

Tabela 3 - Combinações do pares de *primers* para PCR e seqüenciamento tipo *multiplex.*

	Combinações dos pares de *primers* (Fluorencência)		
***Mix* 1**	CTm3 (FAM)	CTm8 (HEX)	CAm16 (HEX)
***Mix* 2**	CTm4 (FAM)	CAm2 (HEX)	
***Mix* 3**	CAm15 (HEX)	CTm5 (FAM)	
***Mix* 4**	CAm13 (HEX)	CAm20 (FAM)	
***Mix* 5**	CTm7 (HEX)	CAm26 (HEX)	

4.5 Coleta de dados

Os dados foram obtidos através do seqüenciador automático de DNA MegaBace 1000 (GE-Healthcare) e foram visualizados utilizando-se os programas *Genetic Profiler* e *Fragment Profiler* (GE-Healthcare) (Figura 3) para análise e identificação dos alelos de cada indivíduo para cada um dos 11 locos. Após a leitura e análise das genotipagens foi construída uma matriz com as informações dos genótipos dos indivíduos de *Arapaima gigas* para que fossem feitas as análises estatísticas propostas.

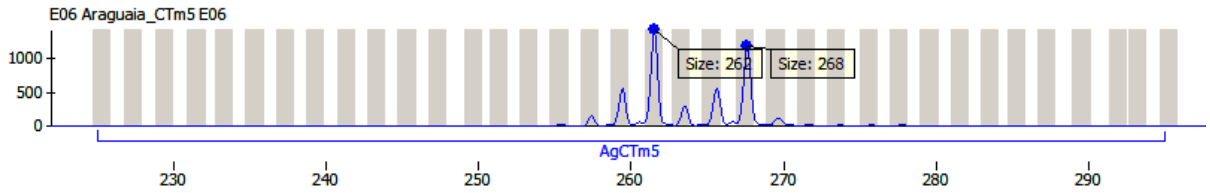


Figura 3 – Análise de uma amostra de *Arapaima gigas* no programa *Fragment Profiler*, mostrando um indivíduo heterozigoto para o loco CTm5.

O banco de dados gerados neste estudo foi primeiramente padronizado e posteriormente agrupado ao banco de dados produzido por Hrbek *et al.* (em revisão). As mesmas cinco amostras da localidade Careiro da Várzea, considerada como entorno Manaus por Hrbek *et al.* (em revisão), foram genotipadas, para os 11 locos, nos diferentes equipamentos utilizados nos dois estudos. Ambos os equipamentos da mesma marca e modelo, Megabace 1000 (GE-Healthcare). Os valores dos alelos foram comparados e foi tirada a diferença dos mesmos. Essa diferença foi aplicada a todo o banco de dados produzido neste estudo.

4.6 Análises populacionais

4.6.1 Análise de variabilidade genética e equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW)

As estimativas de variabilidade genética foram feitas por meio das análises das freqüências e da distribuição dos alelos em cada loco microssatélite utilizando-se o programa ARLEQUIN 3.0 (Excoffier *et al.*, 2005). Por meio deste foram obtidas a heterozigosidade observada e esperada, distribuição no número de alelos e riqueza de alelos para cada localidade. Os grupos de indivíduos das localidades foram testados para o Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW), o qual é uma condição genética ideal caracterizada pela união aleatória de alelos de um loco neutro de uma população infinitamente grande.

A análise de variância de Fisher (ANOVA) visa fundamentalmente verificar se existe uma diferença significativa entre as médias de determinadas categorias e se fatores exercem influência em alguma variável dependente. Neste estudo a análise de variância (ANOVA), em um primeiro teste, foi utilizada para verificar a existência de homogeneidade nos valores de heterozigosidades observadas no banco de dados analisado neste estudo, comparando-se as 20 localidades amostradas. Um segundo teste foi utilizado para verificar a existência de homogeneidade nos valores de heterozigosidades observadas comparando-se os espécimes de pirarucu das localidades amostradas dos rios da calha principal e principais rios tributários da bacia Amazônica. Essas

análises foram realizadas utilizando o programa R versão 2.9.0 (http://www.r-project.org/).

4.6.2 Análise do efeito de redução populacional

Para verificar se houve redução no tamanho efetivo populacional dos grupos de *Arapaima gigas* foram analisados os resultados da correlação do número total de alelos (k) com a variação do tamanho dos alelos (r). Essa relação é expressa por M e é obtida através da equação M=k/r, calculada por meio do programa M*value* (Garza & Williamson, 2001), onde $r=S_{max}-S_{min}+1$ (S_{max} é o tamanho do maior alelo e S_{min} é o tamanho do menor alelo na amostragem). A perda de qualquer alelo contribuirá para a redução em k, enquanto que a perda do maior ou menor alelo contribuirá para a redução de r; desta forma, espera-se que k seja reduzido mais rapidamente do que r em uma população em vias de diminuição no tamanho populacional. Assim, espera-se que a taxa M=k/r seja menor em populações que sofreram recente redução no tamanho populacional. O teste de significância de M para este grupo de dados foi realizado utilizando-se 10000 permutações, e foi simulada sobre o modelo de evolução de microssatélite *Two Phase Model* (TPM) (Di Rienzo *et al*., 1994). Nesse modelo foi assumido que 88% das mutações são obtidas via *Step-wise Mutation Model* (SMM), enquanto que os 12% restantes não são.

Para o cálculo da significância de M é necessária a implementação do valor de Theta (θ), uma medida de diversidade genética, que foi calculada por

meio do programa ARLEQUIN 3.1 (Excoffier *et al.*, 2006) utilizando a equação, $\theta=[1/(1-H)^2]-1$, onde H é a heterozigosidade esperada. Esta estimativa é o índice sumarizado que representa quatro vezes o produto do tamanho efetivo populacional e a taxa mutação considerada (Hartl & Clark, 1997), sendo $\theta=4Ne\mu$.

4.6.3 Análise de conectividade genética

Para investigar a conectividade genética entre os espécimes das localidades amostradas foi realizada uma análise multivariada (Mantel, 1967). Essa análise correlaciona distância genética e distância geográfica. Esta foi realizada, neste estudo, por meio do teste de Mantel (1967) implementada no programa ARLEQUIN 3.1 (Excoffier *et al.*, 2006); o qual verifica significância, por meio de permutações, da correlação entre uma matriz de distância genética e uma matriz de distância geográfica, em km, seguindo o percurso dos rios, através de permutações. Na matriz de distância genética dos agrupamentos de indivíduos foram utilizados os valores de comparação par-a-par de F_{ST}. A distância geográfica entre os pontos de coleta foi estimada por ferramentas disponíveis no programa *Google Earth*, versão 4.2 beta 2008 (Google).

Foi realizada uma análise de autocorrelação espacial, onde a matriz de distância foi transformada em uma matriz de 0 e 1, onde 0 representou as distâncias geográficas entre as localidades que estão dentro do intervalo de classe de distância geográfica estabelecidos (em intervalos de 500 km, por

exemplo), e 1 para representa o oposto. Em seguida as matrizes são então correlacionadas por meio do teste de Mantel. Esse processo é repetido para cada intervalo de classe adotado, que neste estudo foram de 500 km, 1000 km, 1500 km, 2000 km, 2500 km, 3000 km, 3500 km até 5500 km. Matrizes de classes de distâncias geográficas que não apresentam correlação significante com a matriz de distância genética indicam que, na referida distância geográfica o fluxo gênico não representa uma força significativa para ocasionar isolamento por distância. E que nessas distâncias outros processos como a deriva genética são fatores mais importantes para a estrutura dos referidos agrupamentos.

4.6.4 Análise da estruturação genética

As estimativas de subdivisão entre os grupos de indivíduos analisados neste estudo foram realizadas pela Análise de Variância Molecular (AMOVA) (Excoffier *et al*., 1992) aplicando-se o F_{ST} de Wright (1969) que representa a quantidade de diferenciação e fluxo genético entre as populações (Neigel, 2002). Essas análises foram realizadas com 10.000 permutações e foram implementadas pelo programa ARLEQUIN 3.1 (Excoffier *et al.*, 2006).

No presente estudo, optou-se em analisar os dados usando-se o F_{ST} de Wright (estatística com base nas variâncias das freqüências dos alelos) ao invés do R_{ST} de Slatkin (estatística com base nas variâncias do número das repetições) (Slatkin, 1995), uma vez que a variância das diferenciações do R_{ST}

tende a ser muito maior do que a variância do F_{ST} quando menos de 20 locos são analisados (Gaggiotti *et al*., 1999), como é o caso do presente estudo.

Para complementar a análise de genética de populações tradicional, descrita acima foi realizado a análise Bayesiana implementada pelo programa *Structure* (Pritchard *et al.,* 2000). Esse método de análise tem como base o modelo de separação de grupos em agrupamentos (*Clusters*). Esse programa atribui indivíduos a um número K de populações com base na estimativa Bayesiana em conformidade aos equilíbrios esperados de Hardy - Weinberg e ausência de Desequilíbrio de Ligação entre os locos analisados dentro de cada população. Dessa forma são definidos o número e a forma das populações, aos quais pertencem os indivíduos, não sendo necessária informação *a priori* sobre a localidade de origem de cada indivíduo.

Todas as análises foram realizadas utilizando o modelo de mistura (*admixture model*), onde cada amostra pode ter ancestrais de mais de uma população. Nesta análise foi selecionada a opção de freqüências alélicas correlacionadas entre populações (*correlated allele frequencies between populations*). Essa configuração é considerada a melhor, especialmente porque é sensível para identificação de populações sub-estruturadas (Falush *et al.,* 2003). O grau de mistura alfa foi inferido a partir dos dados gerados. Quando alfa é próximo de zero, muitos indivíduos são essencialmente de uma população ou outra, enquanto que quando alfa é maior que 1 (>1) significa que a maioria dos indivíduos encontram-se misturados (Falush *et al.,* 2003). O parâmetro de distribuição das freqüências alélicas (Lambda), foi definido como 1, como

aconselhado pelo manual do referido programa (Pritchard *et al.,* 2003). As análises foram realizadas com valor de corte (*burnin*) de 100.000 permutações e *Markov Chain Monte Carlo* (MCMC) com 1.000.000 permutações.

O número de *clusters* geneticamente homogêneos foi inferido pelo método proposto por Evanno *et al*. (2005). Para isso foram realizadas onze réplicas (*runs*) para cada valor de K entre 1 e 15. Depois os agrupamentos foram definidos através do delta K (ΔK). ΔK é inferido com base na média da primeira ordem de mudança das estimativas "*likelihood*" dividido pelo desvio padrão da segunda ordem de mudanças das estimativas: $\Delta K = m|L''(K)|/s[L(K)]$; onde : $L''(K) = L'(K + 1) - L'(K)$, $L'(K) = L(K) - L(K - 1)$, m é a média e s o desvio padrão.

O ΔK escolhido é aquele que apresenta o maior valor, e a partir deste é escolhido o valor de K. A partir dos resultados encontrados, foi analisada a proporção média de atribuição (Q) das localidades dentro do *cluster* inferido pelo *Structure*. Foi utilizado o valor de Q para estimar a porcentagem pró-média de identidade da população amostrada dentro de um *cluster*, sendo assim possível examinar o quanto as localidades enquadravam-se dentro de um referido c*luster*. Barilani *et al.* (2007) sugere um valor de "aceite" de Q=0,9 e de Q=0,8 (P=0,1 e P=0,2, de ser membro do cluster assumido, respectivamente), onde Q é a estimativa calculada para classificar uma localidade dentro de um *cluster*. Assim, é possível examinar o quanto as localidades analisadas pertencem a um *cluster*.

5. Resultados

5.1 Dados gerados

Para este estudo, um total de 247 indivíduos da espécie *Arapaima gigas* foram genotipados para 11 locos de microssatélites e os dados gerados foram analisados juntamente aos dados obtidos por Hrbek *et al.* (em revisão) de 189 indivíduos genotipados também para os mesmos 11 locos de microssatélites. Obteve-se, portanto, para este estudo, uma amostragem total de 436 espécimes representantes dos rios da calha e dos principais tributários da bacia Amazônica.

5.2 Diversidade genética e Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW)

O número total de alelos encontrados foi de 136, com uma média de 12,4 alelos por loco. O número total de alelos detectados por locos para todas as amostras de pirarucu variou de 5 (locos CTm7 e CTm8) a 27 (loco CAm16) (Tabela 4). Nas Tabelas 4 e 5 podem ser observados os valores de Heterozigosidade Observada (H_o) e Heterozigosidade Esperada (H_e) por loco e por população, respectivamente.

Considerando a amostragem geral apresentada neste estudo, foi verificado que a heterozigosidade observada (H_o) variou de 0,31, nos espécimes coletados no rio tributário Araguaia (IB) a 0,69 nos espécimes coletados no rio da calha principal, em Mamiraúa (MM). Considerando a amostragem apenas das

localidades da calha principal, a heterozigosidade observada foi de 0,44 nos espécimes coletados em Iquitos (IQ) a 0,69 nos espécimes coletados em Mamirauá (MM). Enquanto que para os espécimes coletados nos rios tributários da bacia amazônica foi verificado 0,31 no Araguaia (IB) a 0,63, no Tapajós (JA). Variou de 5 a 27 o número de alelos por loco. Os menores valores de H_o foram observados para as localidades do Araguaia (IB), Manuel Urbano (MU) e Tocantins (MR) respectivamente, apresentados na Tabela 5. Dois locos foram monomórficos para os espécimes coletados na localidade do Araguaia, e um para os espécimes da localidade Macapá.

Com exceção das localidades de Coari, RDS Piagaçu-Purus, Nhamundá, Tapauá, Manacapuru, Careiro da Várzea e Mexiana todas as localidades apresentaram pelo menos um loco em desequilíbrio populacional, após a correção de Bonferroni (P=0,000237) (Tabela 5) (Rice, 1989). Os índices de diversidade genética variaram de 0,206 ± 0,129 (rio Araguaia) a 0,649 ± 0,342 a (rio Juruá/Solimões Mamirauá) (Tabela 6). O índice de diversidade genética é equivalente à heterozigosidade esperada, e é definida como a probabilidade de que dois alelos amostrados aleatoriamente em uma amostragem, não sejam idênticos por descendência (Nei, 1987).

Em um primeiro teste de ANOVA (Figura 4), em que foi testada a homogeneidade entre as médias de heterozigosidade das 20 localidades amostradas (rejeita-se homogeneidade se $P<2,20 \times 10^{-16}$) observou-se um padrão heterogêneo significativo de heterozigosidades entre as localidades amostradas. Pode ser observado na Figura 4 que cada localidade apresenta

uma média diferente de heterozigosidade observada e que o padrão é heterogêneo.

No segundo teste de ANOVA (Figura 5), realizado para testar a diferença dos níveis de heterozigosidade média entre os espécimes coletados nas localidades da calha principal da bacia Amazônica e dos espécimes coletados nos principais tributários (homogeneidade rejeitada se $P<2,96x\ 10^{-5}$), pode ser observado que os espécimes da calha apresentam valor de heterosigosidade média mais alta (53,54 ± 17,26%) enquanto que os tributários apresentaram uma menor média de heterozigosidade de 46,52 ± 18,65%.

Na Figura 6 observa-se o gráfico de distribuição das freqüências de heterozigosidade em relação à probabilidade destas estarem relacionadas aos grupos de espécimes coletados, categorizados em: todos os espécimes de todas as localidades de *Arapaima gigas* analisadas (linha na cor preta); espécimes coletados nos rios da calha principal da bacia Amazônica (linha pontilhada na cor azul); e espécimes coletados nos principais rios tributários da bacia Amazônica (linha na cor verde). Nota-se neste gráfico um claro desvio entre as freqüências dos respectivos grupos, sendo que o grupo de espécimes coletados nos rios da calha principal da bacia Amazônica (linha pontilhada na cor azul) apresenta um valor de freqüência genética diferente do grupo formado pelos espécimes coletados nos principais rios tributários da bacia Amazônica (linha na cor verde). Devido a isso, pode-se dizer que há diferença entre as freqüências de heterozigosidade em relação aos grupos de espécimes coletados

nos rios da calha e os grupos de espécimes coletados nos principais rios tributários da bacia Amazônica.

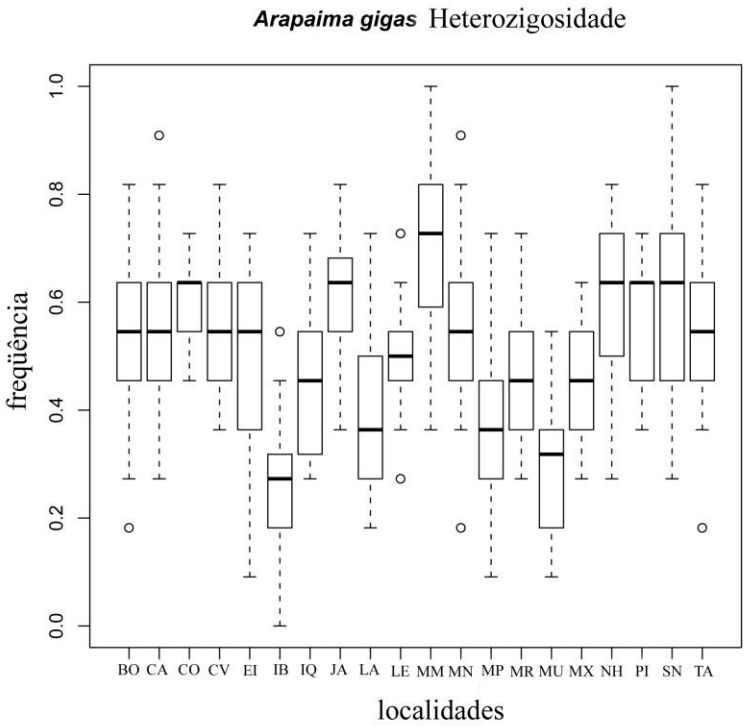


Figura 4 - Distribuição das freqüências de heterozigosidade em amostras de *Arapaima gigas* para todas as localidades analisadas.

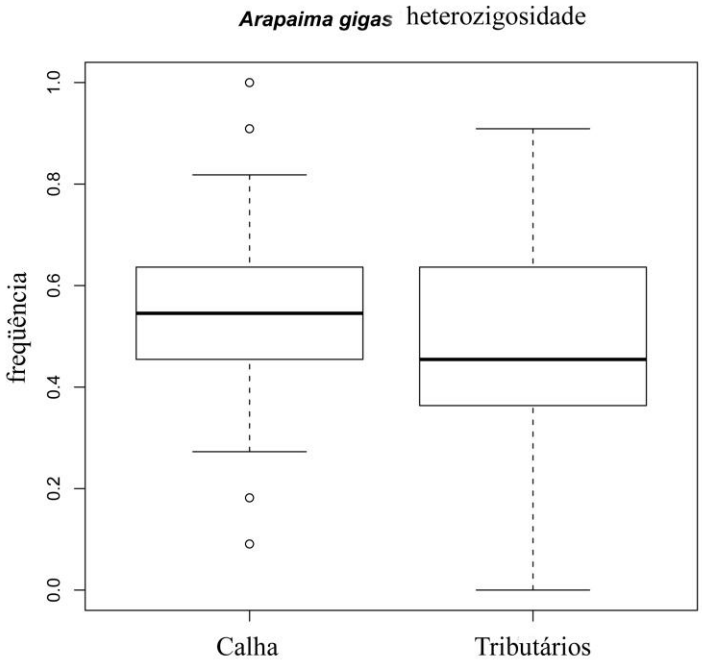


Figura 5 - Distribuição das freqüências de heterozigosidade das amostras de *Arapaima gigas* da calha (Calha), e amostras dos rios tributários (Tributários).

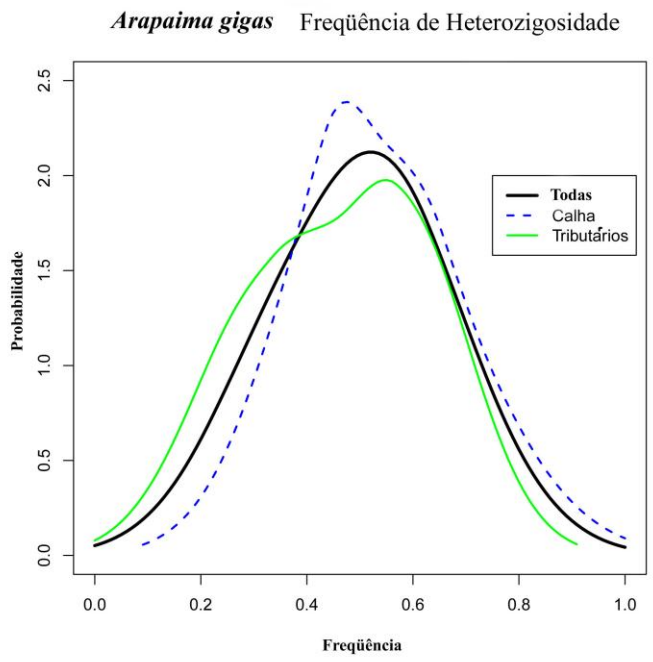


Figura 6 - Distribuição das freqüências de heterozigosidade para todas as amostras de *Arapaima gigas* analisadas (Todas, na cor preta), amostras da calha (Calha, na cor azul), e amostras dos rios tributários (Tributários, na cor verde).

Tabela 4 - Características dos 11 locos microssatélites analisados para *Arapaima gigas* considerando todos os indivíduos analisados neste estudo**.** Número total de alelos (N), Heterozigosidade Observada (H_o) e Heterozigosidade Esperada (H_e), por loco para todas as amostras de *Arapaima gigas*.

Loco	**N**	H_o	H_e
CTm3	18	0.656	0.831
CTm4	14	0.583	0.669
CTm5	9	0.474	0.638
CTm7	5	0.369	0.593
CTm8	5	0.502	0.509
CAm2	6	0.444	0.631
CAm13	19	0.639	0.812
CAm15	6	0.338	0.378
CAm16	27	0.557	0.793
CAm20	9	0.331	0.505
CAm26	18	0.640	0.801
Total	136	0.503	0.651

Tabela 05 - Características dos 11 locos microssatélites analisados para *Arapaima gigas* considerando, separadamente, os grupos de indivíduos por localidade de coleta**.** Na: Número de alelos; H_O: Heterozigosidade Observada; H_E: Heterozigosidade Esperada; Locos Monomórficos (mono); * indica valor de P significativo após a correção de Bonferroni (P<0,000237).

localidades		**CTm3**	**CTm4**	**CTm5**	**CTm7**	**CTm8**	**CAm2**	**CAm13**	**CAm15**	**CAm16**	**CAm20**	**CAm26**	Total
IQ	Na	8	7	4	3	2	5	7	2	12	2	8	60
	H_O	0.50000	0.62500	0.56200	0.25000	0.12500	0.37500	0.62500	0.0625	0.81250	0.37500	0.62500	0.44882
	H_E	0.63500	0.80500	0.52700	0.23200	0.22600	0.77500	0.79700	0.0625	0.86900	0.44300	0.79300	0.56041
	P	0.19178	0.13186	0.55994	1.00000	0.18983	**0.00001***	0.38022	1.00000	0.35807	0.59194	0.18759	
LE	Na	7	4	3	3	2	6	8	3	11	2	9	58
	H_O	0.72727	0.27273	0.68182	0.22727	0.22727	0.45455	0.72727	0.18182	0.86364	0.45455	0.72727	0.50412
	H_E	0.73362	0.44292	0.60782	0.21247	0.20613	0.7241	0.79387	0.1723	0.91226	0.35941	0.84672	0.54650
	P	0.22760	0.01929	0.81189	1.00000	1.00000	**0.000***	0.12957	1.00000	0.01951	0.53797	0.08895	
CA	Na	8	3	4	4	2	3	5	3	6	2	5	45
	H_O	0.94444	0.58824	0.58824	0.33333	0.33333	0.27778	0.625	0.94444	0.55556	0.27778	0.94118	0.58266
	H_E	0.84603	0.67914	0.73440	0.41746	0.35556	0.49365	0.7379	0.56032	0.67619	0.24603	0.74688	0.59031
	P	0.05062	0.14114	0.15459	0.01815	1.00000	0.10029	0.04506	**0.00071***	0.04023	1.00000	0.28113	
EI	Na	5	4	5	2	3	2	7	4	5	2	7	46
	H_O	0.61538	0.46154	0.76923	0.46154	0.46154	0.23077	0.69231	0.53846	0.36364	0.16667	0.53846	0.48178
	H_E	0.79385	0.44308	0.68615	0.36923	0.54154	0.47077	0.76308	0.53231	0.33766	0.28986	0.75692	0.54403
	P	0.20669	0.07018	0.80614	1.00000	0.57465	0.09153	0.19812	1.00000	1.00000	0.25297	**0.00116***	
MM	Na	9	6	4	4	3	5	8	3	16	3	9	70
	H_O	0.78125	0.81250	0.70968	0.56250	0.59375	0.62500	0.90625	0.43750	0.96774	0.3871	0.87500	0.69621
	H_E	0.81448	0.68948	0.69434	0.56647	0.51587	0.62748	0.81944	0.40030	0.88260	0.42306	0.82738	0.66007
	P	0.45599	0.69827	0.98347	0.84625	0.69899	**0.00369***	0.31598	1.00000	0.22599	0.02704	0.28591	
CO	Na	4	4	3	2	3	3	5	2	5	3	5	39
	H_O	0.77778	0.55556	0.44444	0.66667	0.77778	0.55556	0.77778	0.44444	0.44444	0.44444	0.77778	0.60605
	H_E	0.67974	0.60784	0.68627	0.52288	0.5817	0.62745	0.67974	0.47059	0.62092	0.46405	0.67974	0.60191
	P	0.87873	0.11421	0.18031	0.53783	0.71014	0.62894	0.43325	1	0.09267	0.52745	0.42883	
PI	Na	8	2	4	3	2	3	7	2	8	3	8	50
	H_O	0.95000	0.35000	0.65000	0.75000	0.60000	0.36842	0.80000	0.05000	0.65000	0.45000	0.82353	0.58562
	H_E	0.83333	0.45000	0.63718	0.53974	0.50769	0.51067	0.79872	0.05000	0.64744	0.48846	0.79679	0.56908
	P	0.56127	0.34931	1.00000	0.08766	0.64888	0.31974	0.35284	1.00000	0.29874	0.65513	0.51257	

localidades		CTm3	CTm4	CTm5	CTm7	CTm8	CAm2	CAm13	CAm15	CAm16	CAm20	CAm26	Total
TA	Na	7	3	7	3	4	3	8	4	5	1	10	55
	H_O	0.78947	0.31579	0.60000	0.35000	0.65000	0.45000	0.78947	0.60000	0.45000	**mono**	0.90000	0.58947
	H_E	0.75676	0.35135	0.73846	0.52179	0.62949	0.57308	0.81508	0.47949	0.52949	**mono**	0.82564	0.62206
	P	0.25829	0.6053	0.04292	0.15542	0.82105	0.10799	0.17229	0.21068	0.13113		0.12919	
LA	Na	7	3	3	2	2	3	6	2	6	2	6	42
	H_O	0.40000	0.78571	1.00000	0.76923	0.20000	0.13333	0.33333	0.20000	0.33333	0.06667	0.42857	0.42273
	H_E	0.51034	0.54762	0.65977	0.51692	0.18621	0.13103	0.54253	0.18621	0.45977	0.06667	0.6455	0.40478
	P	0.13552	0.10016	0.01448	0.11186	1.00000	1.00000	0.00951	1.00000	0.07398	1	**0.000***	
MU	Na	3	4	3	2	2	2	5	1	3	1	3	29
	H_O	0.22222	0.61111	0.27778	0.05882	0.33333	0.27778	0.55556	**mono**	0.52941	**mono**	0.38889	0.36166
	H_E	0.42698	0.71587	0.59524	0.05882	0.48889	0.24603	0.48889	**mono**	0.49020	**mono**	0.41429	0.43612
	P	0.03210	**0.00465***	**0.00141***	1.00000	0.31669	1.00000	0.20980		0.51522		0.13660	
MN	Na	9	8	5	3	4	4	8	3	14	4	7	69
	H_O	0.66667	0.60000	0.53333	0.46667	0.53333	0.44828	0.70000	0.43333	0.68966	0.33333	0.68966	0.55401
	H_E	0.80169	0.65876	0.64181	0.56723	0.57740	0.60557	0.72260	0.45932	0.76467	0.32260	0.69449	0.61965
	P	0.15814	0.24351	0.08398	0.05936	0.78562	0.07628	0.03133	0.84096	0.17034	0.19362	0.07210	
CV	Na	10	3	4	3	3	3	8	3	8	4	5	54
	H_O	0.76190	0.35000	0.61905	0.42857	0.42857	0.57143	0.90476	0.19048	0.66667	0.33333	0.78947	0.54947
	H_E	0.83508	0.37564	0.63066	0.56330	0.35424	0.64111	0.83508	0.18002	0.64808	0.56794	0.60313	0.56674
	P	0.16322	0.68500	0.16468	0.01885	0.63526	0.46305	0.23834	1.00000	0.40277	0.01795	0.02154	
BO	Na	4	3	5	3	3	5	5	5	7	3	6	49
	H_O	0.46667	0.79310	0.80000	0.31034	0.56667	0.39286	0.40000	0.65517	0.50000	0.51724	0.42857	0.53006
	H_E	0.52034	0.53660	0.67119	0.48215	0.45028	0.58831	0.57401	0.60315	0.65028	0.51845	0.59610	0.56280
	P	**0.00446***	**0.00001***	0.17423	0.04147	0.34293	0.03149	0.03516	0.81596	**0.00477***	0.68583	0.04960	
NH	Na	6	3	3	3	3	2	6	3	4	3	6	42
	H_O	0.57143	0.71429	0.57143	0.57143	0.42857	0.66667	0.71429	0.57143	0.57143	0.57143	0.71429	0.60605
	H_E	0.68132	0.67033	0.60440	0.60440	0.53846	0.48485	0.73626	0.58242	0.49451	0.53846	0.73626	0.60651
	P	0.29279	0.77651	1.00000	1.00000	1.00000	1.00000	1.00000	1.00000	1.00000	0.32542	1.00000	

localidades		CTm3	CTm4	CTm5	CTm7	CTm8	CAm2	Cam13	Cam15	Cam16	Cam20	Cam26	Total
SN	Na	9	5	8	3	3	3	7	3	9	4	7	61
	H_O	0.73333	0.67742	0.51613	0.70968	0.51613	0.70968	0.50000	0.58065	0.54839	0.64516	0.54839	0.60771
	H_E	0.85028	0.60762	0.63670	0.60338	0.54310	0.62612	0.63390	0.45955	0.77842	0.61290	0.63353	0.63504
	P	0.04340	0.70225	0.09915	0.14174	0.68906	0.52286	0.22255	0.27930	**0.0001***	0.93867	0.29996	
JA	Na	5	6	5	3	3	4	4	3	3	3	3	42
	H_O	0.86667	0.64286	0.60000	0.46667	0.86667	0.46154	0.80000	0.60000	0.13333	0.80000	0.71429	0.63200
	H_E	0.71264	0.75397	0.64598	0.48046	0.54943	0.60308	0.54483	0.47586	0.29655	0.54943	0.50000	0.55566
	P	**0.00197***	0.59278	0.35709	0.46220	0.01699	0.20103	0.10864	0.57769	0.01884	0.06293	0.22171	
MP	Na	6	4	1	2	2	4	2	3	3	2	3	32
	H_O	0.86207	0.79310	**mono**	0.03333	0.50000	0.66667	0.33333	0.33333	0.26667	0.20000	0.33333	0.43217
	H_E	0.76528	0.64428	**mono**	0.09661	0.41299	0.59831	0.28249	0.28757	0.47401	0.18305	0.33672	0.40812
	P	0.63068	0.31337		0.05105	0.37657	0.13216	0.56286	1.00000	0.01686	1.00000	0.01437	
MX	Na	4	4	4	2	2	3	4	2	4	2	4	35
	H_O	0.68750	0.58824	0.31250	0.17647	0.41176	0.64706	0.64706	0.17647	0.47059	0.11765	0.58824	0.43849
	H_E	0.73185	0.58289	0.38105	0.48663	0.45098	0.55437	0.67736	0.16578	0.68271	0.11408	0.68271	0.50095
	P	0.18788	0.32097	0.08246	0.01226	1.00000	0.21299	0.58014	1.00000	0.09773	1.00000	0.25002	
MR	Na	6	6	3	3	3	5	7	3	8	3	9	56
	H_O	0.56757	0.70270	0.08333	0.35135	0.59459	0.51351	0.64865	0.10811	0.64865	0.47222	0.64865	0.48538
	H_E	0.75861	0.68863	0.18271	0.65494	0.51870	0.59756	0.69900	0.10478	0.70233	0.53404	0.70826	0.55904
	P	**0.00295***	0.36346	**0.00095***	**0.00157***	0.01767	0.08110	0.57266	1.00000	0.15586	0.34401	0.47753	
IB	Na	4	2	1	2	3	2	4	1	4	2	3	28
	H_O	0.37143	0.28571	**mono**	0.00000	0.65625	0.02857	0.58824	**mono**	0.35294	0.00000	0.57143	0.31716
	H_E	0.32505	0.28820	**mono**	0.05631	0.53621	0.02857	0.45040	**mono**	0.46576	0.05631	0.45383	0.29563
	P	1	1		0.01466	0.10053	1	**0.00086***		0.01511	0.01495	**0.00099***	

Tabela 6 – Índice de diversidade genética, média do número de alelos e média do Equilibrio de Hardy – Weinberg total considerando os 11 locos analisados neste estudo por grupos de *Arapaima gigas* de cada localidade. Número Amostral (N); Diversidade Genética; Média do Número de Alelos; Média do Equilibrio de Hardy - Weinberg (Média HWE), Heterozigosidade Observada (Ho) e Heterozigosidade Esperada (He); Locos que foram Monomórficos.

Localidades	N° Amostral	Média Diversidade Gênica	Média N° de Alelos	Média HWE Ho - He	Loco(s) Monomórfico(s)
Iquitos	16	0.561 ± 0.304	4.45	0.449 – 0.561	
Letícia	22	0.546 ± 0.295	5.26	0.503 – 0.546	
Carauarí	18	0.514 ± 0.296	4.09	0.583 – 0.590	
Eirunepé	13	0.594 ± 0.329	4.17	0.482 – 0.544	
Mamirauá	32	0.649 ± 0.342	6.35	0.695 – 0.660	
Coarí	9	0.602 ± 0.332	3.54	0.606 – 0.602	
RDS Piagaçu	20	0.540 ± 0.296	4.54	0.586 – 0.569	
Tapauá	20	0.547 ± 0.295	4.90	0.588 – 0.622	CAm20
Lábrea	15	0.343 ± 0.207	3.81	0.423 – 0.405	
Manuel Urbano	18	0.421 ± 0.245	2.45	0.362 – 0.435	CAm15 e CAm20
Manacapuru	30	0.606 ± 0.321	6.27	0.554 – 0.620	
Careiro da Várzea	21	0.559 ± 0.303	4.90	0.548 – 0.567	
Borba	30	0.540 ± 0.295	4.45	0.530 – 0.563	
Nhamundá	7	0.619 ± 0.350	3.81	0.606 – 0.606	
Santarém	31	0.625 ± 0.330	5.54	0.608 – 0.635	
Jacareacanga	15	0.532 ± 0.302	3.81	0.632 – 0.556	
Macapá	30	0.362 ± 0.204	2.81	0.431 – 0.407	CTm5
Mexiana	17	0.489 ± 0.275	3.18	0.438 – 0.501	
Marabá	37	0.555 ± 0.295	5.09	0.484 – 0.558	
Ilha do Bananal	35	0.206 ± 0.129	2.35	0.316 – 0.296	CTm5 e CAm15
Total	436	0.520 ± 0.286	4.34	0.522 – 0.541	CAm15, CAm20 e CTm5

5.3 Análise de efeito de redução populacional

Para as análises utilizando o parâmetro M obtido através do programa M*value* (Garza & Williamson, 2001), no primeiro cenário estabelecido, os grupos de indivíduos de cada ponto de coleta foram considerados como um agrupamento de indivíduos e para cada um destes agrupamentos foi calculado um valor de M. Neste primeiro cenário 19 das 20 localidades, analisadas neste estudo, apresentaram significância após a correção de Bonferroni ($P<0,025$) para o valor de M, considerando o valor atual de θ (Theta) igual a 1,61. A única localidade que não teve o valor de M significativo foi Iquitos, no Peru (IQ) (Tabela 7a). Dentre os 19 grupos de espécimes que apresentaram o valor de M significativo, 10 localidades apresentaram o índice $M<0,68$, um valor que indica redução populacional segundo Garza & Williamson (2001). Os grupos de espécimes das localidades que apresentaram valor de M inferior a 0,68 significativos foram: Carauarí (M=0,623), Eirunepé (M=0,646), Coari (M=0,632), RDS Piagaçú-purus (M=0,658), Lábrea (M=0,587), Manuel Urbano (M=0,646), Careiro da Várzea (M=0,670), Nhamundá (M=0,651), Mexiana (M=0,576) e Ilha do Bananal (M=0,565). Destacam-se os espécimes coletados na ilha do Bananal por apresentarem o menor índice de M dentre todas as localidades.

Em um segundo cenário, a obtenção do índice M foi realizada considerando-se os agrupamentos de espécimes obtidos pela análise Bayesiana no programa *Structure* e os valores médios de Q nas localidades analisadas (ver próximo tópico 5.4). Neste foram considerados três agrupamentos de espécimes

e para cada um destes foi inferido um valor de M. Os agrupamentos e as respectivas localidades, conforme Figura 8, são compostas por: Grupo 1 (verde), composto pelos indivíduos coletados em (1) Iquitos, (2) Letícia, (4) Eirunepé, (5) Mamirauá, (8) Tapauá, (9) Lábrea, (10) Manuel Urbano e (13) Borba; Grupo 2 (vermelho) composto pelos indivíduos coletados em Macapá (17), Mexiana (18), Marabá (19) e Ilha do Bananal (20); e Grupo 3 (azul), composto pelos indivíduos amostrados em Carauarí (3), Coari (6), Piagaçú Purus (7), Manacapuru (11), Careiro da Várzea (12), Nhamundá (14), Santarém (15) e Jacareacanga (16). O valor de M foi significativo para o grupo 2 (vermelho) indicando redução populacional, entretanto, o valor de M não foi inferior a 0,68 (Tabela 7b). De acordo com o padrão sugerido por Garza *&* Williamson (2001) todas as espécies/populações que sofreram algum tipo de redução populacional tinham valores de M abaixo de 0,68.

Tabela - 7: Valores de M obtidos através do programa M*value*, sendo θ (calculado a partir do banco de dados atual) = **1,61**. **a)** Valores de M calculados para grupos de espécimes de cada localidade. **b)** Valores de M calculados para grupos de espécimes considerando-se os agrupamentos obtidos pela análise Bayesiana no programa *Structure* e os valores médios de Q nas localidades analisadas (ver tópico 5.4).

a)

Número Amostral	Localidades	M *value*	*P*
16	**Iquitos**	0,776	0,0494
22	**Letícia**	0,742	0,0093*
18	**Carauarí**	0,623	0,0000*
13	**Eirunepé**	0,646	0,0006*
32	**Mamirauá**	0,760	0,0154*
9	**Coarí**	0,632	0,0001*
20	**RDS Piagaçu**	0,658	0,0000*
20	**Tapauá**	0,705	0,0017*
15	**Lábrea**	0,587	0,0000*
18	**Manuel Urbano**	0,646	0,0000*
30	**Manacapuru**	0,757	0,0123*
21	**Careiro da Várzea**	0,670	0,0004*
30	**Borba**	0,694	0,0005*
7	**Nhamundá**	0,651	0,0005*
31	**Santarém**	0,755	0,0131*
15	**Jacareacanga**	0,686	0,0013*
30	**Macapá**	0,694	0,0003*
17	**Mexiana**	0,576	0,0000*
37	**Marabá**	0,766	0,0151*
35	**Ilha do Bananal**	0,565	0,0000*

*Valores significativos após a correção de Bonferroni (P=0,025)

b)

Número Amostral	Grupos	M value	*P*
166	1 (verde)	0,831	0,0898
119	2 (vermelho)	0,782	0,0137*
151	3 (azul)	0,807	0,0368

*Valores significativos após a correção de Bonferroni (P=0,025)

5.4 Distribuição da variabilidade genética e diferenciação populacional

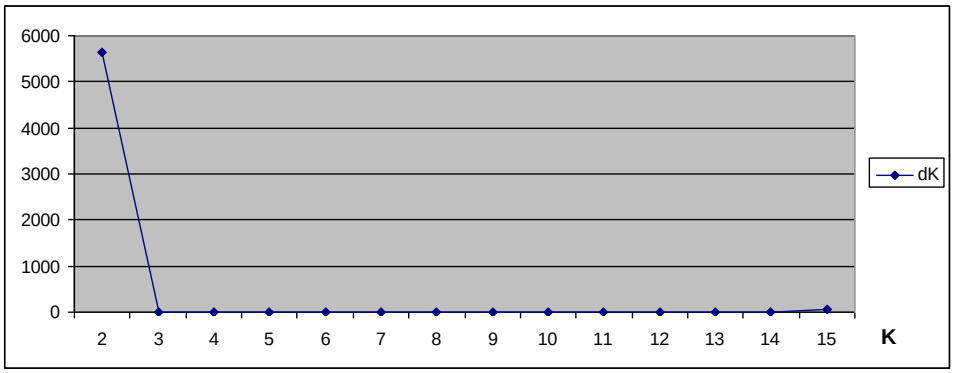
A análise de variância molecular (AMOVA) foi realizada para detectar a variação genética dentro e entre as populações, sendo considerada cada localidade como uma população. Para este cenário os índices de variação entre os espécimes das localidades mostraram que 20,28% da variância total ocorrem entre as localidades e 2,27% ocorrem dentro das localidades (Tabela 08). Considerando a faixa de valores para diferenciação genética entre as populações, proposta por Wright (1965), segundo o qual valores entre 0 e 0,15 indicam fraca diferenciação genética; valores entre 0,15 e 0,25 indicam diferenciação moderada; e valores acima de 0,25 indicam grande diferenciação, observou-se através dos resultados de AMOVA, aplicando-se $F_{ST,}$ que existe nível moderado de estrutura de populacional (F_{ST} =0,20284, P<0,001) neste cenário apresentado.

Tabela 08 - Análise de Variância Molecular, aplicando-se o F_{ST} de Wright (1969), para os espécimes de *Arapaiama*. Soma dos quadrados (Ss); Porcentagem de variação (%); Valor de P significativo (*****).

Tipo de Variação	*Ss*	%
Entre localidades	643,729	20,28
Entre indivíduos / Dentro das localidades	1204,561	2,27
Entre todos os indivíduos	1192,500	77,44
F_{ST}	0,20284	**P < 0,001***

O programa *Structure* versão 2.11 (Pritchard *et al.,* 2000) foi usado para identificar as prováveis populações existentes da espécie *Arapaima gigas*, com base em distinções genéticas, ao longo dos rios da bacia Amazônica e Tocantins - Araguaia. O maior delta K (Δ*K*) encontrado para os indivíduos das localidades amostradas de *Arapaima gigas* permitiu a escolha de K (Figura 7a), que foi de 2 *clusters* (representado na figura 7b pelas cores verde e vermelho). A maioria das localidades foi identificada dentro de um grande agrupamento, o *cluster* representado pela cor verde. Existe uma zona mista formada da combinação do *cluster* verde com o *cluster* vermelho. E observam-se quatro localidades representativas para o *cluster* vermelho.

a)



b)

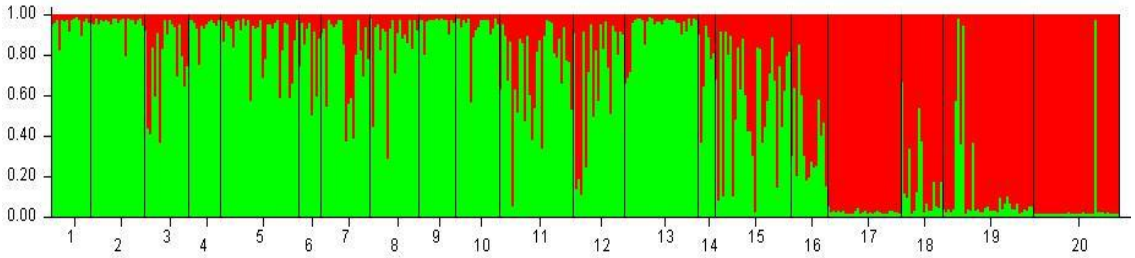


Figura 7 - Estrutura populacional baseada em 11 locos de microssatélites de *Arapaima gigas* estimado pela análise bayesiana realizada pelo programa *Structure* (considerando freqüências alélicas correlacionadas). Cada indivíduo é representado por uma linha vertical (verde ou vermelha). Cada uma das cores indica um *cluster* baseado em semelhanças genotípicas.a) Correlação entre os valores de delta K e K. b) K=2. Os números de 1 a 20 representam as localidades de coleta: 1 Iquitos; 2 Letícia; 3 Carauarí; 4 Eirunepé; 5 Mamirauá; 6 Coari; 7 Piagaçú Purus; 8 Tapauá; 9 Lábrea; 10 Manuel Urbano; 11 Manacapuru; 12 Careiro da Várzea; 13 Borba; 14 Nhamundá; 15 Santarém; 16 Jacaréacanga; 17 Amapá; 18 Mexiana ;19 Marabá; 20 Ilha do Bananal.

Tabela 9 - Resultado do programa *Structure* para K=2 *clusters*, com os valores de atribuição (Q) dos espécimes de cada localidade para cada um dos dois *clusters* (Cluster 1, verde e Cluster 2, vermelho).

Pontos na Figura	Localidades	Cluster 1 (Q)	Cluster 2 (Q)	Número Amostral
1	**Iquitos (IQ)**	**0.92**	0.07	16
2	**Letícia (LE)**	**0.93**	0.06	22
4	**Eirunepé (EI)**	**0.90**	0.09	13
5	**Mamirauá (MM)**	**0.84**	0.15	32
8	**Tapauá (TA)**	**0.81**	0.18	20
9	**Lábrea (LA)**	**0.93**	0.06	15
10	**Manuel Urbano (MU)**	**0.90**	0.09	18
13	**Borba (BO)**	**0.92**	0.07	30
3	**Carauarí (CA)**	0.72	0.27	18
6	**Coarí (CO)**	0.77	0.22	9
7	**RDS Piagaçu (PI)**	0.76	0.23	20
11	**Manacapuru (MN)**	0.63	0.36	30
12	**Careiro da Várzea (CV)**	0.66	0.33	21
14	**Nhamundá (NH)**	0.68	0.31	7
15	**Santarém (SN)**	0.51	0.48	31
16	**Jacareacanga (JA)**	0.26	0.73	15
17	**Macapá (MP)**	0.02	**0.97**	30
18	**Mexiana (MX)**	0.18	**0.81**	17
19	**Marabá (MR)**	0.13	**0.86**	37
20	**Ilha do Bananal (IB)**	0.04	**0.95**	35

*Valores de q >0.80 foram evidenciados para facilitar a visualização dos resultados

Utilizando a proporção média do valor de Q, acima de 0,80 (atribuição média dos indivíduos em grupos), podem-se atribuir os espécimes das localidades amostradas em três grupos: dois grupos com valores de Q acima de 0,80 (*cluster* verde no *Structure* = grupo verde na Figura 8; *cluster* vermelho no *Structure* = grupo vermelho na Figura 8); um terceiro grupo com valores de Q abaixo de 0,80 (localidades misturadas no *Structure* = grupo azul na Figura 8). Os valores de Q para cada localidade amostrada, obtidos através de programa *Structure*, podem ser observados na Tabela 9.

O valor de Q corresponde à pureza dos espécimes das localidades em relação aos dois grupos genéticos apresentados, representados pelas cores verde e vermelho. O Grupo 1 abrange localidades quase puras para o *cluster* 1 representado pela cor verde – representado pelo grupo verde na Figura 8, composto pelos indivíduos das seguintes localidades distribuídos na porção ocidental da região Amazônica: (1) Iquitos; (2) Letícia; (4) Eirunepé; (5) Mamirauá; (8) Tapauá; (9) Lábrea; (10) Manuel Urbano; e (13) Borba. O Grupo 2 é composto por indivíduos quase puros para o *cluster* 2 representado pela cor vermelha – representado pelo grupo vermelho na Figura 8, composto pelos indivíduos das seguintes localidades distribuídas na porção oriental da região Amazônica e localidades da bacia Araguaia / Tocantins, são elas: Macapá (17), Mexiana (18), Marabá (19) e Ilha do Bananal (20). O Grupo 3 é composto por localidades com indivíduos geneticamente misturados entre os *clusters* 1 (verde) e 2 (vermelho), e sendo representado pelo grupo azul na Figura 8. Este grupo 3 é composto pelos indivíduos amostrados em localidades da porção central da região Amazônica: Carauarí (3), Coari (6), Piagaçú Purus (7), Manacapuru (11), Careiro da Várzea (12), Nhamundá (14), Santarém (15) e Jacareacanga (16).

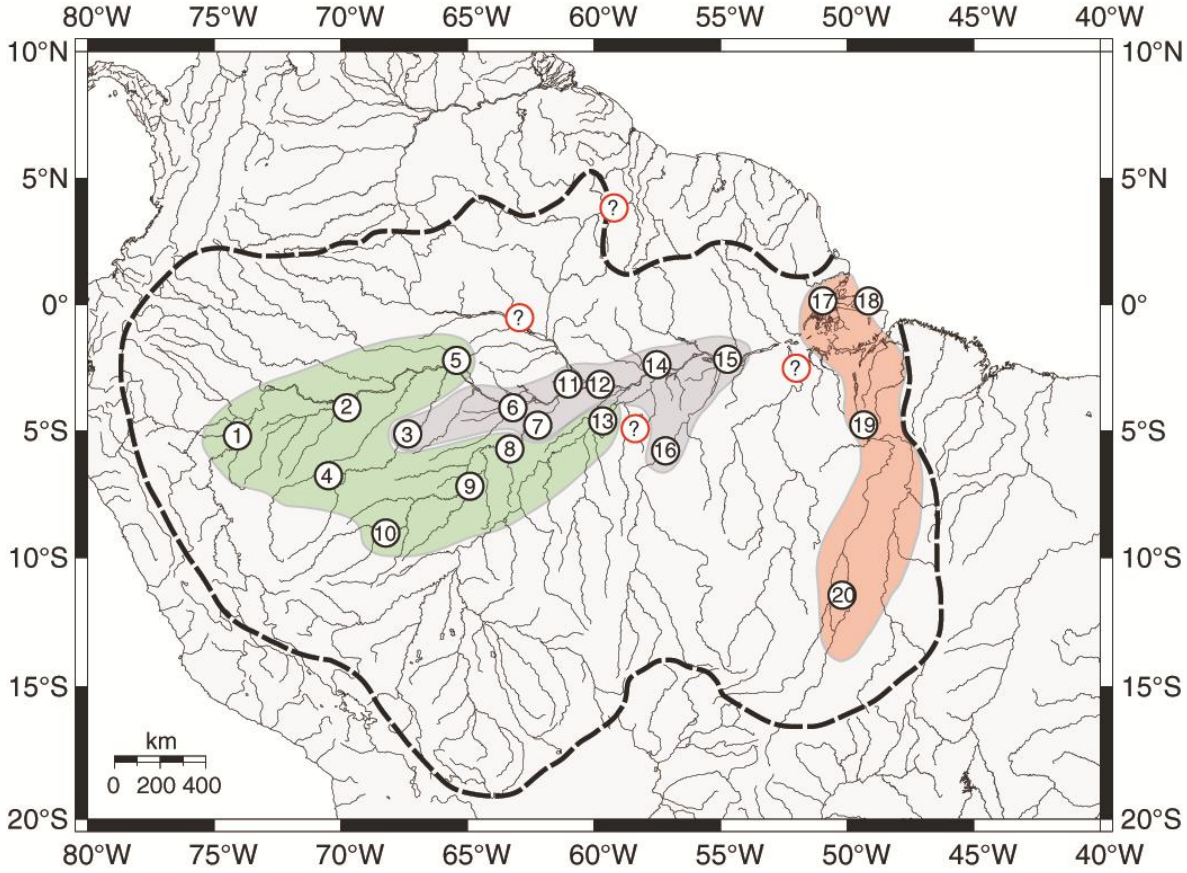


Figura 8 - Distribuição dos três grupos de *Arapaima gigas* de acordo com o resultado do programa *Structure*. A estrutura genética encontrada pode ser dividida em três macroregiões. Grupo 1, localidades com indivíduos quase puros para o *cluster* verde (Amazônia ocidental, destacado em verde), o Grupo 2, que abrange as localidades com indivíduos quase puros para o *cluster* vermelho (Amazônia oriental e bacia Araguaia/Tocantins, destacado em vermelho) e Grupo 3 que compreende indivíduos misturados dos dois *clusters* (Amazônia central, destacado em azul). Os pontos de interrogação representam localidades onde há ocorrência da espécie, mas não foram amostradas para este estudo, sendo então incerta a posição destas nos referidos grupos.

5.5 Correlação entre distância genética e distância geográfica

O resultado do teste de Mantel mostrou que o coeficiente de correlação obtido foi significativo (r= 0,584742, *P* = 0,0003) quando todas as localidades foram consideradas, indicando que há uma forte correlação entre distância genética e distância geográfica entre os indivíduos de pirarucu das localidades amostradas.

5.5.1 Análise de autocorrelação

Na análise de autocorrelação espacial (Figura 09), usando dados de F_{ST} linearizados par-a-par e a distância entre as localidades em km (seguindo-se o percurso dos rios), foram observadas correlações significativas para todas as categorias de distâncias. O decréscimo do coeficiente de correlação não é contínuo com o aumento nas distâncias geográficas sugerindo que outras forças evolutivas além de fluxo gênico estão atuando em menores escalas geográficas.

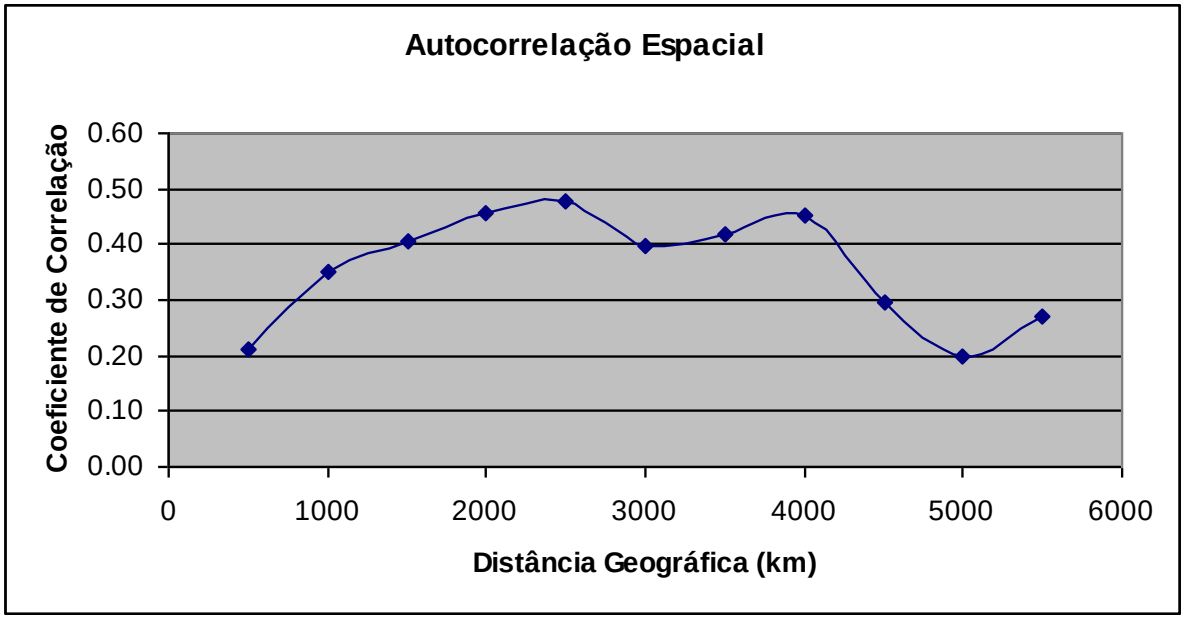


Figura - 9: Gráfico de autocorrelação entre distância geográfica e o coeficiente de correlação para as localidades amostradas de *Arapaima gigas*.

6. Discussão

6.1 Diversidade genética da espécie *Arapaima gigas*

A variabilidade genética é uma variação de natureza herdável que se perpetua nas gerações subseqüentes e quanto maior a variabilidade genética maior é a adaptabilidade de um determinado grupo natural no meio em que vive (Allcock *et al.*, 1995). Ela esta diretamente relacionada à adaptabilidade e serve de base para atuação da seleção natural, sendo usualmente alta em populações naturais (Solé-Cava & Thorpe, 1991). Devido a isso se faz necessário conhecer os níveis de variabilidade genética de grupos de espécimes naturais, especialmente se estes estiverem sobre intensa ação de pesca como ocorre com a espécie *Arapaima gigas*.

Os dados de ANOVA aqui mostrados evidenciam um padrão de diversidade genética heterogêneo nos grupos de pirarucus das áreas amostradas, sendo significante a diferença nas médias de heterozigosidade observada para os indivíduos das 20 localidades dos rios da calha e dos rios tributários. Esse padrão de heterogeneidade é observado também quando comparamos os indivíduos da calha contra os indivíduos dos tributários.

Os trabalhos de Veríssimo, (1985), Crossa & Petrere Junior (1999), relatam que a pesca de pirarucu ocorre majoritariamente no canal principal do rio Amazonas e nos maiores tributários, especialmente os mais próximos dos grandes centros urbanos. Os dados observados da análise de ANOVA sugerem

que as localidades da calha principal, apesar de ser o local onde a pesca é mais intensa, é geneticamente mais diversa que os tributários, rios mais distantes dos centros urbanos. Isso pode ocorrer devido ao fato de a calha funcionar como uma área de encontro entre indivíduos de diferentes áreas, permanecendo e mantendo assim níveis maiores de variabilidade genética. Essa área de encontro é favorecida pelos processos de cheias e vazantes que ocorrem na área de várzea o que facilita o deslocamento dos indivíduos.

Em um estudo de genética de populações, usando DNA mitocondrial, feito para 120 amostras de pirarucu coletadas, principalmente, na calha principal do rio Amazonas, Hrbek *et al.* (2005) observaram valores de diversidade gênica ($\hat{H}$) variando de 0,143 a 0,885, não considerando a localidade do rio Madre de Dios onde a espécie foi introduzida. Desconsiderando o rio Madre de Dios, os valores de diversidade gênica para a espécie *Arapaima* também foram heterogêneos para as localidades estudadas da calha.

Resultados de trabalhos realizados com peixes da bacia Amazônica mostram um padrão de elevados níveis de variabilidade genética para a calha principal da bacia Amazônica. Batista *et al.* (2005) utilizando a região controle do DNA mitocondrial para caracterizar a variabilidade genética interespecífica e intraespecífica de duas espécies de bagre ao longo do rio Solimões (Amazonas) observou que a dourada *Brachyplatystoma rousseauxii* (Castelnau, 1855) e a piramutaba *Brachyplatystoma vaillantii* (Valenciennes, 1840) apresentam altos níveis de polimorfismo genético. Entretanto foram encontradas diferenças na quantidade de variabilidade genética encontradas para estas duas espécies.

Para o tambaqui (*Colossoma macropomum*) utilizando a região controle do DNA mitocondrial em cinco localidades da calha do rio Amazonas Santos *et al*.(2007) observou taxas altas de variabilidade genética e todas as populações apresentaram também elevados valores de diversidade haplotípica.

Estudos investigando o padrão de distribuição da variabilidade genética para as espécies de peixes amazônicos na calha e nos principais tributários do rio Amazonas também têm encontrado elevados níveis de diversidade genética como os observados por Machado *et al.* (2009), em um estudo de genética de populações para *Prochilodus nigricans,* neste foi utilizado a região controle do DNA mitocondrial que apresentou elevados índices de diversidade tanto para a calha principal quanto para os tributários.

Com base nestes estudos, por meio de análises genéticas utilizando marcadores mitocondriais, pode-se dizer que para a calha principal da bacia Amazônica parece existir uma estrutura populacional fraca ou ausência de estruturação e diversidade gênica relativamente alta.

Os baixos valores de diversidade gênica observados para as localidades do rio Araguaia (IB), rio Tocantins (MR) podem estar indicando que na bacia do Tocantins / Araguaia pode ter havido uma colonização recente da espécie ou sobre exploração da mesma na região. Esta região parece ter sido colonizada por um pequeno número de indivíduos de pirarucu favorecendo assim efeitos de deriva genética que nesse caso pode ter levado a esses baixos índices de variabilidade genética observados, ou seja, houve perda de alelos. Além disso, o rio Araguaia apresenta em seu curso inferior uma série de corredeiras que

poderiam funcionar como barreiras ao fluxo gênico entre os indivíduos da bacia do Araguaia com a bacia Amazônica o que dificultaria a chance de troca de alelos entre elas favorecendo a diferenciação entre as mesmas.

Entretanto, não podemos descartar a possibilidade de que essa baixa diversidade de pirarucu para a bacia do Araguaia / Tocantins, descartando-se o possível efeito da pesca, seja um padrão natural da espécie nesta referida região. Esse padrão de baixa variabilidade genética na bacia Araguaia / Tocantins foi encontrado também para *Podocnemis expansa,* através do uso de marcadores microssatélites e mitocondriais por Pearse *et al.* (2006). Onde é sugerido que o padrão diferenciado para a espécie na referida bacia ocorre por eventos históricos de introgressão marinha que possam ter isolado as populações de tartarugas e outros organismos da bacia do Araguaia com a bacia Amazônica diversas vezes durante o processo de formação das mesmas.

Foi observada uma baixa variabilidade genética também para os indivíduos coletados na localidade Manuel Urbano (MU), fato que pode ser explicado pela provável colonização desta localidade por um número reduzido de indivíduos. Esse baixo nível de variabilidade genética parece também receber contribuição de processos como deriva gênica, mantida pela distância desta localidade para com o rio da calha principal (onde há maior variabilidade).

Os resultados aqui apresentados devem ser vistos como um importante alerta sobre a fragilidade genética dos indivíduos de pirarucu da bacia do rio Araguaia e para a localidade Manuel Urbano (MU), uma vez que qualquer fator

(natural ou não) que possa contribuir para reduzir ainda mais a variabilidade genética desses indivíduos, vai colocar em risco a sobrevivência dos mesmos.

6.2 Redução populacional na espécie *Arapaima gigas*

A diversidade genética é a matéria bruta onde atua a evolução, permitindo que as populações evoluam em resposta às mudanças ambientais. (Frankel & Soulé, 1981; Reed & Frankham, 2003). A perda de diversidade genética, em muitos casos, torna uma população suscetível à extinção como resultado dos efeitos de endocruzamento, perda geral de heterozigosidade ou simplesmente devido ao fato de não haver níveis de variação suficientes para responder à pressão seletiva (Flagstad *et al.,* 2003; Randi *et al.,* 2003). Em vista disso, populações naturais que tenham experimentado uma recente redução no tamanho efetivo populacional exibem uma redução do número de alelos e da heterozigosidade, sendo que o número de alelos é reduzido mais rapidamente que a heterozigosidade (Yu *et al*., 1999). A partir desse sinal, pode-se detectar se um determinado grupo amostrado passou por um efeito de redução populacional.

Garza & Williamson (2001) avaliaram uma série de trabalhos e com base nestes, sugeriram que qualquer banco de dados que use mais de sete locos microssatélites pode interpretar um valor de M (que varia de 0 a 1, obtido por meio da expressão M=k/r; onde “k” representa o número total de alelos e “r” a variação do tamanho dos alelos) menor que 0,68 como uma recente redução no

tamanho populacional para o grupo analisado em questão. Este valor foi o maior observado em populações/espécies que tiveram comprovadamente suas populações reduzidas significantemente no passado recente. Quanto menor o valor de M, mais intensa teria sido a redução populacional. No presente estudo, o menor valor de M foi apresentado pelas amostras coletadas no rio Araguaia. Conforme já discutido, esta localidade apresenta baixos valores de variabilidade genética. Enfatiza-se aqui, portanto, que o grupo de pirarucus do rio Araguaia, com suas características peculiares, necessita de atenção em relação à manutenção da variabilidade genética dos estoques na bacia Araguaia / Tocantins. Ressalta-se aqui que as coletas das amostras de pirarucu no rio Araguaia foram realizadas por uma expedição com propósito científico tomando especial cuidado na amostragem. Nesta expedição os espécimes de pirarucu foram amostrados em sete lagos diferentes que perfazem a ilha do Bananal, no rio Araguaia.

Na Amazônia Central há relatos históricos de que a carne de pirarucu é intensamente consumida pelos habitantes locais. Nestes locais foram observados valores baixos e significativos de M, sugerindo a ocorrência de sobrexploração pesqueira nas localidades de Carauarí, Eirunepé, Coari, Piagaçú Purus. Os relatos apontam que a carne de pirarucu também é intensamente consumida no baixo amazonas onde a redução populacional foi observada nas localidades de Carauarí e Nhamundá. Considerando a calha principal do rio Amazonas Hrbek *et al.* (2005) utilizando marcadores mitocondriais observaram efeito de estrangulamento populacional em localidades próximas a grandes

centros urbanos, os autores atribuem isso à severa sobrexploração pesqueira iniciada no século 18.

No presente estudo foi observado efeito de redução populacional nos espécimes coletados de *Arapaima gigas* em três tributários, rio Juruá, rio Purus e rio Araguaia. Isso, provavelmente ocorre devido ao fato de que as práticas pesqueiras ocorrem majoritariamente no canal principal do rio Amazonas e nos maiores tributários, especialmente os mais próximos aos grandes centros urbanos (Veríssimo, 1895; Crossa & Petrere Júnior, 1999).

Com medidas de manejo e o controle legal da exploração de *Arapaima gigas* é possível que os impactos genéticos possam ser minimizados para a espécie. Este trabalho reforça a necessidade de se incentivar e estender o manejo comunitário para esta espécie para outras regiões da Amazônia contribuindo com a conservação da mesma.

6.3 Estrutura populacional da espécie *Arapaima gigas*

O conhecimento da composição genética de uma espécie, e de como ela está organizada em populações, é fundamental para ações de manejo e conservação. É importante também entender se há estruturação genética e se esta é uma característica natural ou um resultado da ação humana (Frankham *et al.*, 2002). As populações isoladas ou unidades de manejo (UM) são tipicamente caracterizadas por diferenças na freqüência genotípica, sem levar em conta a natureza filogenética dos alelos (Moritz, 1994). Este conceito é importante para a

conservação, pois descreve as unidades de manejo fundamentais: as populações estruturadas (Bowen, 1998). Estas populações estruturadas representam a subdivisão de populações de uma espécie em unidades locais intercruzantes e resultam do equilíbrio dinâmico entre forças que favorecem a processos de diferenciação, como deriva, mutação e seleção disruptiva, diferentes em cada área, e forças homogeneizantes como migração, seleção purificadora e seleção balanceadora, uniformes em cada área (Hartl & Clark, 2007).

Majoritariamente, a estruturação genética é ocasionada por ausência de panmixia. A verificação desta em populações naturais pode ser realizada por meio da estimativa do fluxo gênico entre diferentes localidades, bem como a partir da variância das freqüências gênicas entre as diferentes localidades amostradas.

Para os resultados da análise de variância molecular (AMOVA) o valor de F_{ST} foi de 0,21 ($P<0,01$), o que indica que as localidades aqui analisadas encontram-se moderadamente diferenciadas, considerando a faixa de variação proposta por Wright (1965). A genética de populações relaciona-se com as variações das freqüências alélicas dentro e entre populações. A medida mais usada para mensurar estrutura genética populacional são os índices F de Wright (1931). Para o cálculo desses índices é necessário primeiro definir os grupos de indivíduos em populações e depois usar os referidos genótipos para computar a variância nas freqüências alélicas. No entanto um pré-requisito fundamental de qualquer inferência na estrutura genética de populações é a definição para o

estudo do que será considerada uma população. Tipicamente a inferência das populações é baseada em origem geográfica ou fenótipos. Entretanto a estrutura genética de populações nem sempre é refletida na proximidade geográfica entre os indivíduos ou no compartilhamento de fenótipos. Populações que são amplamente distribuídas podem, todavia, ser geneticamente estruturadas devido a barreiras não perceptíveis ao fluxo gênico.

Em virtude disso, o banco de dados do presente estudo foi analisado considerando uma análise Bayesiana que não assume agrupamento de indivíduos a priori, e foi implementada no programa *Structure* (Pritchard *et al.* 2000). Os resultados evidenciaram dois *clusters* (K=2) genéticos e a partir da distribuição destes foram observados três grupos distintos para as localidades analisadas. Para cada grupo estimado neste estudo foi considerado uma faixa do valor do coeficiente de relacionamento (Q), valor médio de cada localidade em relação aos *clusters* 1 (verde) e 2 (vermelho). Grupos de indivíduos de uma determinada localidade que apresentem acima de 80% de similaridade genética a um dos *clusters* são considerados como pertencentes a este *cluster*. Grupos de indivíduos de uma determinada localidade, que não apresentarem um índice de similaridade a um dos dois clusters, igual ou acima de 80%, foram atribuídos a um terceiro grupo que abrange espécimes com grupo genético não puro em relação a um dos *clusters*.

Com base na detecção de dois grupos genéticos, a área de amostragem pode ser separada em: um grupo representado pelos rios da calha principal e tributários que compreendem a Amazônia ocidental (grupo verde), o grupo azul

representando as localidades misturadas na Amazônia central e o grupo vermelho representando a Amazônia oriental e a bacia Tocantins / Araguaia (Figura 8). Os tributários aqui estudados não comportam populações estruturadas, quando comparados à calha principal. O padrão de estruturação observado é do tipo isolamento por distância conforme observado por Hrbek *et al.* (2005) e Hrbek *et al.* (2007) em populações naturais de pirarucu utilizando marcadores mitocôndriais e microssatéites, respectivamente, para seis localidades da calha principal da bacia Amazônica. Os rios tributários aqui analisados obedecem ao padrão de estrutura por isolamento por distância observado nos estudos citados que investigaram apenas populações da calha central do rio Amazonas.

Na área central da bacia Amazônica se encontra o grupo 3 (Grupo azul na Figura 8). Os padrões de mistura genética observados na várzea da bacia Amazônica central não surpreendem, uma vez que esse sistema de várzea, através de um sistema anual de cheia e vazante dos rios que o formam ao longo do ano, facilita a movimentação dos organismos e conseqüentemente padrões de troca gênica entre as localidades.

Com base nos resultados aqui apresentados sugere-se que o manejo da espécie, seja realizado de maneira diferenciada para as localidades dos extremos da bacia Amazônica (Grupo 1, Amazônia ocidental e Grupo 2, Amazônia oriental, bacia do Araguaia / Tocantins) de forma a não perder as particularidades genéticas dos referidos grupos.

Sugere-se que as populações de *Arapaima gigas* da bacia Amazônica devem ser manejadas de maneira diferenciada, respeitando a estruturação genética encontrada dividida em três macroregiões: Amazônia ocidental, Amazônia central e Amazônia oriental.

6.3.1 Isolamento por distância na espécie *Arapaiama gigas*

Os resultados aqui apresentados indicam uma associação direta entre distância genética e distância geográfica, mostrando que o isolamento por distância é um fator significativo na estruturação das populações de *Arapaima gigas* em uma grande escala geográfica. Observando-se o gráfico de autocorrelação pode-se dizer que não há um decréscimo contínuo do índice de autocorrelação com o aumento nas distâncias geográficas. Não é possível definir regiões geográficas entre regiões geneticamente independentes, através dos parâmetros utilizados para esta análise, F_{ST} linearizado par-a-par. Com base nas análises implementadas no *Structure*, as duas extremidades da bacia Amazônica se apresentam de forma estruturada, e as localidades geograficamente intermediárias são geneticamente misturadas. Entretanto, isso não indica a existência de populações distintas. O resultado do teste de autocorrelação indica que há fluxo gênico entre todas as localidades e que a estruturação observada é do tipo isolamento por distância entre todas as localidades, embora as localidades geograficamente mais distantes também sejam geneticamente mais diferenciadas.

Diferentemente, na análise de auto-correlação espacial utilizando os resultados de 14 locos microssatélites para amostras de pirarucu coletadas em localidades da calha principal da bacia Amazônica, Hrbek *et al.* (2007) observou uma significante diferenciação entre localidades separadas por mais de 2500 km. Pode-se dizer então que no presente estudo com uma amostragem abrangente em quase toda bacia Amazônica, e com base nos dados de 11 locos microssatélites, existe um grande gradiente genético em uma escala geográfica da bacia Amazônica. Onde os extremos apresentam alguma diferenciação genética, embora todas as localidades ao longo deste gradiente estão todas conectadas por fluxo genético. Nesta escala geográfica o processo evolutivo mais importante parece ser o isolamento por distância.

7. Conclusão

- Os valores médios de diversidade genética em *Arapaima gigas* dos espécimes amostrados nos rios da calha da bacia Amazônica e dos espécimes amostrados nos rios tributários são diferentes. Há maior variabilidade genética nos rios da calha principal da Bacia Amazônica se comparados aos rios tributários da mesma.

- Foi encontrada estruturação genética do tipo isolamento por distância para as amostras coletadas de *Arapaima gigas*.

- Os espécimes de *Arapaima gigas* amostrados nos tributários não são estruturados em relação aos espécimes amostrados nos rios da calha principal da bacia Amazônica. O padrão de estruturação via isolamento por distância sugere a divisão da bacia Amazônica em três macroregiões para manejo diferenciado: rios da Amazônia ocidental, rios da Amazônia central e rios da Amazônia oriental mais rios da bacia Araguaia/Tocantins.

- Especial atenção deve ser dispensada aos espécimes de *Arapaima gigas* do rio Araguaia, devido a detecção de baixa variabilidade genética e ocorrência de recente redução populacional ou efeito de colonização.

8. Referências Bibliográficas

Allcock, A. L.; Chauvet, M.; Crandall, K. A.; Given, D. R.; Hall, S. J. G.; Iriondo, J. M.; Lewinsohn, T.M.; Lynch, S. M.; G. M.; Solé-Cava, A. M.; Stackebrandt, E.; Templeton, A. R. e Watts, P. C. 1995. *Genetic diversity as a component of biodiversity*. Cambridge University Press, Cambridge, UK. 57 - 88.

Avise, J. C. 2004. *Molecular Markers, Natural History and Evolution*, second edition. Sinauer Associates, Sunderland, MA, USA.

Baca, L. C. 2001. *Historia Biológica del paiche o Pirarucu (Arapaima gigas, Cuvier) y bases para su cultivo em la Amazônia*. Iquitos, Peru. 27 pp.

Batista, J. S. & Alves-Gomes, J. A. 2006. Phylogeography of *Brachyplatystoma rousseauxii* (Siluriformes - *Pimelodidae*) in the Amazon Basin offers preliminary evidence for the first case of “homing” for an Amazonian migratory catfish. *Genetic molecular Research.* 5(4): 723-740.

Batista, J. S.; Aquino, K. F.; Farias, I. P.; Alves-Gomes, J. A. A. 2004. Genetic variability studies of piramutaba - *Brachyplatystoma rousseauxii* (*Pimelodidae : Siluriformes*) na bacia Amazônica: Basis for management and conservation. Extended abstract submitted to the VI International Congress on the Biology of Fish, Tropical Hotel, Manaus/AM.

Best, R.C. 1984. *The aquatic mammals and reptiles of the Amazon. In: The Amazon Limnology and Landscape Ecology of a Mighty Tropical River and its Basins.* (ed. Sioli H). Dr. Junk W Publisher, Dodechet, The Netherlands.

Bowen, B. W. 1998. What is wrong with ESUs? The gap between evolutionary theory and conservation principles. Journal of Fisheries Research. vol. 17 (5): 1355-1358.

Cantanhede A. M., Da Silva V. M. F., Farias I. P., Hrbek T., Lazzarini S. M., Alves-Gomes J. 2005. Phylogeography and population genetics of the endangered Amazonian manatee, *Trichechus inunguis* Natterer, 1883 (Mammalia, *Sirenia*). *Molecular Ecology*. 14: 401 - 413.

Castello, L. 2004. A method to count pirarucu *Arapaima gigas*: fishers, assessment, and management. *National American Journal Fisheries Management*, 24: 379-389.

Crossa, M.; Petrere Júnior, M. 1999. Morphometric relationships and indirect determination of the length frequency structure of the pirarucu *Arapaima gigas* Cuvier. *Fisheries Management Ecology*. 6: 173-186.

Di Rienzo, A.; Peterson, A.C.; Garza, J.C.; Valdes, A.M.; Slatkin, M.; Freimer, N.B. 1994. Mutational processes of simple-sequence repeat loci in human populations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91: 3166-3170.

Evanno G.; Regnaut, S.; Goudet, J. 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software structure: a simulation study. Molecular Ecology 14: 2611 - 2620.

Excoffier, L.; Smouse P. E.; Quattro, J. M. 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: Application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics*, 131: 479-491.

Excoffier, L.; Laval, G.; Schneider, S. 2005. Arlequin (version 3.0): An integrated software package for population genetics data analyses. *Evolutionary Bioinformatics Online.* 1: 47-50.

Falush, D.; Stephens, M.; Pritchard, J. K. 2003. Inference of population structure using multilocus genotype data: linked loci and correlated allele frequencies*. Genetics*, 164: 1567-1587.

Farias, I.P.; Hrbek, T.; Brinkmann, H; Sampaio, I.; Meyer, A. 2003. Characterization and isolation of DNA microsatellite primers for *Arapaima gigas*, an economically important but severely over-exploited fish species of the Amazon basin. *Molecular Ecology Notes*, 3: 128-130.

Farias I.P.; Da Silveira, R.; De Thoisy B.; Monjeló, L.A.; Thorbjarnarson, J.; Hrbek, T. 2004. Genetic diversity and population genetic structure of Amazonian crocodiles. *Animal Conservation*. 7: 265-272.

Flagstad, T.; Walker, C.W.; Vilà, C.; Sundqvist, A. K.; Fernholm. B,; Hufthammer A. K.; Wiig, T.; Koyola, I.; Ellegren, H. 2003. Two centuries of the Scandinavian wolf population: patterns of genetic variability and migration during an era of dramatic decline. *Molecular Ecology.* 12 : 869-880.

Fontenele, O. 1948. Contribuição para o conhecimento da biologia do pirarucu *Arapaima gigas* (CUVIER), em cativeiro (Actinopterygii, *Osteoglossidae*). *Revista Brasileira de Biologia*. 8(4): 445-459.

Fontenele, O. 1953. Hábitos de desova do pirarucu *Arapaima gigas* (Cuvier) (PISCES: Isopondyli, *Arapaimidae*), e evolução da sua larva. *Fortaleza: Departamento Nacional de Obras Contra as Secas*. 22pp.

Frankel, O.H.; Soulé, M.E. 1981. *Conservation and Evolution*. Cambridge University Press, Cambridge, England.

Frankham R.; Ballou J.R.; Briscoe D.A. 2002. *Introduction to Conservation Genetics.* Cambridge University Press, Cambridge, England, UK.

Gaggiotti, O.E.; Lange, O.; Rassmann, K.; Gliddon, C. 1999. A comparison of two indirect methods for estimating average levels of gene flow using microsatellite data. *Molecular Ecology.* 8: 1513-1520.

Garza, J.C.; Williamson, E.G. 2001. Detection of reduction in population size using data from microsatellite loci. *Molecular Ecology.* 10: 305-318.

Goldstein, D.B.; Schlötterer, C. 1999. *Microsatellites: evolution and applications*. Oxford University Press, New York, NY. 352 pp.

Goulding, M. 1979. *Ecologia de Pesca do Rio Madeira*. INPA. Manaus, Amazonas, Brazil.

Goulding, M. 1980. *Fishes and the forest*. University of California Press. Los Angeles, CA, USA.

Goulding, M.; Carvalho, M.L.; Ferreira, E.G. 1988. *Rio Negro, Rich Life in Poor Water*. SPB Academy Publication. The Hague, Belgium.

Goulding, M.; Smith, N.J.H; Mahar, D.J. 2000. *Floods of Fortune*. Columbia University press, New York, NY, USA.

Goulding, M.; Barthem, R.; Ferreira, E.J.G. 2003. *The Smithsonian atlas of the Amazon*. Smithsonian Institution Press. Washington, DC, USA.

Hartl, D. L.; Clark, A. G. 2007. Principles of Population Genetics. Sinauer Associates, *Inc. Publisher. Suderland*, Massachusetts. 652pp.

Hrbek, T.; Farias, I.P.; Crossa, M.; Sampaio, I.; Porto, J.I.R.; Meyer, A. 2005. Population genetic analysis of *Arapaima gigas*, one of the largest freshwater fishes of the Amazon basin: implications for its conservation. *Animal Conservation*, 8: 297-308.

Hrbek, T.; Crossa, M.; Farias, I. P. 2007. Conservation Strategies for *Arapaima gigas* (Schinz, 1822) and the Amazonian várzea Ecossistem

Hrbek, T.; Farias, I.P.; Crossa, M.; Sampaio, I. Long-term loss of genetic diversity, and bottleneck in *Arapaima gigas*, the largest fish of the Amazon basin. *Conservation Genetics*, (em revisão).

Isaac, V. J.; Rocha, V. L.. C. & Mota, S. 1993. Considerações sobre a legislação da ‘‘piracema’’ e outras restrições da pesca da região do Médio Amazonas. Museu Paraense Emilio Goeldi, pp. 188–211.

Kurlansky, M. 1998. *A biography of the fish that changed the world.* Jonathan Cape, London, UK.

Lundberg, J.G.; Kottelat, M.; Smith, G.R.; Stiassny, M.L.J.; Gill, A.C. 2000. So many fishes, so little time: An overview of recent ichthyological discovery in continental waters. *Annals of the Missouri botanical garden.*, 87: 26-62.

Machado, V. N.; Soares, M. G. M.; Farias, I. P. (2009). Análise da variabilidade genética da curimatã (Prochilodus nigricans, Agassis 1829) na calha do rio Amazonas e seus principais tributários. Universidade Federeal do Amazonas, Manaus, Amazonas – Brasil.

Mantel, N. 1967. The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Research*. 27: 209-220.

Medem, F. 1983. *Los Crocodylia de Sur America. Vol. 2*. Ed. Carrera, Bogotá, Colômbia.

Menezes, R. S. 1951. Notas biológicas e econômicas sobre o pirarucu, *Arapaima gigas* (Cuvier) (Actinopterygii, Arapaimidae). *Serviço de Informações Agrícolas. Ministério da Agricultura. Série Estudos Técnicos* nº 3. 152 p. Rio de Janeiro. 3: 9–39.

Moritz, C. 1994. Defining evolutionary significant units for conservation. *Tree* 9: 373-375.

Mullis, K.; Faloona, W. 1987. Specific synthesis of DNA in vitro via polymerase catalysed chain reaction. In: Ferreira, M. L. *Methods Enzymol*., 55 : 335 - 350p.

Neigel, J.. Is Fst obsolete? *Conservation Genetics.* 3: 167 - 173p.

Nelson, J. S. 1994. *Fishes of the World*, 3rd edition. John Wiley and Sons, Inc. New York, NY, USA.

Nei, M. 1987. *Molecular Evolutionary Genetics.* Columbia University Press, New York, NY, USA. 512pp.

Pearse, D.E.; Arndt, A.D.; Valenzuela, N.; Miller, B.A.; Cantarelli, V. and Sites. J. W. 2006. Estimating population structure under nonequilibrium conditions in a conservation context: continent-wide population genetics of the giant Amazon river turtle, *Podocnemis expansa* (Chelonia; *Podocnemididae*). Molecular Ecology 15: 985-1006.

Pinese, J. F.; Perete, A. C. 2001. *Biomecânica da Alimentação do Pirarucu (Arapaima gigas).* In: XVI Encontro Brasileiro de Ictiologia. São Leopoldo, RS, Brasil.

Prang, G. 2001a**.** *A caboclo society in the middle Rio Negro basin: ecology, economy, and history of an ornamental fishery in the state of Amazonas, Brazil*. Wayne State University, Detroit, USA. 303pp.

Prang, G. 2001b. Ornamental fish and the relations of production in the extractive economy of the Rio Negro, Brazil: implications for sustainable resource use. *Conservation and Management of Ornamental Fish Resources of the Rio Negro Basin, Amazonia, Brazil - Projeto Piaba*. Editora da Universidade Federal do Amazonas, Manaus, Amazonas, Brasil.

Pritchard, J.K.; Wen, W. 2003. Documentation for STRUCTURE software: Version 2.0 Available from http://pritch.bsd.uchicago.edu.

Pritchard, J. K.; Stephens, M.; Donnelly, P. 2000. Inference of Population Structure Using Multilocus Genotype Data**.** *Genetics*, 155: 945-959.

Queiroz, H.L.; Crampton, W.G.R. 1999. *Estratégias para Manejo de Recursos Pesqueiros em Mamiraúa*. Sociedade Civil Mamiraúa, MCT – CNPq. Brasília, Brasil.

Queiroz, H.L. 2000. Natural history and conservation of pirarucu, *Arapaima gigas*, at the Amazonian Várzea: red giants in muddy waters. Ph.D. Thesis. St. Andrews (UK): University of St. Andrews. 226 pp

R version 2.9.0, The R Project for Statistical Computing, http://www.r-project.org/ Acessado em, 08/06/09.

Randi, E.; Davoli, F.; Pierpaoli, M.; Pertoldi, C.; Madsen, A.B.; Loeschcke, V. 2003. Genetic structure in otter (*Lutra lutra*) populations in Europe: implications for conservation. *Animal. Conservation.* 6 : 93-100.

Reed, D.H.; Frankham, R. 2003. Correlation between fitness and genetic diversity. *Conservation Biology.*, 17: 230-237.

Rice, W. R. 1989. Analyzing tables of statistical tests. *Evolution*, 43 : 223-225.

Ridley, M. 2006. *Evolução*. University of Oxford, UK. 752pp.

Saint-Paul, V. 1986. Potential for aquaculture of South American freshwater fishes: a review. *Aquaculture.* 5: 205 - 240.

Sambrook, J.; Fritsch, E.F.; Maniatis, T. 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual.* 2nd edition ed. Vol. 1. Cold Springs Harbor Laboratory Press, Cold Springs Harbor, NY, USA.

Santos, M. C. F.; Ruffino, M. L.; Farias, I. P. 2007. High levels of genetic variability and panmixia of the tambaqui *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1816) in the main channel of the Amazon River. *Journal of Fish Biology.* 71: (Supplement A), 33-44.

Silva, J. A. G.; Moreira, O.; Queiroz, H. L.; Vallinoto, M.; Ready, J. S.; Figueredo, W.;Schneider, H. (2008). Genética de populações de pirarucus (*Arapaima gigas*) da reserva Mamirauá e considerações sobre estrutura genética para a espécie. Museu Paraense Emílio Goeldi e Universidade Federal do Pará, Belém, Pará – Brasil.

Slatkin, M. 1995. A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies. *Genetics*, 139: 457-462.

Smith, N.J.H. 1980. Caimans, capybaras, otters, manatees, and man in Amazônia. *Biology Conservation.*177-187.

Solé-Cava, A. M. & Thorpe, J. P., 1991. Hight levels of genetic variation in natural populations of marine lower invertebrates. Biology J. Lyn Society. 44: 65 – 80.

Stiassny, M.L.J. 1999. The medium is the message: freshwater biodiversity in peril. *In*: Cracraft, J.; Grifo, F.T. (Eds).*The Living Planet in Crisis: Biodiversity Science and Policy*. Columbia University Press, New York, NY, USA.

Val, A.L.; Almeida-Val, V.M.F. 1995. *Fishes of the Amazon and their Environment: Phisiological and Biochemical Aspects*. Berlin: Springer Verlag.

Veríssimo, J. 1895. *A Pesca na Amazônia*. Livraria Clássica de Alves & C. Rio de Janeiro, Brasil.

Wright, S. 1969. *Evolution and the Genetics of Populations*.*The Theory of Gene Frequencies.* Vol. 2. University of Chicago Press, Chicago, IL, USA.

Yu, Y.; Nie, L.; He, Z.Q.; Wen, J.K.; Jian, C.S.; Zhang, Y.P. 1999. Mitochondrial DNA variation in cattle of South China: Origin and introgression. *Animal Genetics*, 30: 245-250.