

MINISTÉRIO DA CIÊNCIA, TECNOLOGIA E INOVAÇÃO

INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA

Programa de Pós-Graduação em Genética, Conservação e Biologia Evolutiva

Conservação genética do peixe neotropical *Arapaima gigas* (Schinz, 1822)

(Osteoglossidae: Actinopterygii) da bacia Amazônica

CARLOS HENRIQUE DOS ANJOS DOS SANTOS

MANAUS, AMAZONAS, BRASIL

2011

CARLOS HENRIQUE DOS ANJOS DOS SANTOS

Conservação genética do peixe neotropical *Arapaima gigas* (Schinz, 1822)

(Osteoglossidae: Actinopterygii) da bacia Amazônica

ORIENTADORA: Dra. Vera Maria Fonseca de Almeida e Val

COORIENTADORA: Dra. Izeni Pires Farias

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Genética, Conservação e Biologia Evolutiva.

MANAUS, AMAZONAS, BRASIL

2011

Ficha Catalográfica

S232c Santos, Carlos Henrique dos Anjos

Conservação genética do peixe neotropical *Arapaima gigas* (Schinz, 1822) (Osteoglossidae: Actinopterygii) da bacia Amazônica / Carlos Henrique dos Anjos dos Santos.--- Manaus: [s.n.], 2011. xiv, 126f.: il. (algumas coloridas).

Tese (Doutorado em Genética, Conservação e Biologia Evolutiva)—INPA, Manaus, 2011.

Orientadora: Dra. Vera Maria Fonseca de Almeida e Val

Coorientadora: Dra. Izeni Pires Farias

1.Peixes - Conservação 2.Peixes - Manejo 3.Microsatélites (Genética)

4.Marcadores moleculares 5.Variabilidade genética 6.Diversidade

genética 7.Pirarucu – *Arapaima gigas* I.Título

CDD 19^a ed. 597.015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Sinopse:

Este estudo teve como objetivo verificar a variabilidade genética de exemplares de pirarucu (*Arapaima gigas*) provenientes de cinco pisciculturas distribuídas nos estados do Amazonas, Rondônia e Ceará comparando-os com duas populações de Reservas de Desenvolvimento Sustentável (Mamirauá e Fonte Boa) do estado do Amazonas. Diante disso, os aspectos da variabilidade genética analisados foram: diversidade genética, diferenciação genética, estruturação populacional, gargalo populacional e identificação de locos *outlier*. Essas análises têm como proposta a implementação de um sistema de manejo para a espécie em cativeiro. Além disso, objetivou-se, também, determinar quantos locos de microsatélites são necessários para um estudo de variabilidade genética em exemplares de cativeiro.

Palavras-chave: *Arapaima gigas*, conservação genética, marcadores microsatélites, manejo em cativeiro.

Dedico esta Tese aos meus pais Maria A. Santos e Antônio F. dos Santos, aos meus irmãos Maria do Livramento, Cláudio Henrique, Francisco das Chagas, Daniele, Ednardo, Larissa e meus sobrinhos. Em especial dedico aos meus padrinhos Dr. Ronald Soares e Dra. Alice Ferraz.

“Um dos maiores danos que se pode causar a uma criança é levá-la a perder a confiança na sua própria capacidade de pensar”

Emilia Ferreiro (Psicolinguística)

“A entrada para a mente do homem é o que ele aprende, a saída é o que ele realizar. Se sua mente não for alimentada por um fornecimento contínuo de novas idéias, que ele põe a trabalhar com um propósito, e se não houver uma saída por uma ação, sua ação, sua mente torna-se estagnada. Tal mente é um perigo para o indivíduo que a possui e inútil para a comunidade”

Jeremias W. Jenks

“O sábio não é o homem que fornece as verdadeiras respostas; é o que formula as verdadeiras perguntas”

Claude Lévi-Strauss

A realização dessa Tese foi possível devido:

Ao Programa de Pós-Graduação em Genética, Conservação e Biologia Evolutiva (PPG-GCBEv) do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA).

Ao Laboratório de Ecofisiologia e Evolução Molecular (LEEM/INPA), Coordenação de Biodiversidade (CBio), onde a maior parte deste estudo foi realizada com aporte financeiro proporcionado pelo Projeto de Pesquisa Institucional conveniado pelas agências de fomento - Fundação de Amparo à Pesquisa do Amazonas (FAPEAM) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico/Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação (CNPq/MCTI) (INCT ADAPTA, FAPEAM/CNPq Processo N° 573976/2008-2).

Ao Laboratório de Evolução e Genética Animal (LEGAL) da Universidade Federal do Amazonas (UFAM) com uma parte do aporte financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) através do Projeto SISBIOTA (Processo N° 563348/2010-0).

Ao Programa de Cooperação Acadêmica – PROCAD (INPA/UNICAMP/UFRGS) (Processo N° 023/2006/CAPES) com aporte financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento do Pessoal de Nível Superior (CAPES) do Ministério da Educação (MEC), pelo qual realizei um treinamento sobre o desenvolvimento de marcadores microssatélites no Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular (PG-GBM) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP).

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de estudo nível de Doutorado e do auxílio bancada (Processo N° 142810/2007-0) durante a realização do estudo.

Agradecimentos

Em primeiro lugar tenho muito a agradecer a Deus por ter-me proporcionado, além das conquistas, lições que trago até hoje em minha vida. Agradeço também a Deus por conduzir de forma simples e quase imperceptível nossas vidas.

À minha orientadora Dra. Vera Maria Fonseca de Almeida e Val por ter acreditado e aceitado a orientar-me, dando incentivo e dedicando o seu tempo na orientação em uma área que até pouco tempo era nova na minha formação profissional. Destaco ainda a dedicação e vocação dessa grande mulher para o desenvolvimento da ciência no Brasil, e em especial no Estado do Amazonas.

À minha coorientadora Dra. Izeni Pires Farias por ter aceitado a coorientar-me, sendo essencial nesse período suas dicas e conhecimentos sobre essa nova área a qual estava iniciando a explorar.

Ao Dr. Adalberto Luis Val por ter recebido-me no LEEM/INPA, e com certeza tornou-se um dos orientadores dessa tese, sempre colocando seu ponto de vista sobre como fazer ciência e dar uma resposta à sociedade.

À Mestre Maria de Nazaré Paula-Silva por ter proporcionado não somente a mim, mas também a todos os alunos do Laboratório, sua ajuda na hora da realização dos experimentos e resolução de variados problemas que aconteceram durante o percurso do trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Genética, Conservação e Biologia Evolutiva (PPG-GCBEV) do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA) pela formação profissional, bem como a todos os professores do curso que, de forma direta ou indireta, enriqueceram minha formação com novos conhecimentos.

Aos amigos e colegas do Laboratório de Ecofisiologia e Evolução Molecular que, de certa forma, tornaram-se minha família aqui em Manaus, Carolina F. S. Sousa, Givanildo X. Santana, Nayara S. Castro, Priscila R. M. Nascimento, Rosalina Pinheiro, Ramon Baptista, Alexandre Vergueiro-Júnior, Marcos P. Lima, Renato Lemgruber, Gisele T. Clímaco, Daniel Fagundes, Daniele A. Matoso, Rafael M. Duarte, Hellen S. Henrique, Alzira M. Oliveira, Karen Y. Silva, Kátia T. Castro, Vivian M. Brandão, Dulcilene P. Martins, Brenda Moraes, Ronildo O. Figueiredo,

Daiane Kochhann, Marcio S. Ferreira, Nislanha A. Anjos, Fernanda G. Dragan, Ana Helena Bevillacqua, Christiane P. Oliveira, Katherine L. Vásquez, Gustavo F. Landini, Fabiola X. Valdez-Domingos, Luciana M. Fé, Sandra M. Brust, Nívea F. Oliveira, Tariana R. Martins, Gisele C. Vilarinho, José Tarcísio B. Neto, José Gadelha Netto, Valéria R. Sobral, Marise M. Sakuragui, Suzana B. Mota, Ítalo R. Areval, Luciana M. Añez, Thiago L. Nascimento, Maria Angélica Laredo e a todos aqueles que não citei aqui.

À Dona Rai, Raquel e Claudinha por participarem diariamente do convívio no Laboratório durante esses anos. E de uma forma direta e indireta também participaram da realização dessa tese.

À dona Sônia (conterrânea) e dona Val, por seus cafezinhos e pelos períodos de descontração.

Ao senhor Aldeney, à dona Teresinha e aos seus familiares por terem me recebido em sua residência quando de minha chegada em Manaus, que com certeza acabaram tornando-se minha família também.

Aos meus pais, que sempre estiveram ao meu lado, me apoiando e acreditando na realização de meus sonhos, e mesmo com uma grande distância sempre estiveram presentes em meu coração. Portanto, aos meus pais minha eterna gratidão, amor e carinho.

Aos meus irmãos e sobrinhos que sempre estiveram em meu coração e pensamentos.

Em especial agradeço aos meus padrinhos, Dra. Alice Ferraz e Dr. Ronald Cavalcante Soares, por terem acreditado em mim e apoiado meus estudos. Obrigado, jamais irei esquecer a confiança de vocês.

Destaco aqui a ajuda essencial da Carolina F. Sousa (irmã gêmea), Priscila R. Nascimento e a Nayara S. Castro para a finalização dessa tese; posso dizer que ela é também de vocês.

Ao Departamento Nacional de Obras Contrás as Secas (DNOCS) de Pentecoste (CE), em nome dos Mestres Carlos Riedel e Pedro Eymar, por terem disponibilizando as amostras de pirarucu da Estação de Piscicultura.

À Profª. Dra. Izeni Pires de Farias, por ter disponibilizado as amostras de pirarucu da Reserva de Desenvolvimento Sustentável de Mamirauá (RDSM) e ao

Mestre Marcos Prado Lima, por ter fornecido as amostras de pirarucu da Reserva de Desenvolvimento Sustentável de Fonte Boa (RDSFB).

Ao Laboratório de Genética de Plantas (LabGen), em nome da Profa. Dra. Maristerra Lemos e da Mestre Carol, por terem disponibilizado as Instalações do Laboratório para a finalização dessa Tese.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de estudos de doutorado e pelo auxílio bancada que proporcionaram a minha permanência em Manaus e a realização dessa tese.

RESUMO

O pirarucu (*Arapaima gigas*) é o maior peixe de água doce de escamas do mundo e é considerado o maior “fóssil vivo”. *A. gigas* é uma espécie endêmica da bacia amazônica e seus exemplares podem alcançar os três metros de comprimento e pesar mais de 200 kg na natureza. Devido à sua grande importância econômica, o pirarucu acabou sendo a primeira espécie de peixe amazônico a apresentar nítidos sinais de sobreexploração. Como consequência, esta espécie tem sido muito utilizada para criação em cativeiro e apesar de diversos estudos sobre reprodução e nutrição dessa espécie em cativeiro virem sendo realizados recentemente, nenhuma avaliação genética dos plantéis e alevinos gerados em pisciculturas foram avaliados até o momento. O presente trabalho é o primeiro a avaliar as características de diversidade genética de populações de cativeiro da espécie *A. gigas*, comparando-as com as de populações provenientes da natureza. Assim, o objetivo deste trabalho foi analisar os níveis de diversidade genética entre os exemplares de pirarucu de cativeiro e natureza, verificando a ocorrência de diferenciação genética entre as populações, com o intuito de propor medidas de manejo e conservação para a espécie em cativeiro. Um total de 424 alelos foi detectado para 19 locos de microssatélites, sendo que destes, 49 foram alelos privados. O número de alelos por loco variou de 1,621 (PFP₁, cativeiro) a 2,268 (RDSM, selvagem) e a heterozigosidade esperada variou de 0,383 (PFP₁) a 0,559 (RDSM). Foi verificado a existência de uma moderada variação genética, com alta diferenciação entre as populações analisadas. Os valores em pares do F_{ST} mostraram variação de 0,135 (RDSFB-RDSM, selvagem) a 0,364 (PFP₁-PPV, cativeiro), mostrando que as populações de cativeiro tendem a diferir mais do que as populações da natureza. A árvore de neighbour-joining (NJ) e a análise de correspondência fatorial (FCA) mostraram a ocorrência de dois grupos genéticos a partir dos dados de distância genética. Além disso, verificou-se que as populações de pirarucu apresentam sua própria aglomeração ($q > 0,9$), indicando não existir misturas entre as populações. Nós identificamos a ocorrência de um gargalo populacional recente nas populações de *A. gigas*, indicando um reduzido tamanho populacional no estoque fundador. Além disso, observamos que 10 locos microssatélites é um número de locos mínimo necessário para um estudo de diversidade genética em animais de natureza ou

cativeiro. Contudo, estudos envolvendo espécies que apresentam tamanho populacional reduzido e ameaçados de extinção devem aplicar um número de marcadores microssatélites superior a 10 locos. Em resumo, nós sugerimos neste trabalho como medida de manejo e conservação para o pirarucu, um acompanhamento mais detalhado dos plantéis de reprodutores, bem como um monitoramento periódico nas populações selvagens de pirarucu, com o intuito de que esses animais possam vir a ser utilizados como futuros estoques de reprodutores.

ABSTRACT

The pirarucu (*Arapaima gigas*) is the largest freshwater scale fish of the world and is considered the greatest “living fossil”. The species *A. gigas* is endemic to the Amazon basin and can reach up to three meters length and 200 kg weigh in wild. Due to its great economic importance pirarucu became the first species of Amazonian fishes to be overexploited. As a consequence, it has been widely used in aquaculture, and although many studies about its reproduction and nutrition have been done, no genetic evaluation has been made over pirarucu produced in captivity. The present work is the first to analyze the genetic diversity of captivity population of *A. gigas*, comparing them to wild population. Thus, the objective of this study has been the analysis of the levels of genetic diversity between the individuals of pirarucu from captivity and wild, observing the occurrence of genetic differentiation between populations with the aim of proposing management and conservation procedures for the species in captivity. A total of 424 alleles were detected, of which, 49 were private alleles. The effective number of alleles per locus ranged from 1.621 (PFP₁, captivity) to 2.268 (RDSM, wild), and expected heterozygosity ranged from 0.383 (PFP₁) to 0.559 (RSDM). We verified the existence of a moderate genetic variation, with high differentiation between populations. The F_{ST} values in pairs showed variation of 0.135 (RDSFB-RDSM, wild) to 0.364 (PFP₁-PPV, captivity), showing that the captive populations tend to differ more than the populations of wild. The neighbor-joining tree (NJ) and factorial correspondence analysis (FCA) showed the occurrence of two genetic groups from the data of genetic distance. Furthermore, we found that each population has their own pirarucu agglomeration ($q > 0.9$), indicating there is no mixing between them. We have identified the occurrence of a recent population bottleneck in *A. gigas*, indicating a small founding population size in the stock of captivity population. This is showed in the two wild populations as well. In addition, we observed that 10 microsatellite loci is the number of loci necessary for a study of genetic diversity in captivity and wild animals, although species with a small population size and endangered must be evaluated with more than 10 loci to minimize the low sampling size effect. In summary, we suggest in this paper, as a process of management and conservation for the pirarucu, a more detailed follow-up to plant

breeders, as well as a periodic monitoring of wild populations of *A. gigas*, with the purpose of using these animals as future breeding stock.

Sumário

I. Capítulo I – Estado do conhecimento.....	1
À guisa de introdução.....	1
Biodiversidade na Amazônia.....	3
Diversidade da ictiofauna na América do Sul em especial da bacia Amazônica.....	5
Pirarucu.....	8
Adaptação do pirarucu a respiração aérea.....	9
Reprodução do pirarucu.....	11
Pesca do pirarucu.....	11
O cultivo de pirarucu.....	13
Estudos genéticos com <i>Arapaima gigas</i>	15
Estudos genéticos populacionais.....	15
Estudos citogenéticos.....	17
Estudos filogenéticos.....	17
Marcadores moleculares.....	19
Microsatélites.....	21
Modelos mutacionais dos microsatélites.....	23
Possíveis restrições no uso dos microsatélites.....	25
II. Objetivos.....	27
Geral.....	27
Específicos.....	27
III. Material e métodos.....	28
Obtenção das amostras de pirarucu.....	28
<i>Amostras da natureza ou selvagens</i>	28
<i>Amostras de cativeiro</i>	28
Extração do DNA genômico.....	29
Qualidade, quantificação e diluição do DNA genômico.....	30
Construção da biblioteca genômica enriquecida de microsatélites.....	30
Desenhos dos oligonucleotídeos.....	32

PCR de gradiente de temperatura e genotipagem.....	32
Genotipagem das amostras em seqüenciador capilar.....	33
Análises dos dados.....	34
<i>Validação dos locos microssatélites</i>	34
<i>Análises populacionais</i>	34
<i>Diversidade genética</i>	35
<i>Diferenciação genética</i>	35
<i>Estruturação populacional</i>	37
<i>Bottleneck – gargalo populacional</i>	37
<i>Detecção de locos outlier</i>	38
IV. Resultados e discussão.....	39
Artigo 1. Development and characterization of microsatellite loci in <i>Arapaima gigas</i> , an important neotropical fish.....	40
Artigo 2. Composição da diversidade genética em sete populações de <i>Arapaima gigas</i> utilizando 19 marcadores microssatélites: implicações para o manejo e conservação.....	48
Resumo.....	50
Introdução.....	51
Material e métodos.....	53
Resultados.....	57
Discussão.....	60
Agradecimentos.....	63
Bibliografia citada.....	64
Artigo 3. Quantos locos microssatélites são necessários para um estudo de diversidade genética?.....	88
Resumo.....	90
Introdução.....	91
Material e Métodos.....	92
Resultados.....	94
Discussão.....	95
Agradecimentos.....	97

Bibliografia citada.....	98
V. Conclusões gerais.....	109
VI. Referências bibliográficas.....	110

Listas de figuras

Capítulo I

- Figura 1. Mapa da bacia Amazônica com sua distribuição nos países da América do Sul (Amazônia Sul-Americana) e no território brasileiro (Amazônia Legal brasileira) (Fonte: USAID, 2005)..... 2
- Figura 2. Distribuição da ictiofauna em suas respectivas ecorregiões na América do Sul (Lévêque et al. 2008). 1 - Sul da Patagônia (12 espécies e 1 endêmica), 2 - Norte da Patagônia (23 espécies e 5 endêmicas), 3 - Sul da Trans-Andina (19 espécies e 13 endêmicas), 4 - Lago de Titicaca (32 espécies e 30 endêmicas), 5 – bacia do Paraná e São Francisco (847 espécies e 517 endêmicas), 6 - Sudeste brasileiro (194 espécies e 90 endêmicas), 7 - Oeste brasileiro (131 espécies e 50 endêmicas), 8 - bacia Amazônica (2.416 espécies e 2.072 endêmicas), 9 - Norte da Venezuela (61 espécies e 9 endêmicas) e 10 - Norte da Trans-Andina (423 espécies e 326 endêmicas)..... 6
- Figura 3. Localização de áreas protegidas e centros de diversidades e endemismo para os peixes da bacia Amazônica (Fonte: USAID, 2005 - Modificado)..... 7
- Figura 4. Exemplar de *Arapaima gigas*. (Fonte: Arantes, 2009. modificado)..... 9
- Figura 5. Cariótipo do *Arapaima gigas* do rio Araguaia, Mato Grosso. (Fonte: Marques, 2003; Marques et al. 2006)..... 17
- Figura 6. Distribuição geográfica da família Osteoglossidae (descrito por Lévêque et al. 2008 adaptado de Berra, 2001)..... 18
- Figura 7. Relação filogenética dentro da superordem osteoglossomorpha

baseado na hipótese monofilética sugerida por Lavoué e Sullivan (2004) com modificações..... 19

Figura 8. Revisão subjetiva da relativa importância de diferentes marcadores moleculares entre os anos de 1966 a 2003. (Schlötterer, 2004 - Modificado)..... 20

Figura 9. Evolução dos números de estudos relacionados aos principais marcadores moleculares utilizados atualmente. (Fonte: Guichoux et al. 2011 - Modificado)..... 21

Figura 10. Replicação do DNA repetitivo. A| Após a reibridização ocorre um mal alinhamento gerando um ganho ou B| perda de uma unidade repetida. (modelo proposto por Ellegren, 2004, com modificações)..... 24

Material e métodos

Figura 11. Localização geográfica dos locais de coletas das amostras de *Arapaima gigas*. (A) Departamento Nacional de Obras Contra as Secas (DNOCS), Pentecoste - CE; (B) Piscicultura Porto Velho (PPV), Porto Velho - RO; (C) Reserva de Desenvolvimento Sustentável de Mamirauá (RDSM), Tefé - AM; (D) Reserva de Desenvolvimento Sustentável de Fonte Boa (RDSFB), Fonte Boa - AM e (E) Piscicultura FrigoPesca (PFP_{1, 2 e 3}), Manacapuru - AM..... 29

Artigo 2

Figura 1. Localização geográfica dos locais de coletas das amostras de *Arapaima gigas*. (A) Departamento Nacional de Obras Contra as Secas (DNOCS), Pentecoste - CE; (B) Piscicultura Porto Velho (PPV), Porto Velho - RO; (C) Reserva de Desenvolvimento Sustentável de Mamirauá (RDSM), Tefé - AM; (D) Reserva de Desenvolvimento Sustentável de Fonte Boa (RDSFB), Fonte Boa - AM e (E) Piscicultura FrigoPesca (PFP_{1, 2 e 3}), Manacapuru - AM..... 77

Figura 2. Análise de estruturação de sete populações de *Arapaima gigas* da Amazônia brasileira com base em 19 locos microssatélites e assumindo um $K=7$ 78

Figura 3. Componente de Análise Fatorial (FCA) das populações de cativeiro e selvagem de *Arapaima gigas* da Amazônia brasileira com base em 19 locos microssatélites. Axe 1 (6,61%) e Axe 2 (6,32%) representam os primeiros dois Componentes Fatorial, respectivamente..... 79

Figura 4. Dendograma de Neighbour-joining (NJ) para as populações de cativeiro e selvagem de *Arapaima gigas* da Amazônia brasileira com base em 19 locos microssatélites..... 80

Figura 5. Detecção de locos *outlier* em populações de cativeiro e selvagem de *Arapaima gigas* da Amazônia brasileira baseado em 19 locos microssatélites.... 81

Figura S1. Estimativa do valor do Delta K utilizando o programa STRUCTURE HARVEST em sete populações de *Arapaima gigas* da Amazônia brasileira baseados em 19 locos de microssatélites..... 87

Artigo 3

Figura 1. Comparação entre os pares de grupos a partir das médias da heterozigosidade observada entre os quatro grupos de marcadores microssatélites, aplicando a ANOVA e o teste de Bonferroni. (A, grupo A; B, grupo B; C, grupo C e D, grupo D, respectivamente)..... 106

Lista de tabelas

Artigo 1

Table 1. Characteristics of the ten *Arapaima gigas* microsatellite loci: locus name, Genbank accession number, primer sequences (F: forward primer, R: reverse primer), repeat motif from a sequenced clone, annealing temperature (T_a), number of alleles (A), product size range in base pairs, expected (H_E) and observed heterozygosity (H_O), fixation index (f), polymorphism information content (PIC), P values for the HWE test, significance threshold adjusted using Bonferroni correction (P-HWE): (P: $5\% \leq 0.005$), ^{NS}not significant and *significant..... 48

Artigo 2

Tabela 1. Índices da diversidade genética em populações de cativeiro e selvagens de *Arapaima gigas* na Amazônia brasileira com base em 19 locos microssatélites..... 73

Tabela 2. Valores obtidos para os índices da Estatística- F e diferenciação genética para as sete populações de *Arapaima gigas* da Amazônia brasileira com base em 19 locos microssatélites..... 74

Tabela 3. Distância (D_A) e identidade genética (D_I) (Nei, 1972) na diagonal abaixo e F_{ST} (Weir e Cockerham, 1984) na diagonal acima entre as populações de *Arapaima gigas* da Amazônia brasileira com base em 19 locos microssatélites..... 75

Tabela 4. Resultados da análise de variância molecular (AMOVA) para as sete populações de *Arapaima gigas* da Amazônia brasileira com base em 19 locos microssatélites..... 76

Tabela S1. Informações dos parâmetros básicos para a diversidade genética

associadas com as populações de pirarucus da Amazônia brasileira com base em 19 locos microssatélites..... 82

Tabela S2. Proporção de membros de cada uma das sete populações analisadas de *Arapaima gigas* para as sete inferências de agrupamentos derivados utilizando o software Structure (contribuição >0,9 em negrito)..... 85

Tabela S3. Detecção de locos outlier em locos microssatélites nas populações de cativo e selvagem de *Arapaima gigas* da Amazônia brasileira baseado em 19 locos microssatélites..... 86

Artigo 3

Tabela 1. Índice de diversidade genética nos quatro grupos de marcadores microssatélites em populações de cativo (DNOCS e PPV) e selvagens (RDSM e RDSFB) de *Arapaima gigas*..... 104

Tabela 2. Resultados da Análise de Variância Molecular (AMOVA) para os quatro grupos de locos de microssatélites em populações de cativo e selvagens de *Arapaima gigas* da Amazônia brasileira..... 105

Tabela S1. Valores obtidos para os índices de diversidade genética e da Estatística-*F* para os quatro grupos de locos de microssatélites em populações de cativo e selvagens de *Arapaima gigas* da Amazônia brasileira..... 107

Conservação genética do peixe neotropical *Arapaima gigas* (Schinz, 1822) (Osteoglossidae: Actinopterygii) da bacia amazônica

Carlos Henrique dos Anjos dos Santos

CAPÍTULO I

ESTADO DO CONHECIMENTO

À Guisa de Introdução

A região amazônica se formou na época da Pangéia (com a África na parte central) e ao longo das eras geológicas foi adquirindo sua forma atual. Atualmente, é nesta região que se encontra a maior floresta tropical úmida (Porto, 2001) e o maior rio de água doce do planeta (Salati, 1985). A diversidade de ambientes, de espécies de animais e vegetais, tornaram a região conhecida mundialmente e essa visualização proporcionou um maior interesse por parte da comunidade científica internacional (Val, 2004).

Os olhos do mundo todo também estão voltados para a bacia amazônica em função de sua grandeza; a Amazônia sul-americana ocupa uma área de 7.800.000 km² (Ardura et al. 2010) e tem sua distribuição espalhada pelos seguintes países: Brasil, Bolívia, Peru, Equador, Colômbia, Venezuela, Suriname, Guiana e Guiana Francesa (Figura 1). Em escala geográfica sua dimensão equivale a 1/20 da superfície terrestre, cerca da metade da superfície da Europa e 2/5 da América do Sul. No que se refere à Amazônia Legal brasileira, essa corresponde a quase 60% do território nacional, com uma superfície de aproximadamente 5 milhões de km², possui 78% da cobertura vegetal do país e está distribuída em oitos estados da federação: Acre, Amapá, Amazonas, Mato Grosso, Pará, Rondônia, Roraima, Tocantins e a maior parte do Maranhão (Albagli, 2001; Ardura et al. 2010) (Figura 1).

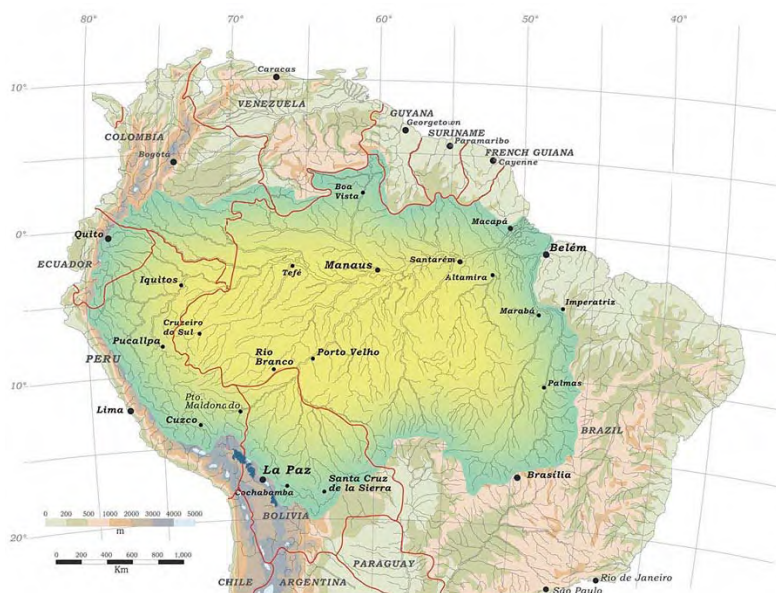


Figura 1. Mapa da bacia Amazônica com sua distribuição nos países da América do Sul (Amazônia Sul-Americana) e no território brasileiro (Amazônia Legal brasileira) (Fonte: USAID, 2005).

A Amazônia brasileira possui uma bacia hidrográfica com cerca de 6.112.000 km² e é composta por um emaranhado de cursos d'água, pequenos igarapés, rios e lagos que desembocam no rio Amazonas (Salati, 1985), formando a maior bacia hidrográfica do globo, com uma drenagem superior a 5,8 milhões de km². Diante disso, encontramos na bacia amazônica cerca de 23.000 km de rios navegáveis, possibilitando o desenvolvimento do transporte hidroviário. O principal rio da bacia amazônica nasce no Peru, onde tem o nome de Vilcanota, recebendo em seguida as seguintes denominações: Ucaiali, Urubamba e Marañon. Em território brasileiro o rio recebe o nome de Solimões e, ao se encontrar com o rio Negro passa a se chamar rio Amazonas (Salati 1985).

Nos últimos anos a Amazônia vem ganhando visibilidade mundial, o que a coloca como uma região ou área geopolítica de grande importância estratégica, e este fato se deve, sem dúvida, à sua dimensão continental e à sua variada riqueza natural. Tal projeção internacional proporcionou que essa região fosse vista com mais atenção no que

se refere ao habitat natural, cujo processo de degradação estaria comprometendo o equilíbrio ecológico do planeta, e como reserva de valor futuro, porque vem se destacando como promissor o uso do seu vasto e rico recurso genético. Porém, uma das preocupações eminentes reside no alto risco de extinção de uma grande variedade de espécies.

Biodiversidade na Amazônia

O termo biodiversidade foi criado há 25 anos no “*National Forum of Biodiversity*” realizado na cidade de Washington (EUA), no período de 21 a 24 de setembro de 1986, com patrocínio da Academia Nacional de Ciências dos Estados Unidos. A partir daí o termo biodiversidade foi definido como sendo toda variação de base hereditária, em todos os níveis de organização biológica, desde genes pertencentes a uma simples população local, até espécies que compõem toda ou parte de uma comunidade local, bem como as próprias comunidades que compõem as partes vivas dos mais variados ecossistemas do nosso planeta (Wilson, 1997). Segundo Albagli (2001), podemos ainda incluir no conceito de biodiversidade os produtos da evolução orgânica, ou seja, toda a vida biológica do planeta, nos seus diferentes níveis – desde genes até espécies ou ecossistemas completos – bem como a sua capacidade de reprodução. Em síntese, podemos definir biodiversidade como sendo um conjunto de todos os seres vivos com toda sua variabilidade genética.

Acredita-se que a biodiversidade apresenta um amplo potencial, e pode vir a ser uma vantagem comparativa do país no âmbito da geopolítica global, quando levamos em conta a sua ampla disponibilidade de recursos genéticos, a sua tradição em ciência na área biológica, além de um imenso acervo de conhecimentos tradicionais acumulados pelas populações locais e pertinentes para o acesso à natureza e suas aplicações (Albagli, 2001). Diante disso, o Brasil é tido como um país de megadiversidade em termos mundiais, tanto em número de espécies quanto em níveis de endemismo (espécies presentes apenas ou quase somente em determinados locais). Segundo Kerr et al. (2001),

áreas com uma imensa variedade de espécies endêmicas são chamadas convencionalmente de *hotspots* e esses habitats nos últimos anos vêm sofrendo com as modificações causadas pelo homem, o que pode levar à extinção de espécies que vivem exclusivamente nestes locais.

De acordo com USAID (2005), a Amazônia brasileira contém 2.000 espécies de peixes, 550 espécies de reptéis (sendo 62% endêmicas), 950 espécies de pássaros e 350 mamíferos (incluindo 57 primatas). A porção Andina da bacia amazônica apresenta uma alta diversidade e quando consideramos essa região Andina com o restante da bacia amazônica observamos que temos em torno 50.000 espécies de plantas vasculares (40% endêmica), 1.666 espécies de pássaros (CEPF, 2000) e 2,5 milhões de espécies de artrópodes (insetos, aranhas, centopéias, etc.). Segundo Kress et al. (1998), existe na Amazônia uma alta diversidade de espécies e endemismo. Vale salientar que a Amazônia abriga uma das últimas extensões contínuas de florestas tropicais úmidas da Terra, detendo cerca de 1/3 dos estoques genéticos planetário conhecidos, sendo que existe ainda uma grande variedade de espécies a serem descobertas que ainda não foram catalogadas.

Diante dessa vasta riqueza biológica, a Convenção da Diversidade Biológica (CDB) estabeleceu três pilares para esses recursos biológicos: (1) a conservação da biodiversidade; (2) seu uso sustentável; e (3) a distribuição justa e equitativa dos benefícios oriundos desse uso sustentável. Com esses três pilares ficou estabelecida a melhor forma de proteção da biodiversidade e seu uso racional e sustentável de modo a promover a sua conservação, contemplando, evidentemente, a repartição dos benefícios (Albagli, 1998). Contudo, é sabido que não existem sinais de partilha justa e equitativa dos benefícios oriundos do uso sustentável da biodiversidade existente na Amazônia como um todo. Segundo Agostinho et al. (2005), a preocupação com a biodiversidade brasileira tem crescido acentuadamente nas últimas duas décadas, acompanhada pela proliferação de organizações conservacionistas e pela legislação ambiental.

Diversidade da ictiofauna na América do Sul e, em especial, da bacia Amazônica

O número de espécies de peixes nos ecossistemas aquáticos continentais brasileiros ainda é impreciso e difícil de ser estimado (Agostinho et al. 2005). Porém, estudos amplos sobre a diversidade e distribuição da ictiofauna no mundo (Lévêque et al. 2008) e na América do Sul (Figura 2) (Barlleta et al. 2010) foram realizados com o intuito de se estimar a ictiofauna nos grandes biomas do globo. Segundo Buckup et al. (2007), o Brasil é líder em número de peixes de água doce, com cerca de 2.122 espécies catalogadas (21% das espécies do mundo), e somente na Amazônia são estimadas aproximadamente 2.416 espécies, e destas 2.072 são endêmicas (Lévêque et al. 2008) da região. São descritas cerca de 4.164 espécies somente para a região Neotropical (Reis et al. 2003, com base no FishBase), porém, estimativas mais recentes sugerem que existem aproximadamente 6.000 espécies em rios e lagos da região Neotropical (Oliveira et al. 2009). Segundo Lévêque et al. (2008), a grande maioria dos peixes neotropicais da América do Sul pertence a cinco grupos dominantes: Characiformes (1.500 espécies descritas, com expectativa para 2.000 espécies), Siluriformes (1.400 espécies com probabilidade para 2.000), Gymnotiformes (180 espécies), Cyprinodontiformes (400 espécies) e Ciclídeos (450 espécies).

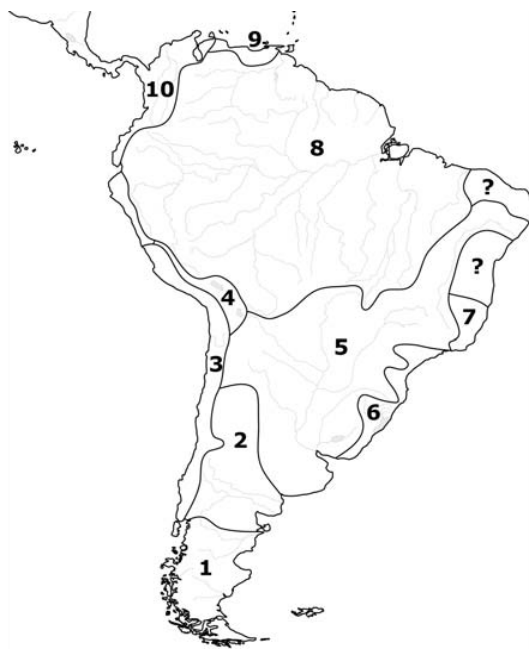


Figura 2. Distribuição da ictiofauna em suas respectivas ecoregiões na América do Sul (Lévêque et al. 2008). 1 - Sul da Patagônia (12 espécies e 1 endêmica), 2 - Norte da Patagônia (23 espécies e 5 endêmicas), 3 - Sul da Trans-Andina (19 espécies e 13 endêmicas), 4 - Lago de Titicaca (32 espécies e 30 endêmicas), 5 – bacia do Paraná e São Francisco (847 espécies e 517 endêmicas), 6 - Sudeste brasileiro (194 espécies e 90 endêmicas), 7 - Oeste brasileiro (131 espécies e 50 endêmicas), 8 - bacia Amazônica (2.416 espécies e 2.072 endêmicas), 9 - Norte da Venezuela (61 espécies e 9 endêmicas) e 10 - Norte da Trans-Andina (423 espécies e 326 endêmicas).

Somente para a região amazônica estima-se um número entre 2.000 (USAID, 2005; Winemiller et al. 2003) e 3.000 espécies de peixes que ocorrem nos 1.000 tributários do rio Amazonas (Ardura et al. 2010) (Figura 3). Mesmo com essa elevada quantidade de espécies de peixes de água doce no Brasil, estimativas apontam que 30 a 40% da fauna de peixes neotropicais de água interiores ainda não foram descritas, podendo esse número atingir cerca de 5.000 (Lundberg et al. 2000; Reis et al. 2003) a 8.000 (Lévêque et al. 2008; Lundberg et al. 2000; Schaefer, 1998) espécies para as águas interiores brasileiras. Essas estimativas são reforçadas quando levamos em consideração que aproximadamente 400 novas espécies de peixes são descritas a cada década em águas

continentais (Agostinho et al. 2005) e 800 novas espécies foram descritas nas duas últimas décadas para América do Sul (Vari e Malabarba, 1998). Contudo, há uma expectativa da existência de um endemismo exacerbado nas cabeceiras dos rios (Menezes, 1996), uma região ainda pouco amostrada e cujo desconhecimento é um dos principais indutores das estimativas elevadas de número de espécies para a região. Vari e Malabarba (1998) ressaltaram que um eventual aumento de 50% na riqueza de peixes do mundo levaria a uma estimativa de aproximadamente 33.000 espécies. Em um contexto mais atual, os peixes neotropicais contribuem com 24% do total de peixes existentes no planeta, representando 13% da biodiversidade total dos vertebrados, embora ocorram em menos de 0,003% (por volume) dos ecossistemas aquáticos do mundo (Agostinho et al. 2005). Piorski et al. (2008) relataram que é altamente importante entender como é gerada e mantida a biodiversidade de peixes de água doce neotropical, uma vez que os habitats estão sendo transformados pelo desenvolvimento humano e as comunidades de peixes têm sido intensamente exploradas como alimento de sustentação desse crescimento populacional.

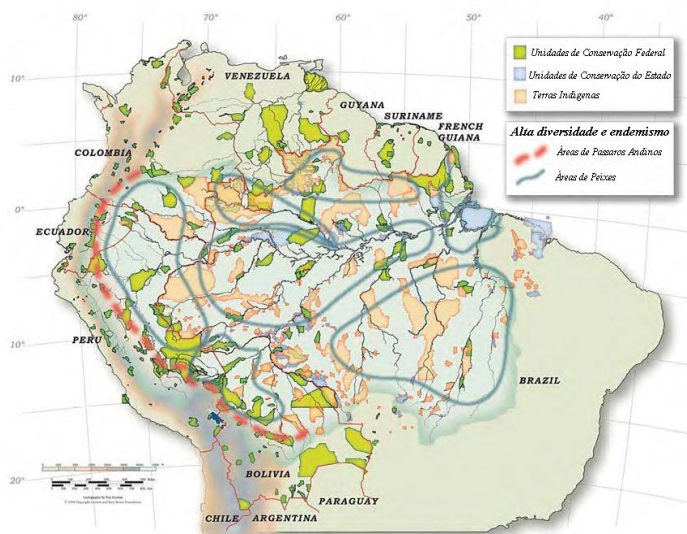


Figura 3. Localização de áreas protegidas e centros de diversidades e endemismo para os peixes da bacia Amazônica (Fonte: USAID, 2005 - Modificado).

Pirarucu

O pirarucu (*Arapaima gigas*) (Figura 4) é o maior peixe de escamas do mundo (Alfaro et al. 1999), sendo considerado o maior “fóssil vivo” da Terra. Pertence a um dos grupos mais antigos de teleósteos, os quais surgiram durante o período Jurássico (165 milhões de anos atrás), possivelmente na Pangea (Venturieri e Bernadino, 1999). A espécie *A. gigas* é endêmica da bacia amazônica; seus exemplares podem alcançar três metros de comprimento e pesar mais de 200 kg na natureza (Alfaro et al. 1999; Castello, 2004). Habitando lagos de várzea e florestas inundadas (Castello, 2008), o pirarucu foi a primeira espécie de peixe amazônico a apresentar sinais de sobreexploração (Viana et al. 2007), com uma diminuição significativa de sua captura em meados de 1970, quando passou a ser considerada extinta comercialmente nas principais cidades da região amazônica, chegando a desaparecer completamente em algumas áreas (Goulding, 1980). Posteriormente, com a diminuição da pesca, a espécie reapareceu, mas continuou ameaçada.

A principal fonte de ameaça ao pirarucu está na crescente utilização de modernos métodos de pesca que acabam implicando no declínio das populações (Castello, 2004) de ambientes naturais. Diante disso, a espécie foi incluída pela **International Union for Conservation of Nature** (IUCN) na lista vermelha de espécies ameaçadas de extinção (Amaral, 2009; Ortiz et al. 2007) e classificada no Apêndice II da CITES (Convention on International Trade of Endangered Species of Wild Fauna and Flora), que lista as espécies que não necessariamente estão sujeitas a extinção, mas que podem vir a se tornar extintas, caso o comércio não seja controlado (Viana et al. 2007). Segundo Oliveira et al. (2005), o pirarucu pode sim ser uma espécie considerada em perigo de extinção.



Figura 4. Exemplar de *Arapaima gigas*. (Fonte: Arantes, 2009).

Adaptação do pirarucu à respiração aérea

Muitos peixes respondem à diminuição do oxigênio dissolvido na água nadando em direção a superfície aquática com o intuito de absorver bolhas de ar pela boca, sendo esta uma forma encontrada por eles para melhor suprir a demanda de oxigênio. Essa necessidade de respirar oxigênio atmosférico passou a ocorrer em função da quantidade de oxigênio dissolvido na água e da temperatura, pois a dissolução do oxigênio na água é inversamente proporcional ao aumento da temperatura e a taxa de consumo de oxigênio aumenta com a temperatura (Schmidt-Nielsen, 2002).

Diante disso, uma grande diversidade de peixes amazônicos desenvolveu adaptações para obter oxigênio atmosférico e com isso resistir melhor à baixa disponibilidade de oxigênio dissolvido nos ambientes lacustres. Neste contexto, o pirarucu é uma espécie que se destaca por apresentar respiração aérea obrigatória, com subidas regulares à superfície aquática para renovar o ar de sua bexiga natatória vascularizada, onde ocorre a troca gasosa (Almeida-Val e Val, 1990; Brauner e Val, 1996). Em geral, peixes de respiração aérea apresentam uma área branquial menor e as lamelas branquiais são mais espessas, de modo que, em algumas espécies, as brânquias não participam da captação do oxigênio, a qual fica a cargo dos pulmões ou de outros órgãos que auxiliam na respiração (brânquias, pele, boca e cavidades operculares, estômago, intestino, bexiga natatória e pulmão) (Baldisserotto, 2002).

O pirarucu apresenta anatomicamente um sistema branquial com relativo grau de atrofia, o que torna a troca gasosa por esse órgão insuficiente para captura e

abastecimento de oxigênio para a grande biomassa corporal que essa espécie apresenta, sendo que esse suprimento de oxigênio é compensado pela bexiga natatória altamente vascularizada. A bexiga natatória dessa espécie se destaca por apresentar numerosos vasos sanguíneos, se assemelhando a um pulmão, e dessa forma se tornou o principal órgão respiratório desse animal. Essa modificação na bexiga natatória proporcionou com que a parede interna desenvolvesse um abundante sistema de tecido vascular, contribuindo para aumentar a superfície que serve de intercâmbio entre os gases do ar atmosférico e o da corrente sanguínea circundante nos capilares, assim como ocorre nos pulmões (Alfaro et al. 1999). Essa anatomia da bexiga natatória proporcionou um ganho na capacidade de trocas gasosas, já que este órgão ocupa totalmente a parte dorsal da cavidade abdominal até a faringe.

Porém, devido a essa adaptação os indivíduos adultos de pirarucu não conseguem permanecer por muito tempo submersos, ficando no máximo 40 minutos, o que só ocorre quando é perseguido por pescadores, pois normalmente a espécie sobe à superfície aquática para tomada de ar em intervalos que variam de 10 a 15 minutos. Juvenis conseguem realizar esta atividade com maior frequência. Alevinos de pirarucu medindo 2,5 cm de comprimento fazem a tomada de ar na superfície em um ritmo de 2 a 3 segundos, aos 5 cm a cada 6 a 8 segundos e aos 8 a 10 cm em intervalos de 1 minuto ou mais (Alfaro et al. 1999).

Segundo Ryman (1991), a habilidade de uma espécie ou população de se adaptar a um determinado ambiente é inteiramente dependente de suas características genéticas e os alelos que esses indivíduos carregam com suas combinações e frequências estão diretamente relacionados a essa adaptação. Ironicamente, as características genéticas que dão ao pirarucu a capacidade de adaptar-se a ambientes pobre em oxigênio dissolvido, tornam essa espécie vulnerável aos pescadores, que os esperam subir à superfície para arpoá-lo (Veríssimo, 1895).

Reprodução do pirarucu

Uma das dificuldades encontradas na produção comercial do pirarucu encontra-se na produção de alevinos em cativeiro, visto que não existe um controle sobre a reprodução da espécie (Monteiro, 2005; 2010). Além disso, o *A. gigas* possuem hábitos reprodutivos peculiares, como a desova parcelada, baixa fecundidade relativa, formação de casais monogâmicos, construção de ninho (em águas com pouca movimentação), isolamento de área para desova e proteção dos ovos e larvas pelos machos contra predadores (Fontenele, 1948; Imbira, 2001; Godinho et al. 2010). O pirarucu é uma espécie que não realiza migração reprodutiva (Hoar, 1969), chegando a maturidade sexual com 4 a 5 anos de vida (Fontenele, 1948; Graef, 1995). Segundo Fontenele (1948), fêmeas medindo 1,90 m de comprimento total pode chegar a produzir 180.505 oócitos em diferentes estágios de desenvolvimento.

Estudos mostram que os efeitos denso-compensatórios podem influenciar a idade da primeira maturação sexual e a fecundidade dos peixes, e no caso do pirarucu a baixa densidade de estocagem tende a diminuir as taxas de crescimento populacional, atrasando consequentemente a maturidade sexual (Arantes, 2009). Pirarucus de ambos os sexos apresentam somente uma única gônada, localizada na parte lateral-esquerda da cavidade celomática abdominal (Godinho et al. 2005; Lopes e Queiroz, 2009).

Pesca do pirarucu

Os recursos pesqueiros na Amazônia são explorados de forma concentrada com a captura de poucas espécies (Bayley e Petrere, 1989) de valor comercial. Dentre as espécies, podemos destacar o pirarucu, um peixe comumente encontrado em ambientes de várzeas, rios lânticos e em grandes lagos (Oliveira et al. 2005). Considerado um peixe nobre, o pirarucu é uma espécie de alto valor comercial na bacia amazônica, tanto em termos de consumo como de comércio, apresentando, nos últimos anos, uma alta demanda no mercado consumidor dentro e fora da Amazônia (Marmontel, 2006). Devido

a essa grande importância a espécie *A. gigas* acabou sofrendo com a pressão da pesca seletiva, o que acabou ocasionando uma diminuição nos seus estoques naturais (Amaral, 2009).

Como mencionado anteriormente, o pirarucu foi a primeira espécie de peixe amazônico a apresentar nítidos sinais de sobreexploração (Viana et al. 2007) e chegou a desaparecer em algumas áreas (Goulding, 1980). Para Castello (2004), uma das principais ameaças às populações de pirarucu é a crescente utilização de modernos métodos de pesca que acabam implicando no aumento da captura e declínio das populações nos ambientes naturais. Segundo Baca (2001), as principais artes de pesca utilizadas na captura do pirarucu são: arpões, redes, cerco e anzóis com isca.

Um exemplo da diminuição do estoque pesqueiro na natureza para essa espécie foi relatado em meados de 1996 quando a produção atingiu 207,5 toneladas em comparação com o ano de 1984 quando a produção foi de 1.751 toneladas, respectivamente (Venturiere e Bernadino, 1999). Essa queda da produtividade é justificada pela ação ou atividade da pesca predatória, que ameaça a sobrevivência dos exemplares de pirarucu na região Amazônica (Imbiriba, 1991). Segundo Queiroz (1999), a pesca de pirarucu chega a representar quase 50% de todo o pescado capturado na Reserva de Desenvolvimento Sustentável de Mamirauá, constituindo-se como o principal recurso pesqueiro para as comunidades próximas da reserva.

De acordo com Ríos (2004), a pesca do pirarucu deveria ser orientada de forma a disponibilizar este recurso, controlando os tipos e a quantidade de artes e métodos de pesca, determinar o tamanho mínimo de captura, estabelecer cotas para captura de exemplares, determinar os lugares e período para a pesca. Tais medidas poderiam ser utilizadas como ferramentas estratégicas para a formação de Unidades de Pesca Comunitárias, com o objetivo de estabelecer medidas de ordenamento e manejo das pescarias, proporcionando com isso uma alternativa de desenvolvimento integral das comunidades que estivessem assentadas no entorno da área de pesca ou da reserva de desenvolvimento sustentável (RDS).

Vale salientar que em 1989 o Instituto Brasileiro de Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) determinou que o tamanho mínimo de captura para o pirarucu fosse de 1,5 m de comprimento total e, no ano seguinte foi implementado o período do defeso reprodutivo, que compreende o período de 1º de dezembro a 31 de maio, quando a espécie está em fase reprodutiva. A partir do ano de 1996, o IBAMA do Estado do Amazonas proibiu a pesca do pirarucu, com exceção das áreas de pesca manejada e produção em cativeiro (Arantes et al. 2006; 2007). Porém, o que se observa é que os estoques de pirarucus continuam sendo explorados de forma desordenada, apesar dos esforços das instituições reguladoras em propor medidas que possa trazer um manejo mais sustentável à espécie.

O cultivo de pirarucu

A piscicultura é uma modalidade da aquicultura que pode proporcionar uma excelente atividade econômica (Garutti, 2003). Neste contexto, podemos destacar a espécie *A. gigas* que apresenta as melhores expectativas para criação em regime intensivo na região amazônica (Cavero et al. 2003c). As principais características que tornam o pirarucu como espécie candidata à criação em cativeiro são: velocidade de crescimento (Imbira, 2001), respiração aérea obrigatória (Fontenele, 1955; Brauner et al. 2006), aceitação de ração extrusada (Crescêncio, 2001), tolerância a altas taxas de densidade (Cavero, 2002) e rusticidade ao manuseio.

Diante dessas vantagens apresentadas pela espécie, vários estudos foram desenvolvidos com o objetivo de melhor entender e expandir os conhecimentos sobre a espécie quando manejadas em cativeiro. Estes estudos mostraram que juvenis de pirarucu apresentam associação gregária que podem favorecer o estabelecimento de classes hierárquicas, o que aumentaria a heterogeneidade do lote de cativeiro, podendo resultar em agressões (Cavero et al. 2003b). O cultivo em tanques rede de 1 m³ apresenta uma biomassa de sustentação para o pirarucu de 29 kg/m³ (Cavero et al. 2003c), porém, essa baixa biomassa de sustentação se deve ao crescimento em comprimento do pirarucu ser

maior do que o seu ganho em peso (Alcântara e Guerra, 1992). A utilização de alimento vivo no início do treinamento alimentar de juvenis de pirarucu se mostrou eficaz (Cavero et al. 2003a) como atrativo alimentar para aceitação de alimentos à base de ração seca (Crescêncio, 2001). No que corresponde ao manejo alimentar, o mais indicado para a criação intensiva corresponde ao período diurno, porém, juvenis dessa espécie apresentam preferência alimentar no período noturno, mais especificamente no início da noite (Crescêncio et al. 2005). Estudos sobre fatores estressantes associados às atividades de rotinas em piscicultura mostraram que há alterações nos parâmetros metabólicos quando a atividade de manejo é mais intensa, podendo essas alterações serem reduzidas com a adoção de boas práticas de manejo (Brandão et al. 2006). Segundo Tavares-Dias et al. (2007), parâmetros hematológicos e bioquímicos são importantes ferramentas para o monitoramento das condições nutricionais e do estado de saúde dos peixes em cativeiro. Cavero et al. (2004) verificaram que juvenis de pirarucu apresentam grande tolerância às altas concentrações de amônia na água de cultivo. Essa tolerância pode estar relacionada ao desenvolvimento de estratégias para suportar níveis elevados de compostos nitrogenados na água (Adams et al. 2001), que no caso do pirarucu seria a respiração aérea obrigatória (Brauner e Val, 1996), ocasionada pelo atrofiamento das brânquias, órgão responsável pela difusão passiva desses compostos, quando o gradiente de concentração é favorável (Hargreaves e Kucuk, 2001). No que concerne aos estudos nutricionais, observaram-se que juvenis de pirarucu digerem melhor gordura insaturada em comparação às saturadas, porém, a relação energia e proteína podem afetar a digestibilidade dos nutrientes (Ono et al. 2008).

Dessa forma, os estudos acima relatados trouxeram conhecimentos básicos de suma importância para o manejo da espécie, e hoje são essenciais para a manutenção do pirarucu em cativeiro. Contudo, é importante ressaltar que mais estudos são necessários para que tenhamos um pacote tecnológico fechado para o *A. gigas*, e que os estudos relatados precisam ser continuados, bem como novos estudos referentes às informações genéticas.

Estudos genéticos com *Arapaima gigas*

Atualmente existem muitos estudos genéticos populacionais realizados com peixes, porém, poucos são os estudos que abordam as espécies neotropicais, particularmente as espécies de ocorrência da bacia Amazônica. No entanto, nos últimos anos temos observado um aumento nas publicações relacionadas com as espécies neotropicais e, em especial, com as espécies distribuídas na Amazônia brasileira. Neste contexto, destacamos os trabalhos realizados com o *A. gigas* por Farias et al. (2003); Hrbek et al. (2005, 2007); Hrbek e Farias (2008); Santos et al. (2011 in Molecular Ecology Resources Primer Consortium et al., 2011). Entretanto, é importante ressaltar que ainda existe uma lacuna muito grande nos estudos genéticos populacionais em animais selvagens e de cativeiro da Amazônia legal brasileira.

Antes de discorrermos sobre os estudos genéticos já realizados com o pirarucu, três trabalhos merecem destaque por proporcionar o desenvolvimento de ferramentas moleculares para os estudos genéticos populacionais na espécie. Entre esses trabalhos estão os primeiros locos microssatélites desenvolvidos por Farias *et al.* (2003), o desenvolvimento de novos locos microssatélites por Santos *et al.* (2011 in Molecular Ecology Resources Primer Consortium et al. 2011) e o sequenciamento completo do genoma mitocondrial do *A. gigas* por Hrbek e Farias (2008). Devemos salientar também o desenvolvimento de nove marcadores microssatélites para espécie *Heterotis niloticus* (bonytongue africano) (Carrera et al. 2011), a qual pode ser considerada espécie irmã do pirarucu. Estes locos desenvolvidos para *H. niloticus* poderão ser futuramente utilizados em estudos genéticos populacionais no pirarucu por meio da transferibilidade desse marcador entre as espécies, caso esta venha a ser comprovada.

Estudos genéticos populacionais

O primeiro estudo genético populacional para o *A. gigas* foi realizado por Hrbek et al. (2005), e este estudo buscou contribuir com informações genéticas sobre o manejo e

conservação da espécie em seu ambiente natural, pois sabe-se que se trata de uma espécie bastante explorada comercialmente na bacia Amazônica. Segundo Marques (2003), populações de pirarucu na bacia do Tocantins no médio Araguaia/MT apresentam alta variabilidade genética, sendo que essas informações são de grande importância para a implementação de subsídios para programas de manejo, conservação e exploração sustentável da espécie no médio Araguaia/MT.

Hrbek et al. (2007) propuseram que o *A. gigas* forma uma população contínua com grande fluxo gênico entre as localidades estudadas na bacia Amazônica, porém, uma análise de autocorrelação espacial dos dados genéticos e geográficos sugeriram que o fluxo gênico é significativamente restrito a distâncias maiores que 2.500 km. Diante disso, foram sugeridas três estratégias de conservação para o pirarucu na bacia Amazônica que são: (1) preservação da atual diversidade genética; (2) criação de um conjunto de reservas para fornecer imigrantes as populações locais reduzidas; (3) preservação de áreas centrais em várzeas na bacia amazônica das quais diversas outras espécies também dependem. Tais estratégias sugeridas serviriam de modelo para conservação e manejo de metapopulações por meio do padrão doador-receptor, já que o manejo dos exemplares poderia ser realizado entre as reservas de várzea da bacia amazônica superior, central e inferior.

Além disso, Hrbek et al. (2005) propuseram a utilização de um grande grupo de indivíduos como matrizes (fundadores) em pisciculturas, independente de sua origem geográfica, minimizando assim a perda potencial da diversidade genética por meio do efeito fundador. Além disso, foi sugerido que as populações confinadas fossem complementadas com exemplares selvagens de área selecionadas, mantendo-se com isso a diversidade genética máxima nos sistemas de confinamento. Nesta perspectiva, observa-se que já existia uma preocupação como a diversidade genética dos futuros exemplares de pirarucu em cativeiro.

Estudos citogenéticos

Marques et al. (2006) realizaram um estudo citogenético com o cariótipo de pirarucu proveniente do médio Araguaia e detectaram um número de cromossomos equivalente a $2n = 56$ (Figura 5), sendo que destes, 14 pares são meta-submetacêntricos e 14 pares subtelo-acrocêntricos. Um fato importante observado neste trabalho é que não foi detectada diferença cromossômica associada ao sexo no pirarucu.

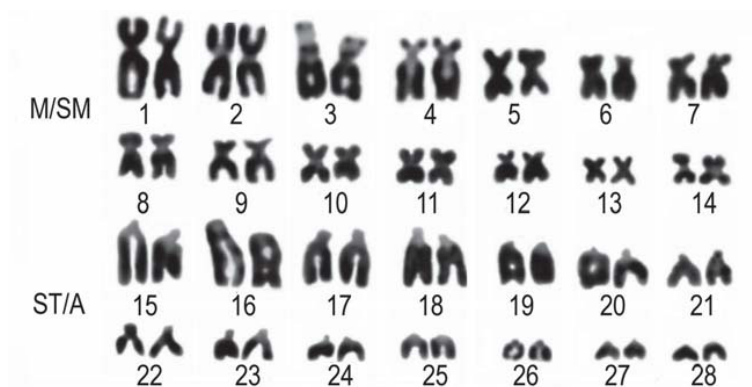


Figura 5. Cariótipo do *Arapaima gigas* do rio Araguaia, Mato Grosso. (Fonte: Marques, 2003; Marques et al. 2006).

Estudos filogenéticos

Um estudo realizado sobre a filogenia do Osteoglossidae (Li et al. 1997), mostra a ocorrência da extinção de seis gêneros; *Chandlerichthys* (Grande, 1986), *Cretophareodus* (Li, 1996), *Joffrichthys* (Li e Wilson, 1996), *Laelichthys* (Santos, 1985), *Phareodus* (Cope, 1871) e *Sinoglossus* (Su, 1986). Atualmente apenas quatro gêneros dessa família (Newbrey e Bozek, 2000) estão distribuídos pelos continentes do planeta mantendo sete espécies: *Arapaima gigas* (Amazônia, América do Sul), *Heterotis niloticus* (África Ocidental e do Nilo), *Osteoglossum bicirrhosum*, *O. ferreirai* (Amazônia, América do Sul), *Scleropages formosus* (Sudeste da Ásia), *S. jardinii* (Norte da Austrália e Nova Guiné) e *S. leichardti* (Leste da Austrália) (Kumazawa e Nishida, 2000; Nelson, 2006;

Yue et al. 2006) (ver mapa de distribuição dos Osteoglossidae descrito por Lévêque et al. 2008 adaptado de Berra, 2001; Figura 6).



Figura 6. Distribuição geográfica da família Osteoglossidae (descrito por Lévêque et al. 2008 adaptado de Berra, 2001).

Baseando-se em um estudos de filogenia molecular, Kumazawa e Nishida (2000) sugeriram que os Osteoglossiformes tenham se divergido de uma posição basal da linhagem dos teleósteos, e que o heterotídeos (aruanã do Nilo e o pirarucu) formam um grupo irmão com o osteoglossídeos (aruanãs da América do Sul, Australásia e Sudeste Asiático), sendo que o aruanã asiático é mais estreitamente relacionado com os aruanãs da Australásia do que com os Sul-Americanos. Segundo Lundberg (1993), a separação da linhagem *Arapaima* e *Heterotis* originou-se no final da separação da África e América do Sul. Kumazawa e Nishida (2000) encontraram uma distância molecular entre os aruanãs asiáticos e australianos muito maior do que era esperado, já que se trata de espécies que pertencem ao mesmo gênero.

Dessa forma, partindo de evidências moleculares e geológicas, Kumazawa e Nishida (2000) propuseram um novo modelo pelo qual a vicariância do aruanã asiático provavelmente tenha ocorrido por divergência do aruanã da Australásia a partir da margem oriental da Gondwana e, com isso, uma possível migração pode ter ocorrido em

direção a Eurásia no subcontinente indiano ou nos blocos continentais menores. Lavoué e Sullivan (2004) sugeriram que a superordem Osteoglossomorpha forme um grupo monofilético, sendo essa hipótese filogenética embasada em dados de cinco genes moleculares (Figura 7). Para Lundberg et al. (2010), uma apreciação significativa da ancestralidade dos peixes, requer uma familiaridade com a moderna ictiofauna.

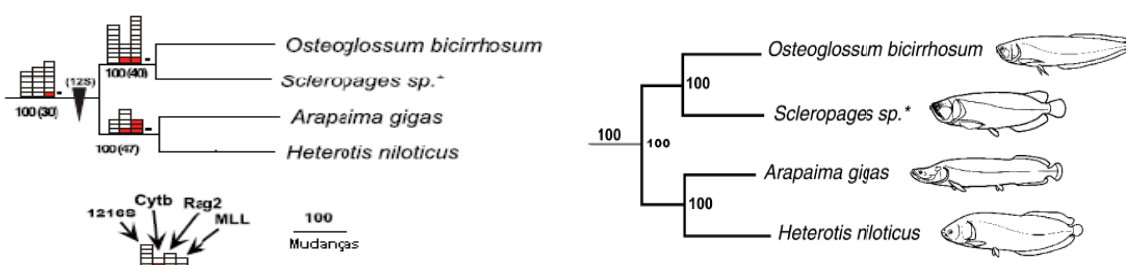


Figura 7. Relação filogenética dentro da superordem osteoglossomorpha baseada na hipótese monofilética sugerida por Lavoué e Sullivan (2004) com modificações.

Marcadores moleculares

Marcadores moleculares podem ser definidos como sendo qualquer fenótipo molecular oriundo de uma região gênica ou de um fragmento de DNA (Avisé, 2004). Estes marcadores genéticos são identificados como aquelas características que podem ser acompanhadas através das gerações (Porto-Foresti e Foresti, 2004). Dessa forma, para que um marcador seja considerado um marcador genético é necessário que ele siga os padrões de herança mendeliana. Neste contexto, um marcador genético ideal seria aquele que distinguisse locos com alelos co-dominantes, não fornecendo valores ambíguos e apresentando preferivelmente alta variação (Queller et al. 1993).

Portanto, os marcadores constituem uma ferramenta indispensável para determinar a variação genética e a biodiversidade com um alto grau de precisão e reprodutibilidade (Arif e Khan, 2009). Neste contexto, diversos marcadores genéticos estão disponíveis para a análise dos organismos, sendo que cada um apresenta

características próprias que os tornam mais adequados à resolução de uma ou outra questão específica em genética da conservação (Perez-Sweeney et al. 2003) e de populações. Segundo Porto-Foresti e Foresti (2004) é de fundamental importância o aperfeiçoamento dos métodos bem como o aprofundamento dos estudos nas áreas de biologia e genética de peixes para que sistemas mais adequados de manejo genético dos estoques confinados e das populações naturais possam ser desenvolvidos e aplicados. Diante disso, dois tipos de marcadores moleculares se destacam: os microssatélites e os SNPs – Polimorfismos de Simples Nucleotídeos . Nas figuras 8 e 9 está representada, esquematicamente, a evolução da importância relativa dos marcadores moleculares ao longo das últimas décadas (Figura 8), em particular dos microssatélites e SNPs (Figura 9).

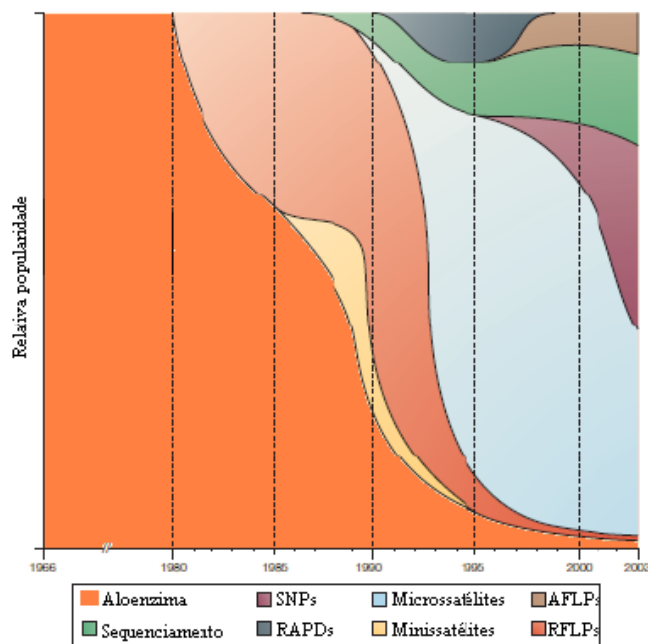


Figura 8. Revisão subjetiva da relativa importância de diferentes marcadores moleculares entre os anos de 1966 a 2003 (Schlötterer, 2004 - Modificado).

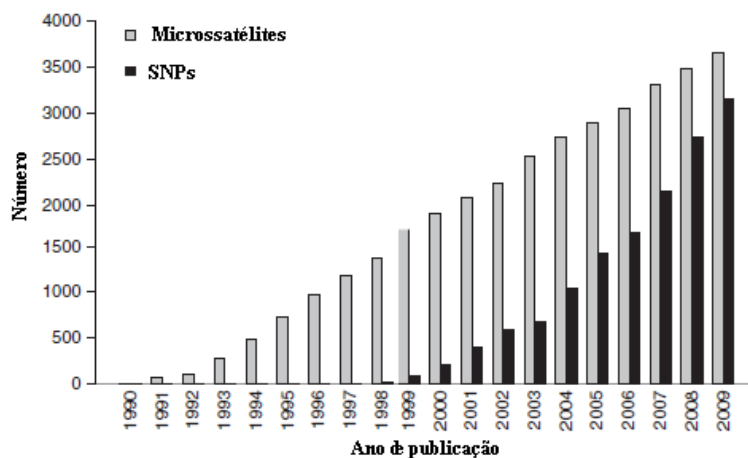


Figura 9. Evolução dos números de estudos relacionados aos principais marcadores moleculares utilizados atualmente. (Fonte: Guichoux et al. 2011 - Modificado).

Microsatélites

Os microsatélites são marcadores moleculares bastante populares e sua crescente aplicabilidade vem sendo impulsionada nos últimos anos devido aos avanços técnicos, e à sua versatilidade e baixo custo. Além disso, as novas tecnologias de sequenciamento de última geração permitiram a identificação de um grande número de locos microsatélites a um custo reduzido para espécies não-modelos (Guichoux et al. 2011), algo praticamente impossível há alguns anos atrás.

Os microsatélites são sequências simples repetidas em tandem de 1-6 (Tautz, 1993) ou 2-6 (Chambers e MacAvoy, 2000) pares de bases, sendo altamente polimórficos, abundantes e razoavelmente distribuídos com uniformidade no genoma dos eucariontes (Schlötterer, 2004) e procariontes (Weber, 1990). Além disso, os microsatélites podem ser classificados em três ordens: (1) microsatélites puros, (2) compostos e (3) interrompidos (Jarne e Lagoda, 1996).

Os microsatélites estão predominantemente presentes nas regiões não codificantes do DNA, afetando, por exemplo, a organização da cromatina, recombinação e replicação do DNA, bem como a atividade dos genes (Li et al. 2002). As primeiras

sequências repetidas foram inicialmente identificadas como bandas satélites em gradientes de densidade ultra complexos em genomas de eucariontos, mas agora o termo DNA satélite é aplicado a qualquer conjunto de sequencia repetitiva (John, 1988; Csink e Henikoff, 1998).

As Sequencias Simples Repetidas (SSR) ou microssatélites possuem altas taxas de mutação, numa faixa que varia entre 10^{-3} a 10^{-4} por locos gametas/geração. Essa alta taxa de mutação se deve em grande parte pela instabilidade que surgiu no mecanismo específico de mutação chamado de slippage (deslizamento) da DNA polimerase (Tautz e Schlötterer, 1994) seguida pela falta de reparação (Levinson e Gutman, 1987) ou durante o crossing-over desigual (Wolff et al. 1989). Porém, é evidente que essas mutações que ocorrem nos microssatélites, possuem um padrão bastante complexo (Schlötterer, 2004) que vem sendo estudados nos últimos anos.

Devido à sua elevada taxa de mutação, os microssatélites se tornaram uma alta fonte de variabilidade e um excelente marcador para estudos populacionais (Barker, 2002), parentesco (Queller et al. 1993), filogenia (Zhu et al. 2000), estrutura populacional (Bowcock et al. 1994), DNA código de barra, estudo sobre diversidade genética (Katti et al. 2001), mapeamento genômico, ecologia molecular, conservação genética (Allendorf e Luikart, 2007), identificação de locos envolvidos com doenças genéticas (Barker, 2002), bem como um caminho para seguir a história biológica das populações (Chambers e MacAvoy, 2000). Além disso, a premissa para o uso dos microssatélites como marcadores genéticos é que seus alelos diferem apenas no número de unidades que contém repetição simples (Guyer e Collins, 1993; Zajac et al. 2009) proporcionando uma diversidade alélica substancial em um grande número de locos, com características de herança mendeliana e co-dominância (Litt e Luty, 1989). Segundo Bull et al. (1999), nos microssatélites compostos e imperfeitos existem algumas diferenciações que só podem ser reveladas com o sequenciamento dessas sequências, já que essas diferenciações não alteram o tamanho dos alelos.

Apesar das potencialidades da aplicação dos marcadores microssatélites, ainda existem poucos estudos envolvendo peixes neotropicais. Diante disso, devemos salienta

que tal metodologia não abrangeria somente o manejo genético dos estoques de peixes confinados, mas também a identificação de bancos genéticos naturais, que possibilitariam a utilização destas fontes de variabilidade, na melhoria das espécies cultivadas (Porto-Foresti e Foresti, 2004).

Modelos mutacionais dos microssatélites

Os microssatélites ganham ou perdem unidades repetidas a uma taxa muito elevada. Dois mecanismos mutacionais estão envolvidos para explicar a alta taxa de mutação nos microssatélites, sendo que o primeiro está relacionado com a derrapagem da DNA polimerase (Slippage; ver Schlötterer e Tautz, 1992) durante a replicação do DNA (Tachida e Lizuka, 1992), e o segundo está envolvido com a recombinação do DNA durante o crossing over (Harding et al. 1992). Porém, esses dois mecanismos são dependentes das condições ambientais (Li et al. 2002). O processo de mutação ocasionado pela derrapagem da replicação do DNA, curiosamente é dependente do comprimento dos microssatélites (Dieringer e Schlötterer, 2003; Xu et al. 2000). Essa dependência foi descrita por Dieringer e Schlötterer (2003) e Xu et al. (2000), ao observarem que os alelos com um número de repetições elevado eram menos estáveis do que aqueles com um número de repetições pequeno. Chistiakov et al. (2006) também relataram que os tamanhos das repetições são o maior fator de influência das taxas de mutações nos microssatélites, principalmente nos dinucleotídeos.

Diante disso, três hipóteses para os modelos de mutação dos microssatélites ganharam destaques: (1) o Slipped-Strand Misparing - SSM (português.: *Modelo de Mutação Passo-a-Passo*), (2) o Two-Phases Mutation - TPM (português.: *Modelo de Mutação em Duas Fases*) e (3) Infinite-Allele Model - IAM (português.: *Modelo de Mutação de Alelos Infinitos*).

O modelo de mutação SSM permite que ocorra dentro da matriz dos microssatélites uma perda ou ganho de unidade de repetição (Figura 10A e B). Caso a matriz aumente de tamanho ao longo do tempo, o ganho da unidade de repetição ocorrerá

devido à maior frequência de mutação, ou então à menor frequência da taxa de reparo. No caso da perda de repetição a baixa frequência no reparo (Chambers e MacAvoy, 2000) seria uma das principais causas da perda de sequências repetidas. Além disso, o modelo SSM tem como premissa que os eventos mutacionais envolvam a mudança de uma única repetição (Kimura e Ohta, 1978; revisado por Bell e Jurka, 1997). Outro fato interessante nesse tipo de mutação é a ocorrência do que chamamos de homoplasia, que refere-se aos alelos que apresentam o mesmo número de repetição, porém, com origens diferentes (Chistiakov et al. 2006). Em resumo, alguns estudos têm mostrado que as mutações nos microssatélites têm sido estabelecidas pelo mecanismo de Slipped-Strand Misparing - SSM (Levison e Gutman, 1987; Moxon e Wills, 1999; Eisen, 1999).

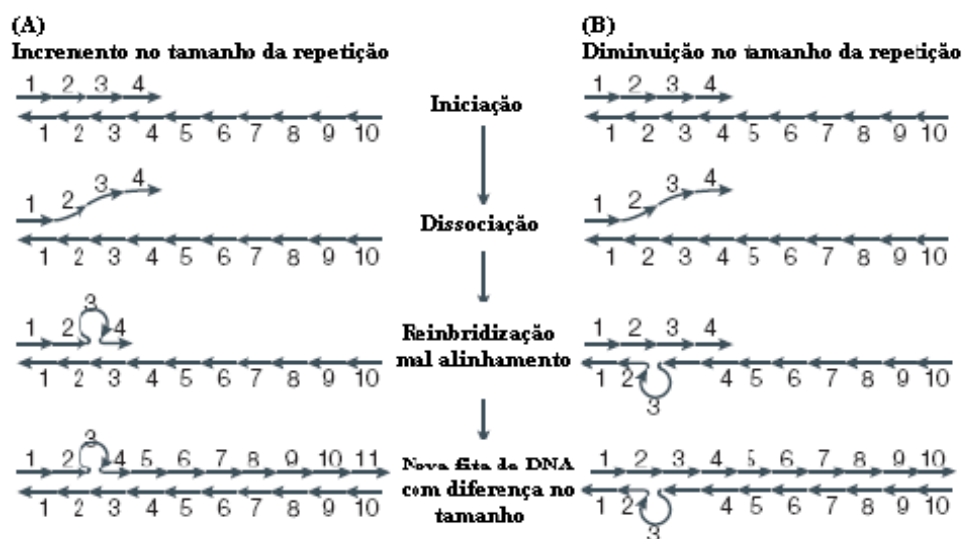


Figura 10. Replicação do DNA repetitivo. A| Após a rehibridização ocorre um mal alinhamento gerando um ganho ou B| perda de uma unidade repetida. (modelo proposto por Ellegren, 2004, com modificações).

O modelo IAM refuta os eventos de homoplasia (Kimura e Crow, 1964), sugerindo que as mutações resultam na criação de novos alelos (Kimura e Crow, 1964; Oliveira et al. 2006). A aplicação desse modelo para locos de microssatélites, sugere que

as mutações alteram o número de repetições (Oliveira et al. 2006). Wright (1965) aplicou bastante esse modelo na estatística F .

Já as mutações ocasionadas pelo modelo TPM envolvem mudanças maiores do que as repetições únicas (di Rienzo et al. 1994), sendo que esse modelo é uma extensão do SSM. Porém, no estado em que muitos eventos mutacionais resultam no incremento ou diminuição nas unidades de repetição, raramente as alterações têm um grande número de repetições ocorrendo (Oliveira et al. 2006).

Possíveis restrições no uso dos microssatélites

Os marcadores microssatélites podem apresentar algumas restrições relacionadas à sua implementação em estudos populacionais, sendo uma delas a presença de possíveis alelos nulos (Dakin e Avise, 2004). Os alelos nulos podem ocasionar problemas na identificação de genótipos heterozigotos, falseando, com isso, a estimativa da taxa de heterozigotos numa determinada população. A existência de alelos nulos é justificada pela ocorrência de mutação na região de anelamento ou hibridização dos *primers* (Callen et al. 1993), ou pode estar relacionada a alelos heterozigotos com tamanhos muito diferentes.

Outro ponto importante está relacionado à homoplasia em microssatélites que ocorre quando um loco apresenta alelos com o mesmo número de repetições, porém, não necessariamente possuem um ancestral comum, podendo ser idênticos apenas pelo simples acaso (Estoup et al. 2002). Dessa forma, a homoplasia pode acabar ocasionando distorções nas estimativas a respeito da diferença entre populações e espécies (Taylor et al. 1999). Hedrick (1999) relatou que o cálculo do F_{ST} em microssatélites altamente polimórficos pode ser subestimado e isso pode acabar influenciando na proporção de heterozigotos em subpopulações quando comparados com a população total.

No âmbito geral, muitas vezes os problemas podem estar relacionados à PCR (Reação em Cadeia de Polimerase), na qual a Taq Polimerase pode causar uma derrapagem durante a PCR e com isso acabar acrescentando uma repetição, o que

distorceria o tamanho do alelo (Ginot et al. 1996; Gill et al. 1997). Mesmo os microssatélites apresentando esses pequenos problemas, eles ainda continuarão sendo um marcador dominante no campo da pesquisa num futuro previsível (Zhang e Hewitt, 2003). A opção de utilizar os marcadores microssatélites no presente trabalho foi, pois, considerada à luz do conhecimento existente na literatura, pesando-se prós e contras da aplicação da metodologia.

Objetivos

Objetivo geral

O objetivo deste estudo foi analisar os níveis de diversidade genética entre exemplares de populações de *Arapaima gigas* (pirarucu) criados em cativeiro, comparando-os com duas populações naturais provenientes das Reservas de Desenvolvimento Sustentável de Mamirauá e Fonte Boa. Além disso, buscou-se verificar a existência de diferenciação genética entre as diferentes populações de cativeiro e populações selvagens, com o intuito de propor medidas de manejo reprodutivo entre os grupos de pirarucu analisados.

Objetivos específicos

(1) Validar novos locos microssatélites isolados para o *A. gigas*, verificando o grau de polimorfismo e diversidade genética;

(2) Determinar a diversidade genética de populações de pirarucu mantidas em cativeiro, comparando-as com duas populações naturais provenientes de Reservas de Desenvolvimento Sustentável do Estado do Amazonas;

(3) Identificar a ocorrência de diferenciação genética entre as populações de pirarucu de cativeiro e selvagens;

(4) Avaliar a ocorrência de estruturação genética nas populações de pirarucu;

(5) Determinar a existência de gargalo populacional devido ao efeito fundador nas populações de cativeiro;

(6) Identificar possíveis locos *outlier* que possam estar relacionados com a adaptação dos animais ao cativeiro, comparando-os com as populações das Reservas de Desenvolvimento Sustentável;

(7) Determinar quantos locos são necessários para um estudo genético-populacional em pirarucus de cativeiro, selecionando os locos mais informativos.

Material e Métodos

Obtenção das amostras de pirarucu

Amostras da natureza ou selvagens

Amostras de pirarucu selvagens foram obtidas de duas Reservas de Desenvolvimento Sustentável do estado do Amazonas: A Reserva de Desenvolvimento Sustentável de Mamirauá - RDSM (25 amostras) localizada no município de Tefé, AM; e a Reserva de Desenvolvimento Sustentável de Fonte Boa - RDSFB (18 amostras) no município de Fonte Boa, AM (Figura 11). As amostras de tecidos foram coletadas e acondicionadas em tubos eppendorf de 1,5 mL em álcool 75% e estocadas em freezer - 80°C no Laboratório de Ecofisiologia e Evolução Molecular (LEEM) do Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia (INPA), Manaus, Brasil.

Amostras de cativeiro

Amostras de cativeiros foram obtidas em três pisciculturas distribuídas nos estados do Norte e Nordeste do Brasil: Piscicultura Frigo-Pesca - PFP₁, 47 amostras; PFP₂, 18 amostras e PFP₃, 30 amostras, no município de Manacapuru (Estado do Amazonas); Estação de Piscicultura do Departamento Nacional de Obras Contrás as Secas – DNOCS, 30 amostras, no município de Pentecoste (Estado do Ceará); e Piscicultura de Porto Velho - PPV, 48 amostras, no município de Porto Velho (Estado de Rondônia) (Figura 11). Todas as amostras das pisciculturas eram geração F1, cujo tamanho dos indivíduos variaram de 10 à 15 cm de comprimento total, sendo cada lote de alevinos provenientes de casais distintos. As amostras de tecidos foram coletadas e acondicionadas em tubos eppendorf de 1,5 mL (álcool 75%) e estocadas em freezer - 80°C no Laboratório de Ecofisiologia e Evolução Molecular (LEEM) do Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia (INPA), Manaus, Brasil.



Figura 11. Localização geográfica dos locais de coletas das amostras de *Arapaima gigas*. (A) Departamento Nacional de Obras Contra as Secas (DNOCS), Pentecoste - CE; (B) Piscicultura Porto Velho (PPV), Porto Velho - RO; (C) Reserva de Desenvolvimento Sustentável de Mamirauá (RDSM), Tefé - AM; (D) Reserva de Desenvolvimento Sustentável de Fonte Boa (RDSFB), Fonte Boa – AM e (E) Piscicultura FrigoPesca (PFP_{1,2 e 3}), Manacapuru – AM. (Fonte: Google com modificações).

Extração do DNA genômico total

Para extração do DNA genômico total foi utilizado o protocolo descrito por Sambrook et al. (1989) com algumas modificações. As etapas de extração seguiram os seguintes procedimentos: três gramas de tecidos muscular branco foram macerados e digeridos em solução contendo 330 μ L de tampão de lise (10 mM Tris-HCl, pH 8.2; 10 mM EDTA; 200 mM NaCl), 80 μ L de SDS (10%), 10 μ L de proteinase K (10 mg/mL), 10 μ L de RNase A (10 mg/mL) e 10 μ L de DTT (10mM) em tubos eppendorf de 1,5 mL, e em seguida incubadas em banho maria seco (Eppendorf) a uma temperatura de 60°C por uma hora ou até que todo o material estivesse digerido. Após a digestão foram adicionados 700 μ L de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1) nas amostras e centrifugadas por cinco minutos a 14.000 rpm, e o sobrenadante transferido para um novo tubo eppendorf de 1,5 mL onde foram adicionados 50 μ L de Acetato de Sódio (1M), com

as amostras sendo gentilmente invertidas por 50 vezes para homogeneização. Em seguida os tubos foram centrifugados por cinco minutos a 14.000 rpm. Após essa etapa o sobrenadante foi transferido para um novo tubo e adicionado a 420 μ L de Isopropanol gelado, agitando-se a amostra para homogeneização e centrifugando por cinco minutos a 14.000 rpm. Na etapa seguinte o sobrenadante foi descartado e adicionados 250 μ L de etanol 75% gelado e centrifugado por cinco minutos a 14.000 rpm. Como etapa final o sobrenadante foi descartado e os tubos contendo o pellet de DNA genômico foram secos em capela a temperatura ambiente, sendo em seguida adicionados, em cada tubo, 50 μ L de água milliQ autoclavada livre de DNase e RNase, e acondicionados em freezer a -20°C.

Qualidade, quantificação e diluição do DNA genômico

Após a extração do DNA genômico total, nós verificamos a qualidade do DNA extraído por meio de uma eletroforese em gel de agarose a 1,5%, e para quantificação (ng/ μ L) foi utilizado um espectrofotômetro NanoDrop 2000 (Thermo Scientific). Em seguida, o DNA total foi diluído para uma concentração de trabalho de 50-60 ng/ μ L de DNA por amostra.

Construção da biblioteca genômica enriquecida de microssatélites

A construção da biblioteca genômica enriquecida de microssatélites foi realizada utilizando o DNA genômico total de um exemplar de pirarucu proveniente da Reserva de Desenvolvimento Sustentável de Fonte Boa (RDSFB) no município de Fonte Boa e a metodologia utilizada para construção da biblioteca foi descrita por Billotte et al. (1999), com algumas modificações. Abaixo está descrita a técnica empregada para construção da biblioteca:

O DNA genômico foi digerido utilizando a enzima de restrição *Rsa* I (GT↓AC; 10 u/ μ L) e incubado “overnight” a 37°C, onde foram gerados fragmentos de tamanhos

adequados (300 – 1.200pb). Em seguida, realizamos a ligação dos fragmentos digeridos a dois adaptadores – Rsa21 (5'-CTCTTGCTTACGCGTGGACTA-3'; 10 μ M) e Rsa25 (5'-TAGTCCACGCGTAAGCAAGAGCACA-3'; 10 μ M) com o objetivo de garantir que tivéssemos todos os fragmentos digeridos com uma terminação em comum e conhecida. Após a ligação dos adaptadores foi realizada uma PCR (Reação em Cadeia de Polimerase) para aumentar a quantidade de fragmentos e garantir que a ligação ocorresse, utilizando para isso o adaptador Rsa21 como iniciador na reação. O produto da PCR foi então purificado utilizando o kit de purificação (Quiaquick PCR purification kit - Qiagen cat. n° 23106) e, em seguida, realizamos a seleção dos fragmentos contendo microssatélites utilizando-se, para isso, *beads* magnéticas e oligonucleotídeos de microssatélites biotinilados (Biotina – IIII(CT)₈ e IIII(GT)₈; 50 μ M). Após a seleção dos fragmentos foi realizada uma reação de PCR com o intuito de gerar fitas duplas e garantir uma grande quantidade de produto amplificado para posterior purificação. Após essa etapa foi realizada a ligação dos fragmentos amplificados via PCR ao vetor de clonagem pGEM-T (Promega), sendo em seguida o produto desse processo inserido em células competentes de *Escherichia coli* (XL1-BLUE) em meio sólido LB, contendo X-galactosidase (X-Gal; 30 μ g/mL), Isopropil β -D-tiogalactopiranosidase (IPTG; 30 μ g/mL) e ampicilina (100 μ g/mL). Para manutenção dos clones utilizamos placas ELISA com fundo em U, contendo meio de cultura 2YT-HMFM (200 μ L) e ampicilina (100 μ g/mL) e incubados “overnight” a 37°C para o crescimento dos clones. Em seguida, foi realizada a amplificação dos insertos clonados para garantir que realmente os clones transformados tivessem os insertos. A etapa seguinte foi isolar o DNA plasmidial das colônias recombinantes e preparar a reação de seqüenciamento utilizando BigDye[®] Terminator Cycle Sequencing Kit v3.1 (Applied Biosystems) e os *primers* T7 (5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3') e SP6 (5'-GATTTAGGTGACACTATAG-3'). Para finalização, um total de 96 clones foram selecionados e sequenciados em um sequenciador de DNA automático ABI PRISM[®] 377 Genetics Analyzer (Applied Biosystems).

Desenhos dos oligonucleotídeos

A qualidade das sequências contendo regiões repetidas foi analisada por meio dos eletroferogramas gerados pelo sequenciador ABI PRISM[®] 377 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) onde constatamos 48 sequências contendo as regiões repetidas, sendo que somente 36 apresentaram qualidades ideais para o desenho dos *primers*. Para as sequências selecionadas foram retiradas os adaptadores Rsa21 e Rsa25 utilizando o programa MICROSAT e utilizamos a ferramenta VECSCREEN do National Center for Biotechnology Information - NCBI para verificação da presença ou ausência de fragmentos contendo o resto de vetor de clonagem. Em seguida, fizemos um BLASTn (NCBI) de todas as sequências selecionadas com o objetivo de evitar desenhar *primers* com regiões já contidas no banco de dados do GenBank referentes aos locos de microssatélites desenvolvidos por Farias *et al.* (2003). Após essa verificação todas as sequências foram trabalhadas no programa CodonCode Aligner para a criação das contigs e utilizamos o programa SSRIT (*Simple Sequence Repeat Identification Tool*) (Temnykh *et al.* 2001) para verificação dos tipos de motivos presentes nas contigs. Ao todo foram desenhados 18 pares de *primer* para locos de microssatélites utilizando o programa Oligo Explorer v.1.2 (Gene Link, Inc.), sendo que em cada *primer* forward foi adicionado uma cauda M13 (5'-gtaaaacgacggccagt-3') na região 5', como o objetivo de permitir o anelamento dessa região do M13 com fluorescência segundo protocolo descrito por Schuelke (2000).

PCR de gradiente de temperatura e genotipagem

Ao todo 19 locos de microssatélites foram utilizados neste estudo, sendo 10 locos desenvolvidos por Farias *et al.* (2003) e nove locos desenvolvidos por Santos *et al.* (2011 *in* Molecular Ecology Resources Primer Consortium *et al.* 2011). As reações de PCR em gradiente de temperatura (locos desenvolvidos por Santos *et al.* 2011) e genotipagem dos microssatélites (locos desenvolvidos por Farias *et al.* 2003 e Santos *et al.* 2011) foram

realizadas utilizando um termociclador Veriti™ 96-well Thermal Cycler (Applied Biosystems) para um volume final de 10 µL. Cada reação de PCR continha 1,0 µL de DNA genômico (50-60 ng/µL), 1,0 µL de *primer* forward (0,4 µM), 1,5 µL de *primer* reverse (0,4µM), 1,0 µL de *primer* M13 com fluorescência 6-FAM (0,4 µM) e 5,5 µL do PCR Master Mix (2x) (Fermentas), composto por Taq DNA polimerase (0,05 U), MgCl₂ (1,5 mM) e dNTPs (0,4 mM). O ciclo utilizado para o gradiente de temperatura foi de 94 °C por três minutos; 35 ciclos de 94°C por 1 minuto, 50 – 65 °C por 1 minuto, 72 °C por 1 minuto e uma extensão final de 72°C por 10 minutos. Para as PCRs de genotipagens utilizamos duas etapas de ciclagem: 94 °C por três minutos; 20 ciclos de 94 °C por 20 segundos, 56 °C por 20 segundos e 68 °C por 30 segundos; 25 ciclos de 94 °C por 20 segundos, 53 °C por 20 segundos, 68 °C por 30 segundos e uma extensão final de 72 °C por 10 minutos. Todos os produtos de amplificação da PCR foram visualizados em gel de agarose a 1,5% corado com Gel Red™ (Invitrogen) e reveladas em um transiluminador *L-PIX Image* (Locos Biotecnologia) para verificar a qualidade do produto amplificado.

Genotipagem das amostras em sequenciador capilar

As genotipagens das amostras de *A. gigas* foram realizadas nos sequenciadores ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer e ABI 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Os produtos de PCR da genotipagem foram preparados para um volume final de 10µL, e continham 1 µL de produto do PCR diluído, 0,5 µL de marcador de peso molecular Genescan-500 LIZ (Applied Biosystems) e 8,7 µL de formamida Hi-Di (Applied Biosystems). Os fragmentos de microssatélites foram analisados utilizando o programa GeneMapper v3.0 (ABI 310) e v4.0 (ABI 3130xl) (Applied Biosystems).

Análises dos dados

Validação dos locos microssatélites

Para a validação dos novos locos de microssatélites utilizamos o programa MICRO-CHECKER v2.3 (van Oosterhout et al. 2004) que avaliou a possível presença de alelos nulos, erros de scoring relacionados à retirada de alelos grandes e ao pico de gaguejo ou stutter. O programa GENETIX v4.05.2 (Belkhir et al. 2004) foi utilizado para medir a diversidade genética a partir do número de alelos por locos (\hat{A}), heterozigosidade observada (\hat{H}_O) e esperada (\hat{H}_e) em equilíbrio de Hardy-Weinberg e o índice de fixação (f). O conteúdo de informação de polimorfismo (PIC) foi calculado pelo programa CERVUS v3.0.3 (Kalinowski et al. 2007) que relaciona a heterozigocidade esperada (\hat{H}_e) para cada loco. O teste de equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) e o desequilíbrio de ligação (LD) foram calculados utilizando o programa FSTAT v2.9.3.2 (Goudet, 2001) por meio de comparações múltiplas simultâneas (Rice, 1989) ao nível de significância de 5%, aplicando-se a correção de Bonferroni para todos os locos.

Análises populacionais

Antes das análises populacionais, nós testamos os genótipos de microssatélites para o desequilíbrio de ligação (LD) e para o equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) dentro de cada população usando os programas FSTAT v2.9.3.2 (Goudet, 2001) e GDA v1.1 (*Genetic Data Analysis*; Lewis e Zaykin, 2000), aplicando-se a esses dados a correção de Bonferroni sequencial para corrigir as comparações múltiplas simultâneas (Rice, 1989). O programa MICRO-CHECKER v2.3 (van Oosterhout et al. 2004) foi utilizado para testar a possível presença de alelos nulos e erros de scoring previstos para a retirada de alelos grandes e picos de gaguejo. Para calcular a frequência de alelos nulos utilizamos o programa CERVUS v3.0.3. (Kalinowski et al. 2007) e verificamos se ocorreu diferença significativa utilizando o programa MICRO-CHECKER v2.3, com o nível de significância aplicado de 5%. Para verificarmos a probabilidade $P_{(ID)}$ de irmãos

completos ou pares não relacionados de pirarucu apresentarem multilocus idênticos, utilizamos o programa GIMLET v1.3.3 (Valière, 2002) que explora o poder de discriminação dos locos microssatélites combinados.

Diversidade genética

A estimativa da diversidade genética foi analisada utilizando a estimativa da frequência alélica, o número de alelos por locos (\hat{A}), número efetivo de alelos por locos (\hat{A}_e), heterozigosidade observada (\hat{H}_O) e esperada (\hat{H}_e) em equilíbrio de Hardy-Weinberg, o conteúdo de informação de polimorfismo (PIC) e o índice de fixação (f). O número efetivo de alelos por locos (\hat{A}_e) foi calculado utilizando a seguinte fórmula matemática: $\hat{A}_e = 1 / (1 - \hat{H}_e)$. Todas estas análises, exceto o número efetivo de alelos por locos (\hat{A}_e) e o conteúdo de informação de polimorfismo (PIC), foram realizadas utilizando o programa FSTAT v2.9.3.2 (Goudet, 2001), GDA v1.1 (Lewis e Zaykin, 2000) e GENETIX v4.05.2 (Belkhir et al. 2004). O PIC foi calculado utilizando o programa CERVUS v3.0.3 (Kalinowski et al. 2007). O número de alelos privados e raros foram calculados utilizando o programa GDA v1.1 com aplicação para cada locos e população. Hartl e Clark (2010) relatam que para se considerar a presença de um alelo raro em uma população é necessário que sua frequência esteja abaixo de 0,005.

Diferenciação genética

Como forma de quantificar o efeito de endocruzamento da subdivisão populacional em organismos naturais, nós aplicamos o índice de fixação (Wright, 1921) que equaliza a redução na heterozigosidade esperada com o cruzamento aleatório em qualquer nível populacional hierárquico relativo a outro nível mais incluso na hierarquia. Esse índice é um indicador útil de diferenciação genética, pois permite uma comparação objetiva do efeito geral da estrutura populacional entre diferentes organismos, sem entrar

em detalhes nas frequências alélicas, e nos níveis de heterozigiosidade observada (Hartl e Clark, 2010).

Portanto, os níveis de diferenciação genética entre todos os sítios de amostras foram analisados utilizando a estatística F de Wright (F_{IT} , F_{IS} e F_{ST} ; Weir e Cockerham, 1984) usando o programa FSTAT v2.9.3.2 (Goudet, 2001). Em outra ordem de investigação da estrutura genética nas amostras de *A. gigas*, aplicamos o índice F_{ST} , que assume o modelo de alelos infinitos (IAM, *Infinite Allele Model*), e o R_{ST} (Slatkin, 1995), que assume o modelo de mutação escalonada (SMM, *Stepwise Mutation Model*), ambos índices foram calculados para todos os locos utilizando o programa ARLEQUIN v3.5 (Excoffier e Lischer, 2010).

De acordo com Hartl e Clark (2010), as estimativas das estatísticas F devem corrigir os efeitos de amostragem e de um número limitado de subpopulações, bem como de um número limitado de organismos em cada população. Para isso sugeriram métodos para realizar essas correções, porém, são bastante complexos e originaram problemas adicionais, sendo os aspectos importantes discutidos nos trabalhos de Hedrick (2005), Jost (2008) e Nei e Chesser (1983).

Dessa forma, esses novos níveis de diferenciação genética sugeridos foram medidos utilizando o software SMOGD v1.2.5 (*Software for the Measurement of Genetic Diversity*; Crawford, 2010) que está baseado em cálculos estabelecidos para dois parâmetros: (1) os parâmetros básicos que correspondem à medição da diversidade relatada por medidas de diferenciação (diferenciação absoluta - D_{ST} (Nei, 1973), diferenciação relativa - G_{ST} (Nei, 1973), heterozigiosidade entre sub-populações - H_{ST} (Aczel e Daroczy, 1975; Tsallis e Brigatti, 2004), componente de diversidade entre sub-populações - Δ_{ST} (Jost, 2008) e diferenciação atual $-D$ (Jost, 2008)) e similaridade (proporção da heterozigiosidade intra-populacional vs heterozigiosidade total - H_S/H_T e proporção da diversidade total que está contida na média da sub-população - Δ_S/Δ_T) (Jost, 2008), e (2) os parâmetros estimados que estão relacionados com o tamanho populacional pequeno (estimador quase imparcial da heterozigiosidade dentro de sub-populações - H_{Sest} (Nei e Chesser, 1983), estimador quase imparcial da heterozigiosidade total nas sub-

populações - H_{Test} (Nei e Chesser, 1983), estimador quase imparcial da heterozigocidade entre sub-populações - H_{STest} (Nei e Chesser, 1983), estimador quase imparcial da diferenciação relativa - G_{STest} (Nei e Chesser, 1983), medida padronizada da diferenciação genética - G'_{STest} (Hedrick, 2005) e estimador da diferenciação atual - D_{est} (Jost, 2008)) e com os erros amostragens (Bootstrap estimado – G_{STest} , G'_{STest} e D_{est}) (Hedrick, 2005; Jost, 2008; Nei e Chesser, 1983).

Estruturação populacional

Nas análises da estrutura populacional, nós aplicamos o modelo de mistura (*Admixture*) ancestral que correlaciona a frequência gênica entre as populações utilizando o programa STRUCTURE v2.3.1 (Pritchard et al. 2000; Falush et al. 2003), com um burn-in de 50.000 seguido por 200.000 passos pelo teste de Monte Carlo em Cadeia de Markov (MCMC). Nós também aplicamos o valor do ΔK (sugerido por Evanno et al. 2005) para identificar o mais alto nível de hierarquia de divisão genética, no qual dividimos as populações e repetimos as análises para cada divisão. Uma corrida para cada análise foi realizada para $K = 1$ e $K = (\text{número de amostras de populações} + 2)$, com cinco replicas para cada K . Para complementação das análises de estruturação das populações, nós aplicamos uma análise de correspondência fatorial – FCA (*Factorial Correspondence Analysis*; Benzecri, 1973) utilizando o programa GENETIX v4.05.2 (Belkhir et al. 2004), que referencia a distância genética entre as populações, podendo com isso detectar possíveis indivíduos *outliers*.

Bottleneck – gargalo populacional

Nós analisamos possíveis sinais de gargalos populacionais recentes (excesso de heterozigotos) dentro dos grupos de cativo e da natureza utilizando o programa BOTTLENECK (Cornuet e Luikart, 1996; Piry et al. 1999). Esta análise foi aplicada para detectarmos gargalos populacionais de não mais do que $2N_E - 4N_E$ por gerações no

passado, dependendo da gravidade do gargalo e da taxa de mutação dos locos analisados. Para isso o programa utiliza três modelos de mutação, as quais são: (1) modelo de alelo infinito (IAM), (2) modelo de mutação escalonada (SMM), e (3) modelo de duas fases de evolução (TPM, um intermediário entre o IAM e SMM). Contudo, nós não utilizamos o modelo de IAM, pois os modelos SMM e TPM são os mais adequados para avaliar os dados de microsatélites (di Rienzo et al. 1994). Dessa forma, nós aplicamos 95% (SMM) e 5% (TPM) para várias etapas das mutações, com uma variação de 12% entre os vários passos, como recomendado por Piry et al. (1999).

Detecção de locos outlier

Para detectarmos possíveis locos que estejam sendo selecionados positivamente (*loci outlier*) nós utilizamos três softwares: DETSELD v1.0 (Vitalis et al. 2003), BAYESCAN v2.01 (Foll e Gaggiotti, 2008) e LOSITAN (*Looking for Selection In a Tangled*; Antao et al. 2008). O software LOSITAN possui o programa DFDIST (Beaumont e Nichols, 1996) adicionado ao seu sistema, gerando uma vantagem nas análises dos dados devido ao método Bayesiano desenvolvido por Zhivotovsky (1999), sendo que este método também é encontrado para o software BAYESCAN. Além disso, a partir do software DFDIST é possível aplicarmos o multitteste de correção baseado sobre a velocidade da descoberta de falso positivo (FDR, false discovery rate) para locos *outlier* descrita por Benjamini e Hochberg (1995). Portanto, para a escolha desses programas levamos em consideração a necessidade de compararmos os resultados gerados por estes softwares, bem como evitarmos a presença de locos *outlier* (falso positivo) em nossos dados (Pérez-Figueroa et al. 2010).

Resultados e discussão

Os resultados obtidos nas análises da variabilidade genética em populações de pirarucu (*Arapaima gigas*) provenientes de cativeiro foram comparados com duas populações selvagens das Reservas de Desenvolvimento Sustentável de Mamirauá e Fonte Boa, e a discussão dos dados são apresentadas na forma de três artigos científicos, mencionados a seguir:

Artigo 1. Development and characterization of microsatellite loci in *Arapaima gigas*, an important neotropical fish. Publicado no periódico Molecular Ecology Resources 11: 586-589.

Artigo 2. Composição da diversidade genética em sete populações de *Arapaima gigas* utilizando 19 marcadores microssatélites: implicações para o manejo e conservação. Artigo nas normas da Acta Amazonica.

Artigo 3. Quantos locos microssatélites são necessários para um estudo de diversidade genética em *Arapaima gigas*? Artigo nas normas da Acta Amazonica.

*Development and characterization of microsatellite loci in
Arapaima gigas, an important neotropical fish*

Carlos Henrique dos Anjos dos Santos, Gisele Torres Clímaco, Carolina Fernandes da Silva Sousa, Maria Nazaré Paula-Silva, Adna Cristina Barbosa de Sousa, Izeni Pires Farias, Tatiana de Campos, Vera Maria Fonseca de Almeida-Val

**Publicado na Molecular Ecology Resource
(ARTIGO NO ANEXO 1)**

Santos CHA, Clímaco GT, Sousa CFS, Paula-Silva MN, Sousa ACB, Farias IP, Campos T, Almeida-Val VMF. (2011). Development and characterization of microsatellite loci in *Arapaima gigas*, an important neotropical fish (<http://biomatch.trinity.edu/manuscripts/11-3/mer-10-0412.pdf>). In: Molecular Ecology Resources Primer Development Consortium et al. (2011). Permanent genetic resources added to molecular ecology resources database 1 December 2010 – 31 January 2011. *Molecular Ecology Resource*. 11: 586-589. doi: 10.1111/j.1755-0998.2011.03004.x

Development and characterization of microsatellite loci in *Arapaima gigas*, an important neotropical fish

Carlos Henrique dos Anjos dos Santos^{1*}, Gisele Torres Climaco¹, Carolina Fernandes da Silva Sousa¹, Maria Nazaré Paula-Silva¹, Adna Cristina Barbosa de Sousa², Izeni Pires Farias³, Tatiana de Campos², Vera Maria Fonseca de Almeida-Val¹

¹Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), Laboratório de Ecofisiologia e Evolução Molecular, Manaus, AM, CEP 69060-001, Brazil.

²Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética (CBMEG), Campinas, SP, CP 6109, CEP 13083-970, Brazil.

³Universidade Federal do Amazonas (UFAM), Laboratório de Evolução e Genética Animal Manaus, AM, CEP 69077-000, Brazil.

*Corresponding author: Carlos Henrique A. Santos. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), Laboratório de Ecofisiologia e Evolução Molecular (LEEM). Avenida André Araújo, 2936, Aleixo, CEP 69060-001, Manaus, Amazonas, Brasil.

Phone: +55 (92) 3633188

E-mail: carloshenrique@inpa.gov.br

Running title: Microsatellite markers for *Arapaima gigas*

Abstract

Ten microsatellite markers were developed and optimized for *Arapaima gigas*. The markers were used to analyze 30 individuals that were collected from the wild (Mamiraua, AM). Polymorphism information content (*PIC*) values ranged from 0.621 to 0.869 (average 0.692). The observed (H_O) and expected heterozygosity (H_E) values ranged from 0.370 to 1.000 and 0.674 to 0.880, respectively. Of the 10 polymorphic loci, nine didn't deviate from Hardy-Weinberg Equilibrium after Bonferroni correction. These microsatellite markers provide useful molecular tools for the monitoring and management of artificial and wild populations of *A. gigas* and will also be useful for additional genetic studies.

Keywords: Pirarucu, freshwater fish, polymorphism, microsatellites.

Arapaima gigas, locally known as pirarucu (in Brazil) or paiche (in Peru and Bolivia), is one of the largest freshwater fish of South America; it can grow to up to three meters in length and can weigh over 200 kg (Saint-Paul 1986; Nelson 1994). *A. gigas* is distributed predominantly in the Amazon basin floodplain, although it has also been found in the upper Essequibo basins of Guyana (Lülig 1964). Today, this species is considered a vulnerable resource due to the intense fishing that has occurred since the colonization of the Amazon region. There are only 14 microsatellite markers currently available for *A. gigas* (Farias et al. 2003). Additional microsatellite makers would facilitate the study of genetic structure in artificial and wild *A. gigas* populations as well as pedigree control, genetic management and genetic mapping. For this purpose, we report ten additional polymorphic microsatellites.

The microsatellite markers were developed from an enriched genomic library following the protocol described by Billotte et al. (1999). Genomic DNA was extracted from white muscle tissue samples using phenol and chloroform extraction protocol (Sambrook et al. 1989). The DNA samples were digested with the *RsaI* restriction enzyme and linked to adapters RSA21 5'-CTCTTGCTTACGCGTGGACTA-3' and RSA25 5'-TAGTCCACGCGTAAGCAAGAGCACA-3'. The genomic library was enriched for dinucleotide sequences using biotinylated (CT)₈ and (GT)₈ microsatellite primers, which were bound to Streptavidin MagneSphere Paramagnetic Particles as described by the manufacturer. Selected fragments were amplified by PCR using primer sequences that were complementary to the adapters and the fragments were then linked to the pGEM-T vector (Promega). The plasmids were introduced into *Escherichia coli* XL-1 Blue competent cells. The transformed cells were cultivated on agar plates containing 100 µg mL⁻¹ of ampicillin, 50 µg mL⁻¹ of X-galactosidase and isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG). Single white colonies were transferred to microplates for long-term storage at -80°C. A total of 96 clones were selected and bidirectionally sequenced in an ABI PRISM[®] 377 Automated Sequencer using the T7 and SP6 primers and the v 3.1 Big Dye[®] Terminator Cycle Sequencing Kit (PerkinElmer Applied

Biosystems). The sequences were assembled using Bioedit (Hall 1999), and creation of contigs used the free software CodonCode Aligner. The presence of microsatellite motifs in each sequence were verified using the Simple Sequence Repeat Identification Tool – SSRIT (Temnykh et al. 2001). Only 20 SSRs were selected for primer design because their sequences presented more than seven tandem repeats and 16 presented adequate amplification conditions according the program Oligo Explorer v1.2 (Gene Link, Inc.). An M13 sequence tail was added to the 5' end of each forward primer to permit the fluorescent labeling protocol suggested by Schuelke (2000).

The microsatellite loci were characterized in 30 *A. gigas* individuals that were collected from the wild (Mamiraua, AM). Polymerase chain reaction (PCR) amplifications were carried out in a 10- μ L total volume containing 20-50 ng of DNA template, 0.4 μ M forward primer and 0.8 μ M reverse primer. The PCR Master Mix (2x) (Fermentas) was composed of – 0.05 U Taq DNA Polymerase in reaction buffer, 4.0 mM MgCl₂ and 0.4 mM of each dNTP. PCR amplifications were performed in a PTC-200 thermal cycler (MJ Research, Waltham, MA, USA) using the following cycling profile: hot start at 94°C for 1 min followed by 25 cycles of denaturing at 94°C for 20 s, then the specific temperature (56°C) for 20 s, and extension at 68°C for 30 s; labeling step consisted of 20 cycles of denaturing at 94°C for 20 s, annealing at 53°C for 20 s, and extension at 68°C for 30 s; final extension was performed at 72°C for 3 min. Amplification products were checked by electrophoresis on 1% agarose gels containing 0.1 mg mL⁻¹ ethidium bromide in 1X TBE buffer (pH 8.0). PCR products were analyzed on an ABI PRISM[®] 310 Sequencer (Applied Biosystems, Inc.) and allele sizes were scored using the size standard GeneScan-500 LIZ (Applied Biosystems, Inc.) analyzed on GeneMapper version 3.0 software (Applied Biosystems, Inc.).

Of the 16 loci analyzed, six were monomorphic and 10 presented polymorphism (Table 1). The number of alleles per locus ranged from 4 to 12, with an average of 7.9. Polymorphism information content (PIC) values were calculated for the purpose of assessing marker informativeness (Botstein et al. 1980). The PIC values ranged from 0.621 to 0.869, with an average of 0.761. The highest PIC value was found for the

AG_03 locus, which presented the highest number of alleles (12). The GENETIX v4.05 software (Belkhir et al. 2004) was used to estimate the observed and expected heterozygosities. The observed and expected heterozygosity values ranged from 0.370 to 1.000 and 0.674 to 0.880, respectively. The value of F_{is} (f), the tests of Hardy–Weinberg Equilibrium (HWE) and Linkage Disequilibrium (LD) were performed using FSTAT v2.9.3 software (Goudet 2001). The value of f ranged from -0.240 to 0.466, with an average of -0.061. We have found a significant deviation from Hardy-Weinberg equilibrium for the locus AG_14 after Bonferroni correction ($P: 5\% \leq 0.005$). No significant linkage disequilibrium was detected among any of the loci according to the chi-squared test ($P < 0.001$). Analyses in the program MICRO-CHECKER v2.3 (van Oosterhout et al. 2004) indicated that AG_14 also presented an excess of homozygotes and possibly null alleles.

These ten novel polymorphic microsatellite loci are highly variable and potentially useful tools for genetic studies of natural and cultured populations of *A. gigas*.

Acknowledgments

The authors are grateful to the Laboratory of Evolution and Animal Genetics for providing the samples collected from a wild population (Mamiraua Natural Reserve). This work was funded by the Program for Academic Cooperation PROCAD (INPA/UNICAMP) and CAPES (no.023/2006/CAPES). CHAS is the recipient of a PhD fellowship from CNPq. VMFAV and IPF are the recipient of research fellowships from CNPq. This work is part of INCT ADAPTA, coordinated by Adalberto Luis Val.

References

Belkhir K, Borsa P, Chikhi L, Raufaste N, Bonhomme F (2004) GENETIX 4.05, logiciel sous Windows TM pour la génétique des populations. Laboratoire Génome, Populations, Interactions, CNRS UMR 5171, Université de Montpellier II, Montpellier (France).

Billotte N, Lagoda PJR, Risterucci AM, Baurens FC (1999) Microsatellite-enriched libraries: applied methodology for the development of SSR markers in tropical crops. *Fruits*, **54**, 277–288.

Botstein D, White RL, Skolnick M, Davis RW (1980) Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *American Journal of Human Genetics*, **32**, 314-331.

Farias IP, Harbek 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.

Goudet J (2001) FSTAT, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices (version 2.9.3). Available from <http://www.unil.ch/izea/software/fstat.html>. Updated from Goudet (1995).

Hall TA (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp Ser* 41:95-98.

Lülig V (1964) Zur biologie und Ökologie von *Arapaima gigas* (Pisces, Osteoglossidae) *Zeitschrift für Morphologie und Ökologie der Tiere*, **54**, 436-530.

Nelson JS (1994) *Fishes of the world*. 3rd ed. John Wiley and Sons, Inc., New York. 624p.

Saint-Paul V (1986) Potential for aquaculture of South American freshwater fishes: a review. *Aquaculture*, **54** (3), 205-240.

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, New York.

Schuelke M (2000) An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. *Nature Biotechnology*, **18**, 233-234.

Temnykh S, DeClerck G, Lukashova A, Lipovich L, Cartinhour M, McCouch S (2001) Computational and experimental analysis of microsatellites in rice (*Oryza sativa* L.): frequency, length variation, transposon association, and genetic marker potential. *Genome Research*, **11**, 1441-1452.

van Oosterhout C, Hutchinson WF, Wills DPM, Shipley P (2004) Micro-Checker: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes*, **4**, 535–538.

Table 1. Characteristics of the ten *Arapaima gigas* microsatellite loci: locus name, Genbank accession number, primer sequences (F: forward primer, R: reverse primer), repeat motif from a sequenced clone, annealing temperature (T_a), number of alleles (A), product size range in base pairs, expected (H_E) and observed heterozygosity (H_O), fixation index (f), polymorphism information content (PIC), P values for the HWE test, significance threshold adjusted using Bonferroni correction (P-HWE): (P: 5% \leq 0.005), ^{NS}not significant and *significant.

SSR Locus	GenBank Accession no.	Primer sequences (5'-3')	Repeat motif	T_a (°C)	A	Allele size (pb)	H_E	H_O	Fis (f)	PIC	P value* HWE
AG_01	HM013751	F: ^{FAM} CCCACAGTCCAAACACATT R: GAACAACAAGTCCTCGCAC	(TG) ₁₉	56	8	121-134	0.846	0.967	-0.126	0.827	0.991 ^{NS}
AG_02	HM013752	F: ^{FAM} AGTGTTTTTACGCCATCCG R: CAGCAGCAGTTTGGTTACG	(CA) ₁₃	56	5	244-248	0.707	0.800	-0.114	0.666	0.919 ^{NS}
AG_03	HM013750	F: ^{FAM} CATTTCCTCAACCAAGTC R:GTATCTCTAAACAAGCATCAAG	(TC) ₅ TGTA(TG) ₇	56	12	165-194	0.880	0.966	-0.080	0.869	0.966 ^{NS}
AG_07	HM013753	F: ^{FAM} GAGGCAGAGAGAAACATAGAC R:CAACAAGGCAGTGAGTAATAG	(CA) ₁₁ GA(CA) ₇	56	6	182-189	0.730	0.920	-0.240	0.690	0.996 ^{NS}
AG_09	HM013754	F: ^{FAM} GCGTGGACTAACAGCTTC R:GGGCAAAAAATCAATACAC	(GT) ₁₁	56	9	133-181	0.850	1.000	-0.156	0.832	1.000 ^{NS}
AG_11	HM013755	F: ^{FAM} CAGGTTACAGATACAGGCT R:GATTTTGGCACTTGGATGT	(GA) ₁₈	56	12	261-280	0.806	0.931	-0.139	0.784	0.988 ^{NS}
AG_12	HM013756	F: ^{FAM} TTCATCTGTCTGCTGTTTG R:TGTTACCACCTTCACGGA	(GA) ₁₁	56	8	174-182	0.826	0.933	-0.144	0.805	0.972 ^{NS}
AG_13	HM013757	F: ^{FAM} CCACGCAGTAGAAGGATAAC R:CTCAAAACAGACAAGGGC	(GT) ₁₃	56	9	178-189	0.835	0.967	-0.141	0.814	0.993 ^{NS}
AG_14	HM013758	F: ^{FAM} ACGGTGGTAGTGTGATTG R:GCTTCAGGGTAGTGGATG	(TG) ₈	56	4	281-284	0.674	0.370	0.466	0.621	0.000*
AG_15	HM013759	F: ^{FAM} GTATGAAGGAGAGATGGAGT R:CCCTTTTTTCACACACAG	(AG) ₁₄ AA(AG) ₇	56	5	201-205	0.728	0.692	0.068	0.679	0.342 ^{NS}

Artigo 2

***Composição da diversidade genética em sete populações de
Arapaima gigas utilizando 19 marcadores microssatélites:
implicações para o manejo e conservação***

Carlos Henrique dos Anjos dos Santos, Carolina Fernandes Silva de Sousa, Maria de Nazaré Paula da Silva, Adalberto Luis Val, Izeni Pires Farias, Vera Maria Fonseca de Almeida e Val

Artigo nas normas da Acta Amazônica

Santos CHA, Sousa CFS, Paula-Silva MN, Val AL, Farias IP, Almeida-Val VMF. (2011). Composição da diversidade genética em sete populações de *Arapaima gigas* utilizando 19 marcadores microssatélites: implicações para o manejo e conservação. Artigo nas normas da Acta Amazônica.

Composição da diversidade genética em sete populações de *Arapaima gigas* utilizando 19 marcadores microssatélites: implicações para o manejo e conservação

Genetic diversity in seven populations of *Arapaima gigas* using 19 microsatellites markers: implications for management and conservation.

Carlos Henrique dos Anjos dos SANTOS^{1*}, Carolina Fernandes Silva de SOUSA¹, Maria de Nazaré PAULA-SILVA¹, Adalberto Luis VAL¹, Izeni Pires FARIAS², Vera Maria Fonseca de ALMEIDA-VAL¹

¹Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), Coordenação de Biodiversidade (CBio), Laboratório de Ecofisiologia e Evolução Molecular (LEEM), Manaus 69060-001, Brasil. ²Universidade Federal do Amazonas (UFAM), Instituto de Ciências Biológicas (ICB), Laboratório de Evolução e Genética Animal (LEGAL), Manaus 69077-000, Brasil.

*Endereço para correspondência:

Carlos Henrique A. Santos. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), Coordenação de Biodiversidade (Cbio), Laboratório de Ecofisiologia e Evolução Molecular (LEEM). Avenida André Araújo, 2936, Aleixo, CEP 69060-001, Manaus, Amazonas, Brasil.

Fone: +55 (92) 3633188

E-mail: carloshenrique@inpa.gov.br

RESUMO

Determinamos a diversidade genética e as relações evolutivas entre sete populações de *Arapaima gigas* (5 cativos e 2 selvagens) utilizando 19 marcadores microssatélites. Os exemplares de pirarucu foram provenientes de três estados brasileiros (Amazonas, Ceará e Rondônia), e um total de 424 alelos foi detectado, sendo que destes, 49 eram alelos privados. O número efetivo de alelos por loco entre as populações variou de 1,621 (PFP₁, cativo) a 2,268 (RDSM, selvagem) e a heterozigosidade esperada variou de 0,383 (PFP₁) a 0,559 (RDSM), respectivamente. Contudo, identificamos uma variação genética moderada com uma alta diferenciação entre as populações. Os valores em pares do F_{ST} também mostraram que as populações de pirarucu, apresentaram uma alta diferenciação com os valores (pares F_{ST}) variando de 0,135 (RDSFB-RDSM, selvagem) a 0,364 (PFP₁-PPV, cativo), indicando que as populações de cativo tendem a diferir mais do que as populações da natureza. A árvore filogenética de neighbour-joining (NJ) e a análise de correspondência fatorial (FCA) mostraram a ocorrência de dois grupos genéticos a partir dos dados de distância genética. Além disso, verificamos que as populações de pirarucu estão formando sua própria aglomeração ($q > 0,9$), indicando que as populações não estão misturadas. Nós verificamos ainda a ocorrência de um gargalo genético recente entre as populações ocasionado, provavelmente, pelo reduzido tamanho populacional no estoque fundador. Diante dos dados expostos, nós sugerimos como medidas de manejo e conservação para o pirarucu, um acompanhamento mais detalhado dos planteis de reprodutores, bem como um monitoramento periódico nas populações selvagens de pirarucu, com o intuito de que esses animais possam vir a ser utilizados como futuros estoques de reprodutores.

PALAVRAS-CHAVE: *Arapaima gigas*, conservação genética, diversidade genética, microssatélites, reprodutores.

INTRODUÇÃO

O Brasil é líder mundial em número de espécies de peixes de água doce, com cerca de 2.122 espécies descritas (21% espécies do mundo) (Buckup *et al.* 2007) e com estimativas de 2.416 espécies para a Amazônia, sendo que, destas, 2.072 seriam endêmicas para região (Barlleta *et al.* 2010; Lévêque *et al.* 2008). Essa elevada taxa de endemismo pode estar relacionada com as cabeceiras dos rios e corredeiras, áreas ainda pouco estudadas (Menezes, 1996). Além disso, existe uma perspectiva de que somente nos tributários do rio Amazonas possa ocorrer cerca de 3.000 espécies de peixes (Ardura *et al.* 2010).

Das espécies endêmicas da bacia Amazônica, o pirarucu (*Arapaima gigas*) é uma das que mais se destacam pela sua importância econômica na região Norte do Brasil. Além disso, nos últimos anos vem crescendo o cultivo dessa espécie em cativeiro, e cada vez mais os aquicultores vem investido no potencial dessa espécie. Considerado o maior peixe de escamas de água doce do mundo, o pirarucu pode chegar a medir os três metros de comprimento e pesar mais de 200 kg (Castello, 2004). Devido ao seu grande porte a espécie chegou a apresentar nos últimos anos nítidos sinais de sobreexploração devido a intensa atividade pesqueira extrativista (Viana *et al.* 2007), chegando a ser considerada extinta comercialmente nas principais cidades da Amazônia brasileira, e desaparecendo em algumas áreas (Goulding, 1980), como os ambientes de várzeas, rios lênticos e em grandes lagos (Castello, 2008, Oliveira *et al.* 2005).

Diante disso, a espécie *A. gigas* acabou sendo incluída pela International Union for Conservation of Nature (IUCN) na lista vermelha de espécies ameaçadas de extinção (Amaral, 2009; Ortiz *et al.* 2007) e classificada no Apêndice II da Convention on International Trade of Endangered Species of Wild Fauna and Flora (CITES) que lista as espécies que não necessariamente estão sujeitas a extinção, mas que podem vir a se tornar extintas, caso o comércio não seja controlado (Viana *et al.* 2007).

Em 1989, o Instituto Brasileiro de Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA), determinou o tamanho mínimo de captura para o pirarucu de 1,5m de comprimento total e, no ano seguinte, ocorreu a implementação do período

do defeso reprodutivo, que compreende o período de 1º de dezembro a 31 de maio, quando a espécie está em fase reprodutiva na bacia amazônica. No ano de 1996, o IBAMA do Estado do Amazonas proibiu a pesca do pirarucu, com exceção das áreas de pesca manejada e da produção em cativeiro (Arantes *et al.* 2007). Diante disso, nos últimos anos observou-se um aumento no número de criadores de pirarucu em cativeiro, sendo o cultivo dessa espécie expandido para outras regiões do Brasil e da América do Sul.

Além disso, a criação de peixes de água doce no Brasil tem se expandido rapidamente nos últimos anos, especialmente por seu alto potencial hidrográfico, grande adaptabilidade de algumas espécies nativas ao sistema de cativeiro e a disponibilidade de áreas favoráveis e disponíveis para atividade (Wasko *et al.* 2004). Contudo, as práticas da aquicultura podem, inadvertidamente, diminuir a variabilidade genética das espécies em cativeiro, tanto pelo cruzamento não assistido, bem como pelo pequeno número de fundadores nas pisciculturas (Wasko *et al.* 2004), o que alteraria as frequências genotípicas e a forma de como as espécies se adaptam em condições de confinamento (Santos *et al.* 2012, Prelo).

Atualmente não existe nenhum estudo genético com pirarucu de cativeiro e os estudos genéticos existentes estão todos direcionados para exemplares selvagens, sendo estes estudos realizados por Hrbek *et al.* (2005), Hrbek *et al.* (2007) e Marques *et al.* (2006). Além disso, esses estudos têm mostrado uma lacuna com respeito à genética populacional em animais selvagens e, nesse caminho, podemos também relacionar os exemplares de cativeiro. O presente estudo foi realizado com o intuito de verificar a diversidade e diferenciação genética de exemplares de *A. gigas* mantidos em cativeiro, com fins manejo e conservação da espécie.

MATERIAL E MÉTODOS

Coleta das amostras

Amostras de músculo branco de 217 indivíduos de pirarucu foram coletadas de ambientes naturais (duas populações) e de estações de pisciculturas (cinco populações) localizados nas Regiões Norte e Nordeste do Brasil (Figura 1). As coletas dos indivíduos da natureza foram realizadas nas Reservas de Desenvolvimento

Sustentável de Mamirauá (RDSM – 25 amostras) e Fonte Boa (RDSFB – 18 amostras), localizadas no Estado do Amazonas. Os exemplares (proles de pirarucu) de cativeiro foram adquiridos das estações de pisciculturas: Piscicultura de Porto Velho no Estado de Rondônia (PPV – 48 amostras), Piscicultura FrigoPesca no Estado do Amazonas (PFP₁ – 47 amostras, PFP₂ – 18 amostras e PFP₃ – 32 amostras) e Estação de Piscicultura do Departamento Nacional de Obras Contra as Secas no Estado do Ceará (DNOCS – 30 indivíduos). Todas as amostras das pisciculturas foram da geração F1, cujo tamanho dos indivíduos eram de 10 à 15 cm de comprimento total, sendo cada lote de alevinos provenientes de casais distintos. Após as coletas as amostras foram armazenadas no freezer -80 °C para posterior extração do DNA.

Extração do DNA genômico

O DNA genômico total foi extraído do músculo branco utilizando o protocolo descrito por Sambrook *et al.* (1989) com algumas modificações. Cerca de 100 mg de tecido foi digerido overnight a 37 °C em 0,7 mL de tampão de lise (6 M urea, 10 mM tris-HCl, 125 mM NaCl, 1% SDS, 10 mM EDTA, pH 7,5), e adicionados 10 µL de proteinase K (Fermentas), RNase A (Invitrogen) e 1,4-Dithiothreitol (Biosynth®). Após a digestão as amostras foram lavadas com fenol-clorofórmio-álcool isoamílico (Invitrogen), e precipitado em isopropanol gelado, o pellet formado foi ressuscitado em 50 µL H₂O livre de DNase. A qualidade do DNA extraído foi verificado por meio de uma corrida em gel de agarose a 1,5% corado com GelRed® (Invitrogen) e revelado em um transluminador *L-PIX Image* (Locos Biotecnologia). A quantificação do DNA foi realizado utilizando um espectrofotômetro NanoDrop 2000 (Thermo Scientific).

Genotipagem dos locos microssatélites

As amostras de *A. gigas* foram genotipadas para 19 locos de microssatélites desenvolvidos por Farias *et al.* (2003) (AgCTm1, AgCTm3, AgCTm4, AgCTm5, AgCTm7, AgCTm8, AgCAm4, AgCAm16, AgCAm18, and AgCAm26) e Santos *et al.* (2011 in Molecular Ecology Resources Primer Consortium *et al.* 2011) (AG_01,

AG_02, AG_03, AG_07, AG_09, AG_11, AG_12, AG_13, and AG_15). As reações de PCR foram realizadas utilizando um termociclador Veriti™ 96-well Thermal Cycler (Applied Biosystems, Inc.) para um volume final de 10 µL. Cada reação de PCR continha 1,5 µL de DNA genômico (50 ng/µL), 1,0 µL de *primer* forward (0,4 µM), 1,5 µL de *primer* reverse (0,4µM), 1,0 µL de *primer* M13 com fluorescência 6-FAM (Schuelke, 2000) (0,4 µM) e 5,0 µL do PCR Master Mix (2x) (Fermentas) contendo Taq DNA polimerase (0,05U), MgCl₂ (1,5 mM) e dNTPs (0,4 mM). Os ciclos das PCRs foram distribuídos em quatro etapas de ciclagem da seguinte forma: 94 °C por três minutos; 20 ciclos de 94 °C por 20 segundos, 56 - 58 °C por 20 segundos e 68 °C por 30 segundos; 25 ciclos de 94 °C por 20 segundos, 53 °C por 20 segundos, 68 °C por 30 segundos e uma extensão final de 72 °C por 10 minutos. Os produtos de PCRs amplificados foram confirmados em uma corrida em gel de agarose a 2,0% corado com GelRed® (Invitrogen) e reveladas em transiluminador *L-PIX Image* (Locos Biotecnologia).

Os produtos amplificados foram genotipados em sequenciador ABI 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Inc.). Cada reação de genotipagem continha 1,0µL do produto de PCR diluído, 0,3 µL do Genescan-500 LIZ (-250) (Applied Biosystems, Inc.) e 8,7 µL de formamida Hi-Di (Applied Biosystems, Inc.). Os fragmentos de microssatélites foram analisados utilizando o programa GeneMapper v4.0 (Applied Biosystems, Inc.).

Análises dos dados

Diversidade genética

Nós estimamos a diversidade genética aplicando os seguintes parâmetros: a heterozigosidade observada (\hat{H}_o) e esperada (\hat{H}_e) (FSTAT v2.9.3.2; Goudet, 2001), o número de alelos por locos (GENETIX v4.05.2; Belkhir *et al.* 2004), o número de alelos privados, o índice de fixação (f) (GDA v1.1; Lewis e Zaykin, 2000), o conteúdo de informação de polimorfismo (PIC) (CERVUS v3.0.3; Kalonowski *et al.* 2007) e o número efetivo de alelos por locos (\hat{A}_e), respectivamente. Para o cálculo do número efetivo de alelos utilizamos a formula matemática $\hat{A}_e = 1 / (1 - \hat{H}_e)$. O programa MICRO-CHECKER v2.3 (van Oosterhout *et al.* 2004) foi utilizado para testarmos a

possível presença de alelos nulos e a frequência desses alelos foi calculada utilizando o programa CERVUS v3.0.3 (Kalinowski *et al.* 2007). O desequilíbrio de ligação (LD) e o equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) foram calculados utilizando os softwares FSTAT v2.9.3.2 (Goudet, 2001) e GDA v1.1 (Lewis e Zaykin, 2000), respectivamente, sendo aplicada para essas análises a correção de Bonferroni sequencial que corrige as comparações múltiplas simultâneas, minimizando os erros do tipo I (Rice, 1989). O nível de significância utilizando foi de $\alpha = 0,05$.

Diferenciação genética

Os níveis de diferenciação genética entre os sítios amostrais foram analisados segundo a estatística F de Wright (F_{IT} , F_{IS} e F_{ST} ; Weir e Cockerham, 1984) utilizando os softwares FSTAT v2.9.3.2 (Goudet, 2001) e ARLEQUIN v3.5 (Excoffier e Lischer, 2010). Porém, dois índices de diferenciação genética foram melhor abordados segundo o modelo mutacional dos microsatélites, o F_{ST} (Weir e Cockerham, 1984) aplicado para o modelo de alelos infinitos (IAM; Kimura e Crow, 1964) e o R_{ST} (Slatkin, 1995), que assume o modelo de mutação escalonada (SMM; Kimura e Ohta, 1978). Nós aplicamos, ainda, três novos estimadores de diferenciação genética como o G_{STest} (Nei e Chesser, 1983), G'_{STest} (Hedrick, 2005) e D_{est} (Jost, 2008). Estes estimadores foram analisados utilizando o software SMOGD v1.2.4 (Crawford, 2010). Uma análise de variância molecular (AMOVA; Excoffier *et al.* 1995) foi realizada para as sete populações de pirarucus considerando como única população. A AMOVA foi calculada utilizando o programa ARLEQUIN v3.5 (Excoffier e Lischer, 2010) baseando-se nos resultados do F_{ST} .

Estruturação genética

Na análise da estrutura genética, aplicamos o modelo de mistura (*Admixture*) ancestral que correlaciona a frequência gênica entre as populações utilizando o programa STRUCTURE v2.3.1 (Pritchard *et al.* 2000; Falush *et al.* 2003), com um burn-in de 50.000 seguido por 200.000 passos pelo teste de Monte Carlo em Cadeia de Markov (MCMC). Nós utilizamos o programa STRUCTURE HARVEST v0.6.8

(Earl e Von Holdt, 2011) para verificar o valor do ΔK (sugerido por Evanno *et al.* 2005) que identifica o mais alto nível de hierarquia de divisão genética, dividindo as populações e repetindo as análises para cada divisão. Além disso, realizamos uma corrida para cada análise com $K = 1$ e $K =$ número de amostras de populações +2, com três replicas para cada K . Na complementação das análises de estruturação populacional, aplicamos uma análise de correspondência fatorial – FCA (Benzecri, 1973) utilizando o programa GENETIX v4.05.2 (Belkhir *et al.* 2004), que referencia a distância genética entre as populações, possibilitando identificar possíveis indivíduos *outliers*. Uma matriz de distância e similaridade genética foi construída comparando as populações de pirarucu, relacionando umas com as outras. A partir desses dados construímos uma árvore filogenética a partir do dendrograma de Neighbour-joining (NJ) baseando-se na distância genética (D_A) utilizando o programa GDA v1.1 (Lewis e Zaykin, 2000).

Bottleneck – gargalo populacional

Analizamos os possíveis sinais de gargalos populacionais recentes (excesso de heterozigotos) dentro dos grupos de cativeiro e da natureza utilizando o programa BOTTLENECK (Cornuet e Luikart, 1996; Piry *et al.* 1999). Esta análise foi aplicada para detectarmos gargalos populacionais de não mais do que $2N_E - 4N_E$ por gerações no passado, dependendo da gravidade do gargalo e da taxa de mutação dos locos analisados. Para isso o programa pode aplicar três modelos de mutação para os microssatélites. Neste estudo utilizamos os modelos SMM e TPM por serem os mais adequados para avaliar dados de microssatélites (di Rienzo *et al.* 1994), e para isso aplicamos os seguintes parâmetros 95% (SMM) e 5% (TPM) para as várias etapas de mutação, com variação de 12% entre os vários passos, recomendado por Piry *et al.* (1999).

Deteccção de locos outlier

Para detectarmos possíveis locos que estejam sendo selecionados positivamente (*loci outlier*) utilizamos os softwares: DETSELD v1.0 (Vitalis *et al.*

2003) e LOSITAN (Antao et al. 2008). O software LOSITAN possui em seu programa a ferramenta DFDIST (Beaumont e Nichols, 1996) que gera uma vantagem nas análises dos dados devido ao método Bayesiano desenvolvido por Zhivotovsky (1999). O DFDIST favorece a aplicação do multitest de correção baseado na velocidade da descoberta de falso positivo (FDR) para locos *outlier* descrito por Benjamini e Hochberg (1995). A escolha desses programas levou em consideração a necessidade de compararmos os resultados gerados por estes softwares evitando, com isso, minimizar erros com a presença de locos *outlier* (falso positivo) (Pérez-Figueroa et al. 2010).

RESULTADOS

Polimorfismo dos locos microssatélites e alelos

O teste para o Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) foi realizado para todos os locos de microssatélites. Os locos AG_09 (RDSFB) e AG_15 (RDSM) foram os únicos locos que desviaram significativamente ($P < 0,05$; *correção de Bonferroni* – $0,0004$) para EHW. As análises de desequilíbrio de ligação evidenciaram que não há diferença significativa ($P > 0,05$) entre os pares de locos analisados. O software Micro-Checker evidenciou a possível presença de alelos nulos para os locos AG_03 (PPV) e AG_15 (PPV, RDSFB e RDSM). Um total de 424 alelos foi detectado e o número médio de alelos por loco nos 19 marcadores microssatélites foi de 22,3. As análises detectaram também a ocorrência de 49 alelos privados, sendo que destes 23 apresentavam frequência <5%. Os alelos privados com frequência abaixo de 5% foram detectados em todas as populações analisadas neste estudo. Em geral, estes locos foram polimórficos e o conteúdo de informação de polimorfismo (PIC) variou de 0,198 (AgCAm18) a 0,848 (AgCAm16), com média de 0,571. Treze marcadores apresentaram-se altamente polimórficos, com valores do PIC >0,5.

Diversidade genética

Um resumo da diversidade genética para todas as populações de *A. gigas* que foram testadas pode ser encontrado na Tabela 1 (Suplemento adicional, Tabela S1),

sendo apresentados os seguintes valores dos índices: diversidade alélica (N_a), heterozigocidade observada (\hat{H}_o), e esperada (\hat{H}_e) e o índice de endogamia dentro da população (f). Todos os grupos analisados foram diversos geneticamente para os 19 locos de microssatélites, evidenciando valores para os alelos totais >49 e diversidade gênica >0,380 (Tabela 1). Os pirarucus da Reserva de Desenvolvimento Sustentável de Mamirauá (RDSM) apresentaram uma alta diversidade alélica (4,632; riqueza alélica - AR, 4,258) com um número total de 88 alelos; por outro lado, a população de cativo da Estação de Piscicultura do DNOCS apresentou o menor valor de diversidade alélica (2,632; AR, 2,562) com um número total de 49 alelos, respectivamente. O número de alelos efetivos apresentou variação de apenas um alelo em comparação à riqueza alélica, porém, o número médio de alelos foi similar à riqueza alélica. O excesso de heterozigos (f) foi observado para as sete populações de *A. gigas* investigados. O menor valor de heterozigocidade observada foi detectado para o grupo de piscicultura PPV (0,482) e o maior para PFP₂ (0,695). Os valores de diversidade gênica para todos os grupos variaram de 0,383 (PFP₁) a 0,559 (RDSM).

Diferenciação genética e estrutura populacional

O coeficiente de endocruzamento (f) (Tabela 1) mostrou um excesso de heterozigotos (valor do f negativo) nas populações de *A. gigas* apresentando uma variação nos dados de -0,317 (PFP₂) a -0,035 (RDSM), e estes valores diferiram significativamente de zero ($P < 0,05$). Além disso, dos 19 locos microssatélites analisados, 16 apresentaram excesso de heterozigotos (Tabela 2). O excesso de heterozigotos nas populações de pirarucu pode estar relacionado diretamente a redução do tamanho populacional devido ao efeito fundador nas estações piscicultura. Os valores do F_{ST} corroboram diretamente com os valores encontrados para os índices de diferenciação R_{ST} , G_{Stest} , G'_{Stest} e D_{est} (Tabela 2). Os valores em pares do F_{ST} entre as populações de pirarucu variaram de 13,5% a 36,4%, revelando uma alta diferenciação entre as populações entre os pares do F_{ST} ($P < 0,05$) (Tabela 3). A Tabela 4 mostra os dados gerados na AMOVA por partição nas sete populações de pirarucu de acordo com sua distribuição. Neste caso, encontramos uma alta variação dentro os indivíduos de 84,4% e uma variação de 28,8% entre as populações. No

entanto, encontramos valores negativos nos componentes da variância entre as populações e dentre os indivíduos, influenciando na variação real dentre indivíduos.

Uma análise de agrupamento utilizando a abordagem Bayesiana (STRUCTURE v2.3.1) foi realizada com todo o conjunto de dados com um número crescente de agrupamentos inferidos ($K = 1-7$), sem que houvesse qualquer informação prévia sobre a origem das populações. Os dados apresentaram maior probabilidade de agrupamento para sete populações (Figura 2), sendo que os clusters inferidos basearam-se apenas nas diferenças da frequência alélica. Além disso, o coeficiente de associação média (q) para cada população ($K = 7$) está retratado na Tabela S2. No $K = 7$, as populações de pirarucu apresentaram sua própria aglomeração ($q > 0,9$), verificando que nenhuma população apresentou baixa resolução, indicando ainda que as populações não estão misturadas.

Na análise de correspondência fatorial, o primeiro e o segundo componente apresentaram variação total de 6,61% e 6,32%, respectivamente. O gráfico de dispersão para os dados do primeiro e segundo componentes estão apresentados na Figura 3. O primeiro componente teve tendência a separar as populações PFP₁, PFP₂, PFP₃ e DNOCS ($Axe_1 < 0$) para o grupo de cativo. O segundo componente separou os grupos PFP₁, PFP₃, RSDFB e RDSM ($Axe_2 < 0$) para as outras populações (cativo e selvagem). Além disso, observamos uma separação das populações selvagens no quadrante 2 ($Axe_2 < 0$). Os resultados da Análise de Correspondência Fatorial estão em concordância com o dendrograma de UPGMA obtida neste estudo (Figura 3 e 4).

Distância e similaridade genética

A matriz de distância e similaridade genética está apresentada na Tabela 3. A distância genética (D_A) entre as populações de pirarucu revelou uma variação de 0,238 (RSDFB-RDSM) a 0,515 (PFP₃-PPV) e uma similaridade genética variando de 0,597 (PFP₃-PPV) a 0,788 (RSDFB-RDSM), respectivamente. Um dendrograma de UPGMA foi construído tendo como base a distância genética com relativos valores de bootstrap, sendo observada a separação em dois grupos as populações de pirarucu (Figura 4).

Bottleneck – gargalo populacional e locos outlier

Neste estudo encontramos indicação de gargalo populacional recente em todas as populações de *A. gigas* analisadas. Os testes Sign e Wilcoxon apresentaram excesso significativo de heterozigotos para o modelo mutacional TPM, porém, somente as populações de cativo apresentaram excesso de heterozigotos para o teste Sign. O modelo mutacional SMM foi significativo somente para o teste Wilcoxon e nas populações PFP₂ e PFP₃, respectivamente. O software Lositan identificou a presença de seis marcadores microssatélites candidatos a locos *outlier* (Figura 5), com valores de F_{ST} variando de 0,338 a 0,434 (Tabela S3), enquanto os demais locos se mostraram como marcadores neutros.

DISCUSSÃO

As análises genéticas nas sete populações de *A. gigas* utilizando 19 marcadores microssatélites revelaram que a maioria dos marcadores foi altamente polimórficos, com 13 locos apresentando valores de PIC > 0,5 (Tabela 2). Os resultados também revelaram a ocorrência de uma moderada diversidade genética nas populações de pirarucu, indicando que os exemplares da Reserva de Desenvolvimento Sustentável de Fonte Boa e Mamirauá apresentam para estes dados um maior potencial evolutivo em comparação aos exemplares de cativo. Segundo Ellegren e Sheldon (2008), as populações estão normalmente em equilíbrio evolutivo, porém, respostas evolutivas podem estar sendo escondidas devido a deterioração do ambiente.

O excesso de heterozigotos foi verificado para todas as populações de pirarucu (Tabela 1), sendo que os locos AgCTm4, AgCAm4, AG_11, AG_12 e AG_13 foram os únicos que apresentaram $f < 0$ (ver Tabela S1) para todas as populações. Destacamos ainda que o loco AgCAm16 foi o único que apresentou carência de heterozigotos para todas as populações e, mesmo assim, o valor de f foi próximo de zero. Encontramos uma riqueza alélica neste estudo >3 para populações selvagens (RDSFB e RDSM) e <3 para populações de cativo, sendo os valores não muito distantes do encontrado

por Silva (2008) para exemplares de pirarucu nos lagos de Jarauá, Maraã e RDSM. Os níveis de variabilidade genética observados neste estudo podem ser considerados moderados em comparação com os encontrados por Hrbek *et al.* (2005; 2007), que constataram existir uma alta variabilidade genética com elevado fluxo gênico entre as populações de pirarucu da bacia amazônica. Trabalhos realizados por Farias *et al.* (2003) e Santos *et al.* (2011 in Molecular Ecology Resources Primer Consortium *et al.* 2011) também detectaram alto nível de variabilidade genética para os locos microssatélites isolados para o pirarucu, sendo estes locos utilizados neste estudo.

A média da diferenciação genética entre todas as populações (F_{ST}) foi de 28,8% ($P < 0,05$), revelando uma alta discriminação entre as sete populações de pirarucu investigados pelos 19 marcadores microssatélites. Porém, verificamos que os índices R_{ST} , G_{Stest} , G'_{Steste} e D_{est} apresentaram correlação com o índice F_{ST} (Tabela 2). Estes níveis de diferenciação genética eram esperados, pois os lotes de cativeiro de *A. gigas* eram provenientes exclusivamente de apenas um casal de reprodutores, algo bastante comum nas estações de piscicultura. Teixeira (2008) relata que juvenis de pirarucu capturados na natureza em conjunto podem ser descendentes de um único par de peixes, e isso não seria representativo para a população total dessa espécie na bacia amazônica. A comparação entre os pares do F_{ST} mostram uma variação de 0,135 (RDSFB-RDSM) a 0,338 (PFP₁-PPV) entre as populações analisadas (Tabela 3), demonstrando que as populações de cativeiro tendem a diferir geneticamente em comparação às populações da natureza devido ao isolamento reprodutivo das pisciculturas. Hrbek *et al.* (2007) verificaram que a alta variabilidade genética nos pirarucus está diretamente relacionada com a baixa diferenciação genética encontrada dentro das localidades para as populações de pirarucu na natureza. Hedrick (1999) relatou que o cálculo do F_{ST} em microssatélites altamente polimórficos pode ser subestimado, e isso pode influenciar a proporção de heterozigotos em subpopulações quando comparados com a população total. Diante disso, Hartl e Clark (2010) relataram que a estimativa da estatística F deve corrigir os efeitos de amostragens e do número limitado de subpopulações, e neste caso, novos índices proporcionariam a realização dessas correções. No entanto, os resultados de diferenciação genética encontrados no presente trabalho sugerem que as estratégias adotadas na formação de casais, o efeito fundador, a deriva genética e o isolamento reprodutivo entre as

pisciculturas contribuíram significativamente para a alta diferenciação entre as populações de pirarucu analisadas.

A análise de variância molecular (AMOVA) mostrou que a maior parte da variação está dentro os indivíduos, enquanto que somente 28,8% dessa variação se apresenta entre as populações (Tabela 4). Hedrik (2001) relata que a extensão e o padrão da variação molecular dentro de uma determinada população consistem geralmente com uma variação neutra, ou seja, um equilíbrio previsto por uma redução na variação da deriva genética e um aumento na variação da mutação. Diante disso, mesmo quando uma população é pequena, a seleção pode estar atuando sobre a variação em um determinado gene, porém, a deriva genética estaria atuando com um efeito maior sobre a frequência dos alelos do que a própria seleção. Neste contexto, observamos a ocorrência de um gargalo genético populacional recente nos grupos de cativeiro e natureza de pirarucu, e isso provavelmente deve ter ocorrido na formação do estoque fundador ou na primeira geração como mostra os dados de microssatélites (Teste de Sign e Wilcoxon). Além disso, verificamos que a frequência dos heterozigotos observados entre as populações foi estatisticamente diferente como era esperado para a mutação deriva-equilíbrio. Segundo Cornuet e Luikart (1996), esse fato é esperado quando um estoque sofre um gargalo populacional recente. Verpoor (1988) relata, ainda, que pontos de estrangulamento devido ao pequeno número de criadores são comuns em criatórios de estoques comerciais.

Implicações no manejo e conservação

Em um contexto mais amplo, verificamos uma necessidade mundial de conservarmos os recursos genéticos do planeta, e para isso, é necessário que possamos manter a diversidade genética dos organismos propondo medidas que possam minimizar os efeitos das mudanças genéticas dentro de uma dada população biológica (Boettcher *et al.* 2010). Neste contexto, uma medida a ser adotada seria a manutenção e conservação da riqueza alélica preservando, principalmente, os alelos raros presentes dentro de cada população (Pérez-Ruzafa *et al.* 2006). Entretanto, essa medida deveria levar em consideração as prováveis mudanças no ambiente de produção (Boettcher *et al.* 2010). Além disso, Laikre *et al.* (2009) relataram que a

genética é uma importante ferramenta para a interpretação do status de conservação favorável às espécies ameaçadas.

Nós identificamos uma moderada diversidade genética e um gargalo populacional recente nas populações de pirarucu, indicando um possível declínio populacional recente para os grupos selvagens, bem como a formação de planteis de reprodutores por um pequeno número de fundadores nas estações de pisciculturas. Diante disso, nós sugerimos a realização de um manejo mais detalhado nos planteis de reprodutores, bem como o monitoramento periódico nas populações selvagens. Hrbek *et al.* (2005) já propunha em seu trabalho a utilização de um grande grupo de pirarucu como matrizes (fundadores) em estações de pisciculturas, independente de sua origem geográfica, minimizando com isso a perda potencial da diversidade genética devido ao efeito fundador. Além disso, foi sugerido que populações confinadas fossem complementadas com exemplares selvagens de áreas selecionadas, mantendo-se, com isso, a diversidade genética máxima nos sistemas de confinamento. No entanto, vemos também como necessário a realização de rodízio entre matrizes de pirarucu dentro e entre as estações de pisciculturas, como uma forma de mantermos o potencial evolutivo na espécie, proporcionando, com isso, uma maior capacidade de adaptação dos indivíduos ao sistema de cativeiro. Outra medida a ser adotada seria a distribuição de alevinos de pirarucu proveniente de vários casais, porém, devemos evitar ao máximo a formação de casais aparentados, pois futuramente poderia comprometer a variabilidade genética dos lotes de pirarucu para distribuição. Diante do que foi exposto, sugerimos que seja realizado um acompanhamento não somente genético, mas também da distribuição e origem dos animais que irão compor os planteis de reprodutores.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Laboratório de Evolução e Genética Animal (LEGAL/UFAM) e ao Departamento Nacional de Obras Contrás as Secas (DNOCS, CE) por terem disponibilizados amostras de pirarucu para a realização deste trabalho. O autor CHAS agradece ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa de doutorado. VMFAV, IPF e ALV agradecem ao

CNPq pelas bolsas de Produtividade em Pesquisa. Este trabalho é parte do INCT ADAPTA, coordenado por Adalberto Luis Val.

BIBLIOGRAFIA CITADA

Amaral J.S. (2009) *Esteróides gonadais e metabolismo lipídico ao longo do ciclo reprodutivo de Arapaima gigas (Schinz, 1822) em ambiente natural. Dissertação (Mestrado em Ciências) 152. Universidade de São Paulo, Instituto de Biociências, São Paulo, Brasil.*

Antao T., Lopes A., Lopes R.J., Beja-Pereira A. & Luikart G. (2008) LOSITAN: a workbench to detect molecular adaptation based on a F_{ST} -outlier method. *BMC Bioinformatics* **9**, 323. doi:10.1186/1471-2105-9-323.

Arantes C.C., Castello L. & Garcez D.S. (2007) Variações entre contagem de *Arapaima gigas* (Schinz) (Osteoglossomorpha, Osteoglossidae) feitas por pescadores individualmente em Mamirauá, Brasil. *Pan-American Journal of Aquatic Sciences* **2(3)**, 263-269.

Ardura A., Linde A.R., Moreira J.C. & Garcia-Vazquez E. (2010) DNA barcoding for conservation and management of Amazonian commercial fish. *Biological Conservation* **143**, 1438-1443.

Barletta M., Jaureguizar A.J., Baigun C., Fontoura F.N., Agostinho A.A., Almeida-Val V.M.F., Val A.L., Torres R.A., Jimenes-Segura L.F., Giarrizzo T., Fabré N.N., Batista V.S., Lasso C., Taphorn D.C., Costa M.F., Chaves P.T., Vieira J.P. & Corrêa M.F.M. (2010) Fish and aquatic habitat conservation of South America: a continental overview with emphasis on neotropical fishes. *Journal of Fish Biology* **76**, 2118-2176.

Beaumont M.A & Nichols R.A. (1996) Evaluating loci for use in the genetic analysis of population structure. *Proceedings of the Royal Society B* **363**, 1619-1626.

Belkhir K., Borsa P., Chikhi L., Raufaste N. & Bonhomme F. (2004) *GENETIX 4.05, logiciel sous Windows TM pour la génétique des populations*. Laboratoire Génome, Populations, Interactions, CNRS UMR 5171, Université de Montpellier II, Montpellier (France).

Benjamini Y & Hochberg Y. (1995) *Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing*. *Journal of the Royal Statistical Society Series B*, **57**, 289-300.

Benzecri J.P. (1973) *L'Analyse des donnees*. vol 2: L'Analyse des Correspondances Dunod, Paris.

Boettcher P.J., Tixier-Boichard M., Toro M.A., Simianer H., Eding H., Gandini G., Joost S., Garcia D., Colli L., Ajmone-Marsan P. & GLOBALDIV Consortium. (2010) Objectives, criteria and methods for using molecular genetic data in priority setting for conservation of animal genetic resources. *Animal Genetics* **41**, 64-77.

Buckup P.A., Menezes N.A. & Ghazzi M. (2007) *Catálogo das espécies de peixes de água doce do Brasil*. Museu Nacional, Rio de Janeiro, BR. 195p.

Castello L. (2004) A method to count pirarucu: fishers, assessment and management. *North American Journal of Fisheries Management* **24**, 379-389.

Castello L. (2008) Lateral migration of *Arapaima gigas* in floodplains of the Amazon. *Ecology of Freshwater Fish* **17**, 38-46.

Cornuet J.M. & Luikart G. (1996) Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data. *Genetics* **144**, 2001-2014.

Crawford N.G. (2010) SMOGD: software for the measurement of genetic diversity. *Molecular Ecology Resources* **10**, 556-557.

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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **91**, 3166-3170.

Earl D.A. & von Holdt B.M. (2011) Structure Harvester: a website and program for visualizing structure output and implementing the Evanno method. *Conservation Genetics Resources* doi: 10.1007/s12636-011-9548-7.

Ellegren H. & Sheldon B.C. (2008) Genetic basis of fitness differences in natural populations. *Nature* **452**, 169-175.

Evanno G., Regnaut S. & Goudet J. (2005) Detecting the number of clusters of individuals using the software structure: a simulation study. *Molecular Ecology*, **14(8)**, 2611-2620.

Excoffier L. & Lischer H.E.L. (2010) Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources* **10**, 564-567.

Excoffier L., Laval G. & Schneider S. (2005) Arlequin 3.01: An integrated software package for population genetics data analysis. *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., Harbek 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.

Goudet J. (2001) FSTAT, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices (version 2.9.3.2). Updated from Goudet J. (1995). FSTAT, a computer program to calculate F-statistics. *Journal of Heredity* **86**, 485-486.

Goulding M. (1980) *The fishes and the forest*. University of California Press, Los Angeles, USA, 200p.

Hartl D.L. & Clark A.G. (2010) *Princípios de genética de populações*. In: Utz L.R.P., Borges-Osório M.R. & Fagundes N.J.R. (tradutores). 4º edição, Porto Alegre: Artmed, 660p.

Hedrick P.W. (1999) Perspective: highly variable loci and their interpretation in evolution and conservation. *Evolution* **53**, 313-318.

Hedrick P.W. (2001) Conservation genetics: where are we now? *Trends in Ecology & Evolution* **16(11)**, 629-636.

Hedrick P.W. (2005) A standardized genetic differentiation measure. *Evolution* **59**, 1633-1638.

Hrbek T., Crossa M. & Farias I.P. (2007) Conservation strategies for *Arapaima gigas* (Schinz, 1822) and the Amazonian várzea ecosystem. *Brazilian Journal of Biology* **67(4)**, 909-917.

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.

Jost L. (2008) G_{ST} and its relatives do not measure differentiation. *Molecular Ecology* **17(18)**, 4015-4026.

Kalinowski S.T., Taper M.L. & Marshall T.C. (2007) Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. *Molecular Ecology* **16**, 1099-1106.

Kimura M. & Crow J. (1964) The number of alleles that can be maintained in a finite population. *Genetics* **49**, 725-738.

Kimura M. & Ohta T. (1978) Stepwise mutation model and distribution of allelic frequencies in a finite population. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **75**, 2868-2872.

Laikre L., Nilsson T., Primmer C.R., Ryman N. & Allendorf F.W. (2009) Importance of genetics in the interpretation of favourable conservation status. *Conservation Biology* **23(6)**, 1378-1381.

Lévêque C., Oberdorff T., Paugy D., Stiassny M.J.L. & Tedesco P.A. (2008) Global diversity of fish (Pisces) in freshwater. *Hidrobiologia* **595**, 545-567.

Lewis PO, Zaykin D. (2000). *Genetic Data Analysis: computer program for the analysis of allelic Data*, Version 1.0. (d15). University of Connecticut, Storrs, Connecticut.

Marques D.K., Venere P.C. & Galetti-Júnior P.M. (2006) Chromosomal characterization of the bonytongue *Arapaima gigas* (Osteoglossiformes: Arapaimidae). *Neotropical Ichthyology* **4(2)**, 215-218.

Menezes N.A. (1996) Methods for assessing freshwater fish diversity. In: Bicudo C.E.M. & Menezes N.A. (Eds.). *Biodiversity in Brazil*. Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, CNPq, São Paulo, BR. 289-295p.

Molecular Ecology Resources Primer Development Consortium., Agata K., Alassad S., Almeida-Val V.M.F., Álvarez-Dios J.A., Barbisan F., Beadell J.S., Beltrán J.F., Benítez M., Bino G., Bleay C., Bloor P., Bohlmann J., Booth W., Boscari E., Caccone A., Campos T., Carvalho B.M., Clímaco G.T., Clobert J., Congiu L., Cowger C., Dias G., Doadrio I., Farias I.P., Ferrand N., Freitas F.D., Fusco G., Galetti P.M., Gallardo-Escárate C., Gaunt M.W., Ocampo Z.G., Gonçalves H., Gonzales E.G., Haye P., Honnay O., Hyseni C., Jacquemyn H., Jowers M.J., Kakezawa A., Kawagushi E., Keeling C., Kwan Y-S., la Spina M., Lee W-O., Lesniewska M., Li Y., Liu H., Liu X., Lopes S., Martínez P., Meeus S., Murray B.W., Nunes A.G., Okedi L.M., Ouma J.O., Pardo B.G., Parks R., Paula-Silva M.N., Pedraza-Lara C., Perera O.P., Pino-Querido A., Richard M., Rossini B.C., Samarasekera N.G., Sánchez A., Sanchez J.A., Santos C.H.A., Shinohara W., Soriguer R.C., Sousa A.C.B., Sousa C.F.S., Steves V.M., Tejedó M., Valenzuela-Bustamante M., van de Vliet M.S., Vandepitte K., Vera M., Wandeler P., Wang W., Won Y-J., Yamashiro A., Yamashiro T. & Zhu C. (2011) Permanent genetic resources added to molecular ecology resources database 1 December 2010 – 31 January 2011. *Molecular Ecology Resources* **11**, 586-589.

Nei M. & Chesser R.K. (1983) Estimation of fixation indices and gene diversities. *Annals of Human Genetics* **47(3)**, 253-259.

Oliveira V., Poletto S.L. & Venere P.C. (2005) Feeding of juvenile pirarucu (*Arapaima gigas*, Arapaimidae) in their natural environment, lago Quarto Bocas, Araguaiana – MT, Brazil. *Neotropical Ichthyology* **3(2)**, 312-314.

Ortiz W.S., Salcedo R.D.L., Ruíz L.C. & Macías J.N.L. (2007) Potencial acuícola de pirarucu (*Arapaima gigas*) em la cueca Amazónica. *Revista Electrónica de Ingeniería en Producción Acuícola* **2**, 75-83.

Pérez-Figueroa A., García-Pereira M.J., Saura M., Rolán-Alvarez E. & Caballero A. (2010) Comparing three different methods to detect selective loci using dominant markers. *Journal of Evolutionary Biology* **23**, 2267-2276.

Pérez-Ruzafa A., González-Wangüemert M., Lenfant P., Marcos C. & García-Charton J.A. (2006) Effects of fishing protection on the genetic structure of fish populations. *Biological Conservation* **129**, 244-255.

Piry S., Luikart G. & Cornuet J.M. (1999) Bottleneck: a computer program for detecting recent reductions in the effective population size using allele frequency data. *Journal of Heredity* **90**, 502-503.

Pritchard J.K., Stephens M. & Donnelly P. (2000) Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* **155**, 945-959.

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

Sambrook J., Fritsch E.F. & Maniatis T. (1989) *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, New York.

Santos C.H.A., Clímaco G.T., Sousa C.F.S., Paula-Silva M.N., Sousa A.C.B., Farias I.P., Campos T. & Almeida-Val V.M.F. (2011) Development and characterization of microsatellite loci in *Arapaima gigas*, an important neotropical fish. *Molecular Ecology Resources* **11**, 586-589.

Santos, C.H.A., Leitão M.A.B., Sousa C.F.S., Santana G.X., Paula-Silva M.N. & Almeida-Val V.M.F. (2012) Genetic variability of wild and captivity populations of *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818). *Acta Scientiarum Biological Sciences* (prelo).

Schuelke M. (2000) An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. *Nature Biotechnology*, **18**: 233-234.

Silva J.A.G. (2008) *Genética de populações de pirarucus (Arapaima gigas) da Reserva de Mamirauá e considerações sobre a estrutura genética para a espécie. Tese (Doutorado em Zoologia) 101*. Museu Paraense Emilio Goeldi, Universidade Federal do Pará, Belém, Brasil.

Slatkin M.A. (1995) A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies. *Genetics* **130**, 457-462.

Teixeira A.S. (2008) The monotony of transferrin and esterase electrophoretic patterns in pirarucu, *Arapaima gigas* (Schinz, 1822) from Santa Cruz lake, Tefé River, Amazonas, Brazil. *Genetics and Molecular Resources* **7(2)**, 407-416.

van Oosterhout C., Hutchinson W.F., Wills D.P.M. & Shipley P. (2004) Micro-Checker: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes*, **4**, 535-538.

Verspoor E., McCarthy E.M. & Knox, D. (1999) The phylogeography of European Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) based on RFLP analysis of the ND1/16S RNA region of the mtDNA. *Biological Journal of the Linnean Society* **68**, 129-146.

Viana J.P., Castello L., Damasceno J.M., Amaral E.S.R., Estupiñán G., Arantes C.C., Batista G., Garcez D.S. & Barbosa S. (2007) Manejo comunitário do pirarucu *Arapaima gigas* na Reserva de Desenvolvimento Sustentável de Mamirauá, Amazonas, Brasil. In: Viana J.P., Castello L., Damasceno J.M., Amaral E.S.R., Estupiñán G., Arantes C.C., Batista G., Garcez D.S. & Barbosa S. (Org.). *Áreas protegidas como instrumento de gestão pesqueira*. Núcleo da Zona Costeira Marinha, Brasília, BR. 4: 239-261.

Vitalis R., Dawson K., Boursot P. & Belkhir K. (2003) DetSel 1.0: a computer program to detect markers responding to selection. *Journal of Heredity* **94(5)**, 429-431.

Wasko A.P., Martins C., Oliveira C., Senhorini J.A. & Foresti F. (2004) Genetic monitoring of the Amazonian fish matrinhã (*Brycon cephalus*) using RAPD markers: insights into supporting and conservation programmes. *Journal of Applied Ichthyology* **20**, 48-52.

Weir B.S. & Cockerham C.C. (1984) Estimating F statistics for the analysis of population structure. *Evolution: International Journal of Organic Evolution* **38**, 1358-1370.

Zhivotovsky L.A. (1999) Estimating population structure in diploids with multilocus dominant DNA markers. *Molecular Ecology* **8**, 907-913.

Tabela 1. Índices da diversidade genética em populações de cativo e selvagens de *Arapaima gigas* na Amazônia brasileira com base em 19 locos microssatélites.

Origem	Populações	n	Diversidade alélica				Diversidade genética			
			TNA	MNA	NEA	NPA	AR	\hat{H}_e	\hat{H}_o	f
Cativo	PFP ₁	47	51	2,684	1,621	5	2,587	0,383	0,473	-0,225**
	PFP ₂	18	59	3,105	2,066	9	3,060	0,516	0,695	-0,317**
	PFP ₃	32	52	2,737	1,852	4	2,680	0,460	0,551	-0,179**
	DNOCS	30	49	2,632	1,730	3	2,562	0,422	0,542	-0,266**
	PPV	48	50	2,684	1,684	5	2,567	0,406	0,482	-0,177**
Selvagem	RDSFB	18	75	3,947	2,004	7	3,815	0,501	0,559	-0,085 ^(1*) **
	RDSM	28	88	4,632	2,268	16	4,258	0,559	0,591	-0,035 ^(1*) **

n, tamanho da amostra; TNA, número total de alelos; MNA, número médio de alelos; NEA, número de alelos efetivos; NPA, número de alelos privados; AR, riqueza alélica; \hat{H}_e , diversidade gênica (heterozigosidade esperada em Equilíbrio de Hardy-Weinberg); \hat{H}_o , heterozigosidade observada; f , coeficiente de endocruzamento populacional; (n*) número de locos que desviaram para o Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW).; Nível de significância, ** $P < 0,05$.

Tabela 2. Valores obtidos para os índices da Estatística-*F* e diferenciação genética para as sete populações de *Arapaima gigas* da Amazônia brasileira com base em 19 locos microssatélites.

Locos	<i>PIC</i>	<i>F_{IT}</i>	<i>F_{IS}</i> (<i>f</i>)	<i>F_{ST}</i>	<i>R_{ST}</i>	<i>G_{Sest}</i>	<i>G'_{Sest}</i>	<i>D_{est}</i>
AgCTm1	0,454	0,381	-0,106*	0,441*	0,544	0,358	0,534	0,275
AgCTm3	0,657	0,157*	-0,155*	0,270*	0,430	0,204	0,526	0,405
AgCTm4	0,707	-0,214	-0,425	0,148*	0,855	0,143	0,495	0,410
AgCTm5	0,823	0,347	-0,064*	0,387*	0,440	0,306	0,828	0,752
AgCTm7	0,235	0,214*	0,097	0,130*	0,160	0,113	0,148	0,039
AgCTm8	0,557	0,225*	-0,430	0,458*	0,411	0,397	0,645	0,411
AgCam4	0,299	-0,210	-0,572	0,230*	0,230	0,192	0,285	0,115
AgCam16	0,848	0,420	0,091	0,362*	0,347	0,305	0,860	0,798
AgCam18	0,198	-0,008*	-0,080*	0,067*	0,083	0,052	0,068	0,017
AgCam26	0,623	-0,080*	-0,174*	0,216*	0,152	0,162	0,426	0,315
AG_01	0,756	0,277*	-0,110*	0,349*	0,335	0,306	0,754	0,646
AG_02	0,447	0,179*	0,012	0,169*	0,156	0,174	0,343	0,205
AG_03	0,628	0,036*	-0,298*	0,257*	0,106	0,190	0,463	0,337
AG_07	0,653	0,128*	-0,192	0,268*	0,192	0,219	0,545	0,418
AG_09	0,600	0,297	-0,034	0,320*	0,433	0,265	0,577	0,424
AG_11	0,462	0,040*	-0,238*	0,225*	0,326	0,203	0,370	0,210
AG_12	0,733	0,243*	-0,224*	0,382*	0,366	0,330	0,745	0,620
AG_13	0,726	-0,213	-0,501	0,192*	0,135	0,162	0,486	0,387
AG_15	0,452	0,337	0,110	0,255*	0,408	0,257	0,470	0,286
Total	0,571	0,156	-0,185	0,288	0,327	-	-	-

PIC, Conteúdo de Informação de Polimorfismo; *F_{IT}*, índice de fixação total da população; *F_{IS}*, índice de fixação de subpopulações; *F_{ST}*, índice de fixação resultando para comparação de subpopulações para o total de populações; *R_{ST}*, análogo do *F_{ST}* para marcadores microssatélites; *G_{Sest}*, estimador da diferenciação relativa; *G'_{Sest}*, medida padronizada da diferenciação genética; *D_{est}*, estimador da diferenciação atual.

Nível de significância, **P* < 0,05.

Tabela 3. Distância (D_A) e identidade genética (D_I) (Nei, 1972) na diagonal abaixo e F_{ST} (Weir e Cockerham, 1984) na diagonal acima entre as populações de *Arapaima gigas* da Amazônia brasileira com base em 19 locos microssatélites.

	PFP1	PFP2	PFP3	DNOCS	PPV	RDSFB	RDSM
PFP1	-	0,278	0,255	0,338	0,364	0,318	0,299
PFP2	0,363 (0,696)	-	0,270	0,265	0,284	0,223	0,230
PFP3	0,293 (0,746)	0,465 (0,628)	-	0,280	0,341	0,242	0,241
DNOCS	0,433 (0,649)	0,403 (0,668)	0,389 (0,678)	-	0,312	0,298	0,266
PPV	0,485 (0,616)	0,412 (0,662)	0,515 (0,597)	0,408 (0,665)	-	0,261	0,299
RDSFB	0,452 (0,636)	0,405 (0,667)	0,384 (0,681)	0,482 (0,618)	0,352 (0,703)	-	0,135
RDSM	0,459 (0,632)	0,490 (0,612)	0,431 (0,650)	0,452 (0,636)	0,500 (0,606)	0,238 (0,788)	-

Tabela 4. Resultados da análise de variância molecular (AMOVA) para as sete populações de *Arapaima gigas* da Amazônia brasileira com base em 19 locos microssatélites.

Fonte de Variação	Soma dos Quadrados	Componentes da Variância	Porcentagem da Variação	p-valor
Entre as populações	571,085	1,748 (F_{ST})	28,798	0,000*
Dentre os indivíduos	637,113	-0,801 (F_{IS})	-13,193	1,000
Dentre os indivíduos	964,500	5,121 (F_{IT})	84,396	0,000*
Total	2.172,698	6,068		

* $P < 0,05$ indica diferença estatística significativa



Figura 1. Localização geográfica dos locais de coletas das amostras de *Arapaima gigas* na Amazônia brasileira nas regiões Norte e Nordeste do Brasil. (A) Departamento Nacional de Obras Contra as Secas (DNOCS), Pentecoste - Ceará; (B) Piscicultura Porto Velho (PPV), Porto Velho - Rondônia; (C) Reserva de Desenvolvimento Sustentável de Mamirauá (RDSM), Tefé - Amazonas; (D) Reserva de Desenvolvimento Sustentável de Fonte Boa (RDSFB), Fonte Boa – Amazonas e (E) Piscicultura FrigoPesca (FPF_{1, 2 e 3}), Manacapuru – Amazonas.

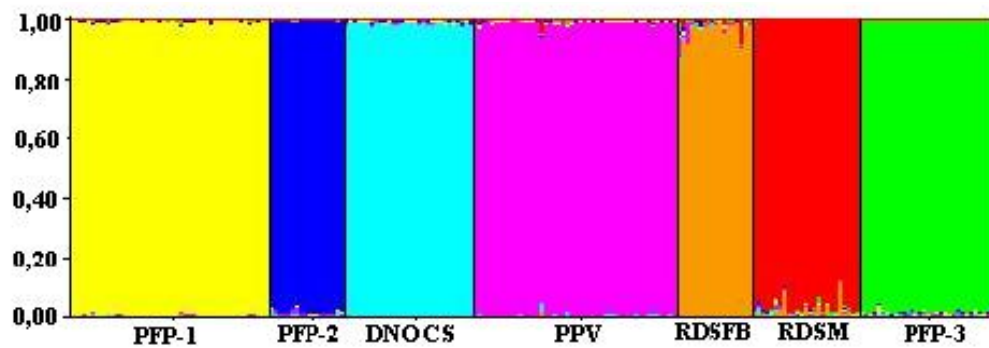


Figura 2. Análise de estruturação de sete populações de *Arapaima gigas* da Amazônia brasileira com base em 19 locos microssatélites e assumindo um $K = 7$.

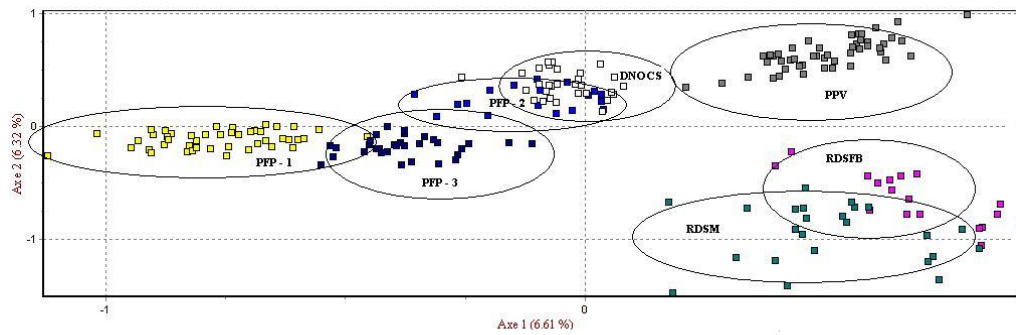


Figura 3. Componente de Análise Fatorial (FCA) das populações de cativeiro e selvagem de *Arapaima gigas* da Amazônia brasileira com base em 19 locos microssatélites. Axe 1 (6,61%) e Axe 2 (6,32%) representam os primeiros dois Componentes Fatorial, respectivamente.

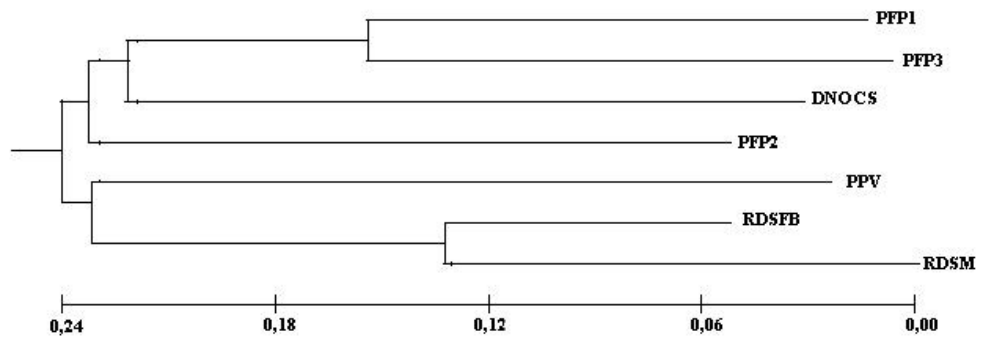


Figura 4. Dendrograma de Neighbour-joining (NJ) para as populações de cativo e selvagem de *Arapaima gigas* da Amazônia brasileira com base em 19 locos microssatélites.

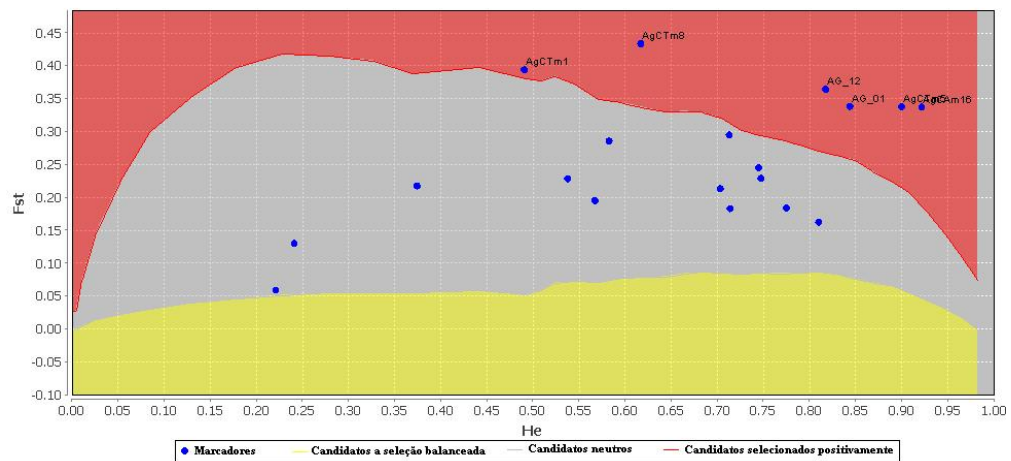


Figura 5. Detecção de locos *outlier* em populações de cativo e selvagem de *Arapaima gigas* da Amazônia brasileira baseado em 19 locos microssatélites.

Tabela S1. Informações dos parâmetros básicos para a diversidade genética associadas com as populações de pirarucus da Amazônia brasileira com base em 19 locos microssatélites.

Locos	Populações						
	Cativoiro			Natureza			
	PPF ₁	PPF ₂	PPF ₃	DNOCS	PPV	RDSFB	RDSM
AgCTm1							
\hat{H}_O	0,540	0,944	0,040	0,000	0,381	0,133	0,300
\hat{H}_e	0,470	0,577	0,039	0,000	0,363	0,124	0,460
A	2,000	5,000	2,000	1,000	2,000	2,000	3,000
\hat{A}_e	1,887	2,364	1,040	1	1,570	1,142	1,852
F	-0,136	-0,619	0,000	-	-0,038	-0,037	0,370
AgCTm3							
\hat{H}_O	0,667	0,714	0,875	0,654	0,512	0,786	0,348
\hat{H}_e	0,552	0,766	0,650	0,587	0,414	0,566	0,401
A	3,000	5,000	4,000	3,000	3,000	4,000	4,000
\hat{A}_e	2,232	4,274	2,857	2,421	1,706	2,304	1,669
F	-0,195	0,103	-0,327	-0,095	-0,226	0,355	0,154
AgCTm4							
\hat{H}_O	1,000	1,000	0,926	1,000	0,775	0,875	0,947
\hat{H}_e	0,636	0,611	0,593	0,680	0,537	0,793	0,813
A	4,000	4,000	3,000	4,000	3,000	7,000	7,000
\hat{A}_e	2,747	2,571	2,457	3,125	2,160	4,831	5,348
F	-0,563	-0,615	-0,625	-0,454	-0,434	-0,071	-0,139
AgCTm5							
\hat{H}_O	0,667	0,722	0,478	0,654	0,244	0,611	0,920
\hat{H}_e	0,554	0,619	0,593	0,499	0,219	0,775	0,818
A	3,000	3,000	4,000	3,000	3,000	6,000	10,000
\hat{A}_e	2,242	2,625	2,457	1,996	1,280	4,444	5,494
F	-0,193	-0,139	0,214	-0,242	-0,102	0,238	-0,104
AgCTm7							
\hat{H}_O	0,000	0,000	0,000	0,083	0,364	0,556	0,417
\hat{H}_e	0,000	0,000	0,000	0,079	0,469	0,438	0,448
A	1,000	1,000	1,000	2,000	3,000	3,000	3,000
\hat{A}_e	1,000	1,000	1,000	1,086	1,883	1,779	1,812
F	-	-	-	-0,022	0,236	-0,241	0,091
AgCTm8							
\hat{H}_O	0,526	0,875	0,577	0,040	0,650	1,000	0,000
\hat{H}_e	0,410	0,492	0,482	0,039	0,466	0,500	0,000
A	3,000	2,000	2,000	2,000	2,000	2,000	1,000
\hat{A}_e	1,695	1,968	1,930	1,040	1,873	2,000	1,000
F	-0,271	-0,765	-0,179	0,000	-0,383	-1,000	-
AgCAm4							
\hat{H}_O	0,000	0,500	0,222	0,923	0,674	0,000	0,840
\hat{H}_e	0,000	0,375	0,198	0,497	0,447	0,000	0,487
A	1,000	2,000	2,000	2,000	2,000	1,000	2,000
\hat{A}_e	1,000	1,600	1,247	1,988	1,808	1,000	1,949
F	-	-0,300	-0,106	-0,852	-0,500	-	-0,714
AgCAm16							
\hat{H}_O	0,425	0,533	0,556	0,458	0,585	0,706	0,550
\hat{H}_e	0,429	0,560	0,578	0,478	0,608	0,808	0,714
A	3,000	3,000	3,000	3,000	3,000	8,000	5,000
\hat{A}_e	1,751	2,273	2,370	1,916	2,551	5,208	3,496
F	0,021	0,082	0,058	0,063	0,050	0,156	0,254

AgCAm18							
\hat{H}_O	0,000	0,357	0,259	0,423	0,275	0,000	0,250
\hat{H}_e	0,000	0,304	0,226	0,429	0,237	0,000	0,224
A	1,000	3,000	2,000	3,000	2,000	1,000	3,000
\hat{A}_e	1,000	1,437	1,292	1,751	1,311	1,000	1,289
F	-	-0,140	-0,130	0,033	-0,147	-	-0,092
AgCAm26							
\hat{H}_O	0,610	0,938	0,731	0,625	0,462	0,824	0,636
\hat{H}_e	0,495	0,623	0,659	0,640	0,380	0,644	0,548
A	3,000	3,000	3,000	3,000	3,000	6,000	4,000
\hat{A}_e	1,980	2,652	2,932	2,778	1,613	2,809	2,212
F	-0,220	-0,480	-0,089	0,044	-0,201	-0,251	-0,140
AG_01							
\hat{H}_O	0,456	0,929	0,581	0,440	0,727	0,733	0,591
\hat{H}_e	0,416	0,600	0,564	0,343	0,664	0,624	0,606
A	3,000	3,000	3,000	2,000	3,000	3,000	3,000
\hat{A}_e	1,712	2,500	2,293	1,522	2,976	2,660	2,538
F	-0,087	-0,523	-0,013	-0,263	-0,083	-0,141	0,049
AG_02							
\hat{H}_O	0,372	0,533	0,370	0,440	0,349	0,438	0,524
\hat{H}_e	0,313	0,580	0,417	0,385	0,318	0,482	0,622
A	3,000	3,000	2,000	2,000	2,000	2,000	3,000
\hat{A}_e	1,456	2,381	1,715	1,626	1,466	1,930	2,646
F	-0,176	0,115	-0,123	-0,088	0,125	0,182	0,130
AG_03							
\hat{H}_O	0,575	1,000	0,967	0,720	0,405	0,938	0,579
\hat{H}_e	0,434	0,635	0,499	0,518	0,544	0,691	0,460
A	3,000	4,000	2,000	3,000	3,000	6,000	4,000
\hat{A}_e	1,767	2,740	1,996	2,075	2,193	3,236	1,852
F	-0,314	-0,553	-0,933	0,371	0,267	-0,327	-0,234
AG_07							
\hat{H}_O	0,537	1,000	0,500	0,800	0,540	0,706	0,550
\hat{H}_e	0,429	0,653	0,530	0,540	0,422	0,600	0,671
A	3,000	4,000	3,000	2,000	3,000	4,000	5,000
\hat{A}_e	1,751	2,882	2,128	2,174	1,730	2,500	3,040
F	-0,240	-0,511	0,077	-0,466	-0,269	-0,146	0,205
AG_09							
\hat{H}_O	0,619	0,750	0,692	0,375	0,024	0,125	0,909
\hat{H}_e	0,520	0,553	0,644	0,520	0,047	0,602	0,549
A	3,000	3,000	3,000	3,000	3,000	4,000	3,000
\hat{A}_e	2,083	2,237	2,809	2,083	1,049	2,512	2,217
F	-0,178	-0,328	-0,055	0,298	0,500	0,804*	-0,644
AG_11							
\hat{H}_O	0,286	0,600	0,875	0,733	0,200	0,000	0,920
\hat{H}_e	0,272	0,460	0,655	0,518	0,180	0,000	0,755
A	3,000	3,000	3,000	3,000	2,000	1,000	6,000
\hat{A}_e	1,374	1,852	2,898	2,075	1,220	1,000	4,082
F	-0,039	-0,273	-0,316	-0,402	-0,099	-	-0,199
AG_12							
\hat{H}_O	0,415	0,429	0,577	0,593	0,780	0,750	0,783
\hat{H}_e	0,362	0,400	0,467	0,450	0,535	0,589	0,751
A	3,000	3,000	3,000	3,000	3,000	6,000	11,000
\hat{A}_e	1,567	1,667	1,876	1,818	2,150	2,433	4,016
F	-0,133	-0,033	-0,218	-0,300	-0,449	-0,241	-0,019
AG_13							
\hat{H}_O	1,000	0,882	1,000	0,962	0,909	1,000	0,920
\hat{H}_e	0,725	0,493	0,627	0,499	0,598	0,650	0,748

A	4,000	2,000	4,000	2,000	3,000	4,000	6,000
\hat{A}_e	3,636	1,972	2,681	1,996	2,488	2,857	3,968
F	-0.370	-0.778	-0.583	-0.923	-0.511	-0.519	-0.211
AG_15							
\hat{H}_O	0,300	0,500	0,240	0,370	0,310	0,444	0,250
\hat{H}_e	0,255	0,506	0,339	0,308	0,262	0,633	0,539
A	2,000	3,000	3,000	3,000	2,000	5,000	5,000
\hat{A}_e	1,342	2,024	1,513	1,445	1,355	2,725	2,169
F	-0.164	0.044	0.311	-0.185	-0.171	0.323	0.554
Total							
\hat{H}_O	0,473	0,695	0,551	0,542	0,482	0,559	0,591
\hat{H}_e	0,383	0,516	0,460	0,422	0,406	0,501	0,559
A	2,684	3,105	2,737	2,632	2,684	3,947	4,632
\hat{A}_e	1,621	2,066	1,852	1,730	1,684	2,004	2,268
F	-0,225	-0,317	-0,179	-0,266	-0,177	-0,085	-0,035*

*Locos que desviaram para o Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW), $P < 0,05$ (correção de Bonferroni; 0,0004).

Tabela S3. Detecção de locos outlier em locos microssatélites nas populações de cativeiro e selvagem de *Arapaima gigas* da Amazônia brasileira baseado em 19 locos microssatélites.

Locos	H_E	F_{ST}	P(Simul F_{ST} < sample F_{ST})	FDR
AgCTm1	0.490131	0.394266	0.976923	Outlier
AgCTm3	0.747078	0.229362	0.819499	Neutro
AgCTm4	0.809674	0.162865	0.591021	Neutro
AgCTm5	0.899560	0.338543	0.999829	Outlier
AgCTm7	0.240626	0.130563	0.369901	Neutro
AgCTm8	0.616537	0.433996	0.998495	Outlier
AgCAm4	0.373841	0.218027	0.667069	Neutro
AgCAm16	0.921345	0.337718	0.999823	Outlier
AgCAm18	0.220550	0.059618	0.076703	Neutro
AgCAm26	0.713565	0.183486	0.527242	Neutro
AG_01	0.843474	0.338792	0.998385	Outlier
AG_02	0.566763	0.195638	0.560591	Neutro
AG_03	0.702886	0.21383	0.681912	Neutro
AG_07	0.744485	0.245558	0.878413	Neutro
AG_09	0.712577	0.295365	0.939489	Neutro
AG_11	0.537264	0.228969	0.625932	Neutro
AG_12	0.817136	0.364544	0.999556	Outlier
AG_13	0.774640	0.184000	0.650373	Neutro
AG_15	0.582115	0.286242	0.888295	Neutro

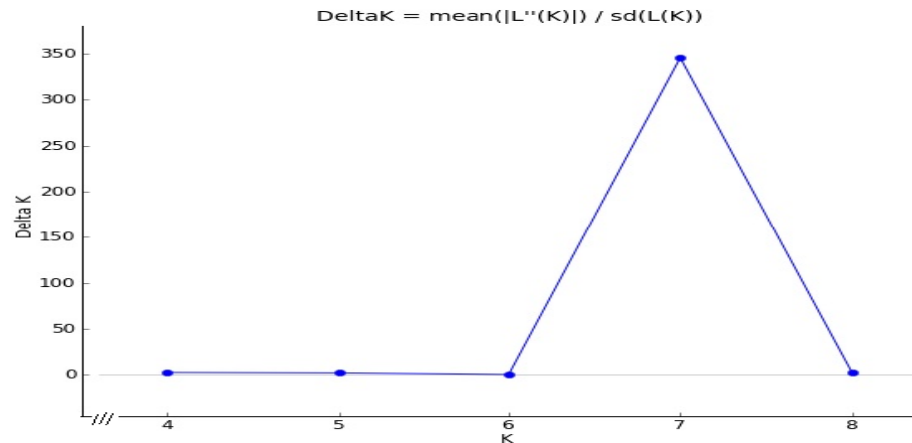


Figura S1. Estimativa do valor do Delta K utilizando o programa STRUCTURE HARVEST em sete populações de *Arapaima gigas* da Amazônia brasileira baseados em 19 locos de microssatélites.

Artigo 3

Quantos locos microssatélites são necessários para um estudo de diversidade genética?

Carlos Henrique dos Anjos dos Santos, Carolina Fernandes Silva de Sousa, Maria de Nazaré Paula-Silva, Izeni Pires Farias, Vera Maria Fonseca de Almeida-Val

Artigo nas normas da Acta Amazonica

Santos CHA, Sousa CFS, Paula-Silva MN, Farias IP, Almeida-Val VMF. (2011). Quantos locos microssatélites são necessários para um estudo de diversidade genética em *Arapaima gigas*? Artigo nas normas da Acta Amazonica.

Quantos locos microssatélites são necessários para um estudo de diversidade genética em *Arapaima gigas*?

How many microsatellite loci are necessary for a study of genetic diversity in *Arapaima gigas*?

Carlos Henrique dos Anjos dos Santos^{1*}, Carolina Fernandes Silva de Sousa¹, Maria Nazaré Paula-Silva¹, Izeni Pires Farias², Vera Maria Fonseca de Almeida-Val¹

¹Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), Laboratório de Ecofisiologia e Evolução Molecular, Manaus, AM, CEP 69060-001, Brazil.

²Universidade Federal do Amazonas (UFAM), Laboratório de Evolução e Genética Animal Manaus, AM, CEP 69077-000, Brazil.

*Corresponding author: Carlos Henrique A. Santos. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), Laboratório de Ecofisiologia e Evolução Molecular (LEEM). Avenida André Araújo, 2936, Aleixo, CEP 69060-001, Manaus, Amazonas, Brasil.

Phone: +55 (92) 3633188

E-mail: carloshenrique@inpa.gov.br

RESUMO

Neste trabalho nós determinamos o número de marcadores microssatélites necessários em um estudo genético populacional a partir de informações sobre a diversidade genética em quatro populações de *Arapaima gigas* (cativeiro e selvagem). Os exemplares de pirarucu foram provenientes de três estados brasileiros (Amazonas, Ceará e Rondônia), com um número total de alelos variando entre os grupos de 60 (grupo A), 136 (grupo B), 212 (grupo C) e 264 (grupo D) alelos, sendo que destes, 11 (grupo A), 31 (grupo B), 37 (grupo C) e 44 (grupo D) eram alelos privados. A heterozigosidade esperada e observada variaram de 0,287 a 0,572 (H_E) e 0,344 a 0,591 (H_O), respectivamente. Verificamos também uma alta diferenciação genética ($F_{ST} > 0,15$), com 23% da variação entre as populações de pirarucu. Os resultados alcançados sugerem que 10 locos microssatélites são o necessário para um estudo de diversidade genética em animais provenientes da natureza ou cativeiro. Porém, estudos envolvendo espécies com tamanho populacional bastante reduzido e ameaçados de extinção devem utilizar um número de locos de microssatélites superior a 10 locos. O aumento do número de marcadores microssatélites nesse caso é uma forma de minimizar a influência do pequeno número amostral em estudos populacionais.

PALAVRAS-CHAVE: *Arapaima gigas*, marcadores microssatélites, diversidade genética.

INTRODUÇÃO

Os microssatélites são sequências simples repetidas (SSR) em tandem de 2-6 (Chambers e MacAvoy, 2000) pares de bases, sendo altamente polimórficos, abundantes e distribuídos com razoável uniformidade no genoma dos eucariotos (Schlötterer, 2004) e procariotos (Weber, 1990). Essas sequências repetidas estão predominantemente presentes em regiões não codificantes do DNA genômico, podendo afetar, por exemplo, a organização da cromatina, recombinação e replicação do DNA, bem como a atividade de alguns genes (Li *et al.* 2002). Além disso, as SSR apresentam uma alta taxa de mutação, uma faixa que varia entre 10^{-3} a 10^{-4} por locos gametas/geração. Essa elevada taxa de mutação deve-se em grande parte pela instabilidade no mecanismo específico de mutação chamado de slippage (deslizamento) da DNA polimerase (Tautz e Schlötterer, 1994) durante a replicação do DNA (Tachida e Lizuka, 1992), seguida pela falta de reparação (Levinson e Gutman, 1987) ou durante o crossing-over desigual (Harding *et al.* 1992; Wolff *et al.* 1989). Chistiakov *et al.* (2006) também relataram que os tamanhos das repetições são o maior fator de influência das taxas elevadas de mutações nos microssatélites, principalmente nos dinucleotídeos. Dieringer e Schlötterer (2003) e Xu *et al.* (2000) observaram que os alelos com um número de repetições elevado são menos estáveis do que aqueles com um número de repetições pequeno.

A elevada taxa de mutação tornou esse marcador uma excelente ferramenta molecular em estudos populacionais (Barker, 2002), parentesco (Queller *et al.* 1993), filogenia (Zhu *et al.* 2000), estrutura populacional (Bowcock *et al.* 1994), código de barra do DNA, estudo de diversidade genética (Katti *et al.* 2001), mapeamento genômico, ecologia molecular, conservação genética (Allendorf e Luikart, 2007), identificação de locos envolvidos com doenças genéticas (Barker, 2002), bem como um caminho para seguir a história biológica de populações (Chambers e MacAvoy, 2000).

Além disso, a premissa para o uso dos microssatélites como marcadores genéticos é que seus alelos diferem apenas no número de unidades que contém repetição simples (Guyer e Collins, 1993; Zajac *et al.* 2009), proporcionando uma diversidade alélica substancial em um grande número de locos, com características

mendeliana e de codominância (Litt e Luty, 1989). As SSR podem apresentar ainda sequências com repetições puras, compostas e interrompidas (Jarne e Lagoda, 1996). De acordo com Bull *et al.* (1999), os microssatélites com repetições compostas e interrompidas podem apresentar algumas diferenciações que só são detectadas por sequenciamento, pois muitas dessas diferenciações não alteram o tamanho dos alelos.

Em resumo, os microssatélites são marcadores moleculares bastante populares e sua crescente aplicabilidade vem sendo impulsionada nos últimos anos devido aos avanços técnicos, à sua versatilidade e ao baixo custo (Guichoux *et al.* 2011). Neste contexto, nós propusemos avaliar quantos locos microssatélites são necessários para um estudo de diversidade genética em populações de *Arapaima gigas*, uma espécie de peixe endêmica da bacia amazônica e ameaçada de extinção.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostras de músculo branco de 121 indivíduos de *Arapaima gigas* (pirarucu) foram coletadas de estações de pisciculturas e da natureza. As coletas dos indivíduos da natureza foram realizadas nas Reservas de Desenvolvimento Sustentável de Mamirauá (RDSM – 25 amostras) e Fonte Boa (RDSFB – 18 amostras) no Estado do Amazonas. E os exemplares de pisciculturas foram adquiridos nas estações de pisciculturas do Departamento Nacional de Obras Contra as Secas (DNOCS) no Estado do Ceará, e da Piscicultura de Porto Velho (PPV – 48 amostras) no Estado de Rondônia. Após as coletas as amostras foram armazenadas em freezer -80 °C para posterior extração do DNA.

O DNA genômico total foi extraído do músculo branco utilizando o protocolo descrito por Sambrook *et al.* (1989) com algumas modificações. O DNA extraído foi quantificado em espectrofotômetro NanoDrop 2000 (Thermo Scientific) para verificação da qualidade e quantidade das amostras extraídas. As amostras de *A. gigas* foram genotipadas em quatro grupos (Grupo A – cinco locos SSR [AgCTm5, AgCTm8, AgCAm18, AG_02 e AG_11]; Grupo B – 10 SSR [AgCTm5, AgCTm8, AgCAm16, AgCAm18, AgCAm26, AG_01, AG_02, AG_07, AG_11 e AG_15]; Grupo C – 15 SSR [AgCTm3, AgCTm4, AgCTm5, AgCTm7, AgCTm8, AgCAm4, AgCAm16, AgCAm18, AgCAm26, AG_01, AG_02, AG_07, AG_11, AG_12 e

AG_15] e Grupo D – 19 SSR [AgCTm1, AgCTm3, AgCTm4, AgCTm5, AgCTm7, AgCTm8, AgCAm4, AgCAm16, AgCAm18, AgCAm26, AG_01, AG_02, AG_03, AG_07, AG_09, AG_11, AG_12, AG_13 e AG_15]) de marcadores microssatélites distribuídos aleatoriamente, sendo que os locos utilizados foram desenvolvidos por Farias *et al.* (2003) e Santos *et al.* (2011 in Molecular Ecology Resources Primer Consortium *et al.* 2011).

As reações de PCR foram realizadas utilizando um termociclador Veriti™ 96-well Thermal Cycler (Applied Biosystems, Inc.) para um volume final de 10 µL. Cada reação de PCR continha 1,5 µL de DNA genômico (50 ng/µL), 1,0 µL de *primer* forward (0,4 µM), 1,5 µL de *primer* reverse (0,4µM), 1,0 µL de *primer* M13 com fluorescência 6-FAM (Schuelke, 2000) (0,4 µM) e 5,0 µL do PCR Master Mix (2x) (Fermentas) contendo Taq DNA polimerase (0,05U), MgCl₂ (1,5 mM) e dNTPs (0,4 mM). Os ciclos das PCRs foram distribuídos em quatro etapas de ciclagem distribuídas da seguinte forma: 94 °C por três minutos; 20 ciclos de 94 °C por 20 segundos, 56 - 58 °C por 20 segundos e 68 °C por 30 segundos; 25 ciclos de 94 °C por 20 segundos, 53 °C por 20 segundos, 68 °C por 30 segundos e uma extensão final de 72 °C por 10 minutos. Os produtos amplificados foram genotipados em sequenciador ABI 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Inc.), utilizando um volume final de 10 µL com aplicação do marcador de peso molecular Genescan-500 LIZ (-250). Os fragmentos de microssatélites foram analisados utilizando o programa GeneMapper v4.0 (Applied Biosystems, Inc.).

Neste estudo nós verificamos a heterozigosidade observada (\hat{H}_O) e esperada (\hat{H}_e) (FSTAT v2.9.3.2; Goudet, 2001), o número de alelos por locos (GENETIX v4.05.2; Belkhir *et al.* 2004), o número de alelos privados, o índice de fixação (f) (GDA v1.1; Lewis e Zaykin, 2000) e o conteúdo de informação de polimorfismo (PIC) (CERVUS v3.0.3; Kalonowski *et al.* 2007). O programa MICRO-CHECKER v2.3 (van Oosterhout *et al.* 2004) foi utilizado para testarmos a possível presença de alelos nulos. O desequilíbrio de ligação (LD) e o equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) foram calculados utilizando-se os programas FSTAT v2.9.3.2 (Goudet, 2001) e GDA v1.1 (Lewis e Zaykin, 2000), sendo aplicado para essas análises a correção de Bonferroni sequencial que corrige as comparações múltiplas simultâneas, minimizando os erros do tipo I (Rice, 1989). O nível de significância utilizado foi $\alpha =$

0,05. Nós também verificamos o poder de discriminação dos locos microssatélites utilizando o programa GIMLET v1.3.3 (Valière, 2002).

Os níveis de diferenciação genética entre os sítios amostrais foram analisados segundo a estatística F de Wright (F_{IT} , F_{IS} e F_{ST} ; Weir e Cockerham, 1984) utilizando os softwares FSTAT v2.9.3.2 (Goudet, 2001) e ARLEQUIN v3.5 (Excoffier e Lischer, 2010). Uma análise de variância molecular (AMOVA; Excoffier *et al.* 1995) foi realizada para os grupos de locos de microssatélites e as populações de pirarucu testadas. A AMOVA foi calculada utilizando o programa ARLEQUIN v3.5 (Excoffier e Lischer, 2010) baseando-se nos resultados do F_{ST} . Os dados de diversidade genética entre os quatro grupos de locos microssatélites foram analisados aplicando uma ANOVA (one way) e o teste de Bonferroni que compara as médias entre os pares de grupos; para isso utilizamos o programa BIOESTAT v5.0 (Ayres *et al.* 2007).

RESULTADOS

O Equilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE) foi testado para todos os grupos de locos microssatélites nas quatro populações de *Arapaima gigas*. Nós verificamos que somente o loco AG_15 desviou significativamente para HWE ($p < 0,00125$; Grupo B e $p < 0,00066$; Grupo D). O software Micro-Checker evidenciou possível presença de alelos nulos para os locos AG_03 (PPV), AG_15 (PPV e RDSFB) e AG_15 (RDSM). O desvio para o HWE foi detectado somente para a população da Reserva de Desenvolvimento Sustentável de Mamirauá, porém, verificamos que nenhum dos pares de locos de microssatélites desviou significativamente para o desequilíbrio de ligação (DL).

Constatamos que o número médio de alelos (MNA) e a riqueza alélica (AR) não variaram muito entre os grupos de marcadores microssatélites testados, porém, verificamos que o grupo B, C e D apresentaram valores de MNA e AR similares (Tabela 1). No que se refere ao número de alelos totais (TNA) e alelos privados (NPA) constatamos um aumento de seus valores a medida que mais marcadores microssatélites foram adicionados em seus respectivos grupos (Tabela 1). Os resultados encontrados sobre o NPA e TNA já eram esperados pois tratam de grupos

com o número de locos de microssatélites distintos. Verificamos também uma diversidade gênica variando entre os grupos e as populações de pirarucu de 0,287 (PPV – Grupo A) a 0,573 (RDSM – Grupo C), respectivamente. Além disso, verificamos que a diversidade gênica ou heteroziguidade esperada apresentou valores praticamente iguais entre os grupos B, C e D (Tabela 1). A população da RDSM apresentou carência de heterozigotos para os grupos B e C dos conjuntos de marcadores microssatélites.

Neste estudo foi verificado que o conteúdo de informação de polimorfismo foi $>0,5$ para um loco do grupo A, cinco locos do grupo B, oito locos do grupo C e 11 locos do grupo D. Isso mostra que quanto maior o número de locos em um estudo genético, maior será o número de locos que poderão apresentar alto valor de PIC. Devemos destacar que o loco AgCAm16 apresentou o maior poder de informação entre todos os locos testados (Tabela S1). Além disso, verificamos uma alta diferenciação detectada pelo índice de diferenciação F_{ST} para todas as populações de pirarucu nos quatro grupos de marcadores utilizados, bem como também um excesso de heterozigotos ($F_{IS} < 0$).

As análises de variância molecular (AMOVA) mostraram que a variabilidade genética está $>23\%$ entre as populações (F_{ST}) e $>80\%$ dentre os indivíduos (F_{IT}), sendo estes dois índices de diferenciação significativos ($p < 0,05$) para os quatro conjuntos de locos microssatélites (Tabela 2) e populações de *A. gigas*. A análise de variância (ANOVA, one way) e a estatística de Bonferroni mostraram que a heteroziguidade observada foi significativamente diferente ($p < 0,036$) entre os grupos de marcadores microssatélites (Figura 1), sendo que para a diversidade gênica ($p > 0,248$) e o índice de fixação (F_{IS}) ($p > 0,816$) os valores não diferiram.

DISCUSSÃO

Neste trabalho nós verificamos uma variação da riqueza alélica de 2,296 (grupo A) a 4,390 (grupo C) entre as populações de *A. gigas*, e uma variação quase que imperceptível entre as populações (Tabela 1). Essa variação da AR mostrou-se praticamente igual nos grupos B, C e D, mostrando que o aumento de marcadores microssatélites entre os grupos não alteraram a riqueza alélica dentro das populações,

porém, observou-se características genéticas bem distintas entre as populações (Tabela 1). Porém, quando trabalhamos com populações de aquicultura observamos que os indivíduos apresentam variação na riqueza alélica bem diferente das encontradas da natureza. Essa variação entre populações de aquicultura foi observada também em populações de *Salvelinus leucomaenis* (AR, 1,4 a 8,9; Yamaguchi *et al.* 2010), *Seriola lalandi* (AR, 4,52 a 5,16; Millher *et al.* 2011) e *Sparus aurata* (AR, 5,4 a 6,3; Šegvić-Bubić *et al.* 2011). No presente estudo, os indivíduos de cativeiro apresentaram um número de alelos bem menor quando comparados com exemplares selvagens, sendo essa mesma observação constatada no trabalho desenvolvido por Šegvić-Bubić *et al.* (2011). Essa perda da riqueza alélica entre os exemplares da aquicultura está diretamente relacionada ao efeito fundador das populações de cativeiro, que tem o tamanho populacional bastante reduzido para as matrizes de cativeiro.

Nossos resultados mostram ainda que os grupos de locos microssatélites nas quatro populações de pirarucu apresentaram um excesso de heterozigotos ($H_O > H_E$), e esses dados foram similares aos encontrados por Yamaguchi *et al.* (2010) e Novel *et al.* (2010) em populações de cativeiro das espécies *S. leucomaenis* e *Dicentrarchus labrax*. Porém, Miller *et al.* (2011) e Šegvić-Bubić *et al.* (2011) observaram carência de heterozigotos em populações de cativeiro de *S. lalandi* e *S. aurata*. Essas observações mostram que cada espécie apresenta sua própria característica genética, e isso associado como o fitness acaba apresentando características bem distintas e respostas bem diferentes a reprodução e sobrevivência, embora essas espécies possam ocupar o mesmo ambiente. Além disso, verificamos que a heterozigosidade média observada entre os quatro grupos de marcadores microssatélites foi significativamente diferente (Figura 1). O índice de diferenciação genética F_{ST} e AMOVA mostram que as populações de pirarucu apresentaram-se bastantes diferenciadas ($p < 0,05$) para os quatro grupos de marcadores microssatélites, estando nossos dados de diferenciação genética similares aos encontrados por Yamaguchi *et al.* (2010) e Santana (2011) para as espécies *S. leucomaenis* e *Colossoma macropomum*, respectivamente.

No contexto geral, a diversidade genética é um importante parâmetro utilizado para conhecermos como a variabilidade genética está distribuída entre as espécies e populações de animais selvagens e cativeiro. Porém, o que observamos é que vários

autores (sete locos SSR, Miller et al. 2010; 10 locos SSR, Novel et al. 2010; 13 locos SSR, Santana, 2011; oito locos SSR, Šegvić-Bubić *et al.* 2011 e cinco locos SSR, Yamaguchi et al. 2010) utilizam um número variado de marcadores microsatélites em estudos de diversidade genética, e com o presente trabalho, nossos resultados nos permitem propor um número mínimo de locos microsatélites que é mais recomendável, tanto economicamente como estatisticamente, para um estudo genético populacional.

CONCLUSÃO

Os resultados alcançados neste estudo sugerem que 10 locos microsatélites são o suficiente para o estudo da diversidade genética em pirarucu provenientes da natureza e cativeiro. Porém, sugerimos que populações com tamanho populacional bastante reduzido e populações de espécies ameaçadas de extinção devem utilizar um número de locos de microsatélites superior a 10 locos. Esse aumento do número de marcadores microsatélites é uma forma de minimizarmos a influência do pequeno número amostral de espécies ameaçadas de extinção e de populações que passaram por um gargalo populacional recente.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Laboratório de Evolução e Genética Animal (LEGAL/UFAM) e ao Departamento Nacional de Obras Contrás as Secas (DNOCS, CE) por terem disponibilizados amostras de pirarucu para realização deste trabalho. O autor CHAS agradece ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa de doutorado. VMFAV, IPF e ALV agradecem ao CNPq pelas bolsas de Produtividade em Pesquisa. Este trabalho é parte do INCT ADAPTA, coordenado por Adalberto Luis Val.

BIBLIOGRAFIA CITADA

Allendorf F.W. & Luikart G. (2007) *Conservation and the genetics of populations*. Blackwell Publishing, Oxford. 641p.

Ayres M., Ayres-Júnior M.A., Ayres D.L. & Santos A.A.S. (2007) *BioEstat (5.0): aplicações estatísticas nas áreas das ciências biomédicas*. Belém: UFPA, 380p.

Barker G.C. (2002) Microsatellite DNA: a tool for population genetic analysis. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* **96**, S1/21-S1/24.

Belkhir K., Borsa P., Chikhi L., Raufaste N. & Bonhomme F. (2004) *GENETIX 4.05, logiciel sous Windows TM pour la génétique des populations*. Laboratoire Génome, Populations, Interactions, CNRS UMR 5171, Université de Montpellier II, Montpellier (France).

Bowcock A.M., Ruiz-Linares A., Tomfohrde J., Minch E., Kidd J.R. & Cavalli-Sforza L.L. (1994). High resolution of human evolutionary trees with polymorphic microsatellites. *Nature* **368**, 455-457.

Bull L.N., Pabón-Peña C.R. & Freimer N.B. (1999) Compound microsatellite repeats: practical and theoretical features. *Genome Research* **9**, 830-838.

Chambers G.K. & MacAvoy E.S. (2000) Microsatellites: consensus and controversy. *Comparative Biochemistry and Physiology – Part B* **126**, 455-476.

Chistiakov D.A., Hellemans B. & Voleckaert F.A.M. (2006) Microsatellites and their genomic distribution, evolution, function and applications: a review with special reference to fish genetics. *Aquaculture* **255**, 1-29.

Dieringer D. & Schlötterer C. (2003) Two distinct modes of microsatellite mutation processes: evidence from the complete genomic sequences of nine species. *Genome Research* **13**, 2242-2251.

Excoffier L. & Lischer H.E.L. (2010) Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to performance populations genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources* **10**, 564-567.

Excoffier L., Laval G. & Schneider S. (2005) Arlequin 3.01: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online* **1**, 47-50.

Farias I.P., Harbek 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.

Goudet J. (2001) FSTAT, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices (version 2.9.3.2). Updated from Goudet J. (1995). FSTAT, a computer program to calculate F-statistics. *Journal of Heredity* **86**, 485-486.

Guichoux E., Lagache L., Wagner S., Chaumeil P., Léger P., Lepais O., Lepoittevin C., Malausa T., Revardel E., Salin F. & Petit R.J. (2011) Current trends in microsatellites genotyping. *Molecular Ecology Resources* **11**, 591-611.

Guyer M.S. & Collins F.S. (1993) The Human Genome Project and the future of medicine. *American Journal of Diseases of Children* **147**, 1145-1152.

Harding R.M., Boyce A.J. & Clegg J.B. (1992) The evolution of tandemly repetitive DNA: recombination rules. *Genetics* **132**, 847-859.

Jarne P. & Lagoda P.J.L. (1996) Microsatellites, from molecules to populations and back. *Trends in Ecology and Evolution* **11**, 424-429.

Kalinowski S.T., Taper M.L. & Marshall T.C. (2007) Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. *Molecular Ecology* **16**, 1099-1106.

Levinson G. & Gutman A.G. (1987) Slipped-Strand Mispairing: A major mechanism for DNA sequence evolution. *Molecular Biology and Evolution* **4**, 203-221.

Lewis PO, Zaykin D. (2000). *Genetic Data Analysis: computer program for the analysis of allelic Data*, Version 1.0. (d15). University of Connecticut, Storrs, Connecticut.

Li Y.C., Korol A.B., Fahima T., Beiles A. & Nevo E. (2002) Microsatellites: genomic distribution, putative functions and mutational mechanisms: a review. *Molecular Ecology* **11**, 2453-2465.

Litt M. & Luty J.A. (1989) A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. *American Journal of Human Genetics* **44**, 397-401.

Miller P.A., Fitch A.J., Gardner M., Hutson K.S. & Mair G. (2011) Genetic populacional structure of Yellowtail Kingfish (*Seriola lalandi*) in temperature Australasian water inferred from microsatellite markers and mitochondrial DNA. *Aquaculture* **319**, 328-336.

Molecular Ecology Resources Primer Development Consortium., Agata K., Alassad S., Almeida-Val V.M.F., Álvarez-Dios J.A., Barbisan F., Beadell J.S., Beltrán J.F., Benítez M., Bino G., Bleay C., Bloor P., Bohlmann J., Booth W., Boscarri E., Caccone A., Campos T., Carvalho B.M., Clímaco G.T., Clobert J., Congiu L., Cowger C., Dias G., Doadrio I., Farias I.P., Ferrand N., Freitas F.D., Fusco G., Galetti P.M., Gallardo-

Escárate C., Gaunt M.W., Ocampo Z.G., Gonçalves H., Gonzales E.G., Haye P., Honnay O., Hyseni C., Jacquemyn H., Jowers M.J., Kakezawa A., Kawagushi E., Keeling C., Kwan Y-S., la Spina M., Lee W-O., Lesniewska M., Li Y., Liu H., Liu X., Lopes S., Martínez P., Meeus S., Murray B.W., Nunes A.G., Okedi L.M., Ouma J.O., Pardo B.G., Parks R., Paula-Silva M.N., Pedraza-Lara C., Perera O.P., Pino-Querido A., Richard M., Rossini B.C., Samarasekera N.G., Sánchez A., Sanchez J.A., Santos C.H.A., Shinohara W., Soriguer R.C., Sousa A.C.B., Sousa C.F.S., Steves V.M., Tejedó M., Valenzuela-Bustamante M., van de Vliet M.S., Vandepitte K., Vera M., Wandeler P., Wang W., Won Y-J., Yamashiro A., Yamashiro T. & Zhu C. (2011) Permanent genetic resources added to molecular ecology resources database 1 December 2010 – 31 January 2011. *Molecular Ecology Resources* **11**, 586-589.

Novel P., Porta J.M., Porta J., Béjar J. & Alvarez M.C. (2010) PCR multiplex tool with 10 microsatellite for the European seabass (*Dicentrarchus labrax*) – applications in genetic differentiation of populacional and parental assignment. *Aquaculture* **308**, S34-S38.

Queller D.C., Strassmann J.E. & Hughes C.R. (1993) Microsatellites and kinship. *Trends in Ecology and Evolution* **8**, 285-298.

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

Sambrook J., Fritsch E.F. & Maniatis T. (1989) *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, New York.

Santana G.X. (2011) *Marcadores microsatélites: ferramentas para manejo e conservação da variabilidade genética em populações de tambaqui (Colossoma macropomum, Cuvier 1816)*. Tese (Doutorado em Genética, Conservação e Biologia Evolutiva) 110. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, Brasil.

Santos C.H.A., Clímaco G.T., Sousa C.F.S., Paula-Silva M.N., Sousa A.C.B., Farias I.P., Campos T. & Almeida-Val V.M.F. (2011) Development and characterization of

microsatellite loci in *Arapaima gigas*, an important neotropical fish. *Molecular Ecology Resources* **11**, 586-589.

Šegvić-Bubić T., Lepen I., Trumbić Ž., Ljubković J., Sutlović D., Matić-Skoko S., Grubišić L., Glamuzina B. & Mladineo I. (2011) Population genetic structure of reared and wild gilthead sea bream (*Sparus aurata*) in the Adriatic Sea inferred with microsatellite loci. *Aquaculture* **318**, 309-315.

Schlötterer C. (2004) The evolution of molecular markers – just a matter of fashion? *Nature Reviews Genetics* **5**, 63-69.

Schuelke M. (2000) An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. *Nature Biotechnology* **18**: 233-234.

Tachida H. & Lizuka M. (1992) Persistence of repeated sequences that evolve by replication slippage. *Genetics* **131**, 471-478.

Tautz D. & Schlötterer C. (1994) Simple sequences. *Current Opinion in Genetics & Development* **4**, 832-837.

Valière N. (2002) GIMLET: a computer program for analyzing genetic individual identification data. *Molecular Ecology Note* **2(3)**, 377-379.

van Oosterhout C., Hutchinson W.F., Wills D.P.M. & Shipley P. (2004) Micro-Checker: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes* **4**, 535-538.

Weber J.L. (1990) Informativeness of human (dC-dA)_n · (dG-dT)_n polymorphisms. *Genomics* **7**, 524-530.

Weir B.S. & Cockerham C.C. (1984) Estimating F statistics for the analysis of population structure. *Evolution: International Journal of Organic Evolution* **38**, 1358-1370.

Wolff R.K., Plaetke R., Jeffreys A.J. & Blanc R. (1989) Unequal crossing over between homologous chromosomes is not the major mechanism involved in the generation of new alleles at VNTR loci. *Genomics* **5**, 382-384.

Xu X., Peng M., Fang Z. & Xu X. (2000) The direction of microsatellite mutations is dependent upon allele length. *Nature Genetics* **24**, 396-399.

Yamagushi K., Nakajima M. & Taniguchi N. (2010) Loss of genetic variation and increased population differentiation in geographically peripheral populations of Japanese char *Salvelinus leucomaenis*. *Aquaculture* **308**, S20-S27.

Zajac P., Öberg C. & Ahmadian A. (2009) Analysis of short tandem repeats by parallel DNA threading. *PLoS One* **4(11)**, e7823. doi:10.1371/journal.pone.0007823.

Zhu Y., Queller D.C. & Strassmann J.E. (2000) A phylogenetic perspective on sequence evolution in microsatellite loci. *Journal of Molecular Evolution* **50**, 324-338.

Tabela 1. Índice de diversidade genética nos quatro grupos de marcadores microssatélites em populações de cativeiro (DNOCS e PPV) e selvagens (RDSM e RDSFB) de *Arapaima gigas*.

	Populações	N	Diversidade alélica				Diversidade genética		
			TNA	MNA	NPA	AR	H_e	H_o	F_{IS}
Grupo A	DNOCS	30	13	2,6	2	2,516	0,381	0,458	-0,207
	PPV	48	12	2,4	1	2,296	0,287	0,344	-0,198
	RDSFB	18	12	3,3	-	2,378	0,362	0,410	-0,135
	RDSM	28	23	5,5	8	4,196	0,494	0,523	-0,058
Grupo B	DNOCS	30	27	2,7	5	2,606	0,426	0,498	-0,173
	PPV	48	26	2,6	3	2,531	0,380	0,434	-0,144
	RDSFB	18	38	3,8	6	3,687	0,522	0,546	-0,047
	RDSM	28	45	4,5	17	4,186	0,562	0,519	0,079 ^(1*)
Grupo C	DNOCS	30	41	2,7	6	2,645	0,440	0,549	-0,254
	PPV	48	40	2,7	5	2,607	0,414	0,497	-0,203
	RDSFB	18	59	3,9	7	3,788	0,512	0,562	-0,099
	RDSM	28	72	4,8	20	4,390	0,573	0,568	0,008
Grupo D	DNOCS	30	50	2,6	6	2,562	0,430	0,542	-0,266
	PPV	48	51	2,6	6	2,567	0,411	0,484	-0,180
	RDSFB	18	75	3,9	9	3,814	0,517	0,559	-0,085
	RDSM	28	88	4,6	23	4,258	0,572	0,591	-0,035 ^(1*)

n, tamanho da amostra; TNA, número total de alelos; MNA, número médio de alelos, NPA, número de alelos privados, AR, riqueza alélica; H_e , diversidade gênica (heterozigiosidade esperada em Equilíbrio de Hardy-Weinberg); H_o , heterozigiosidade observada; f_i , coeficiente de endocruzamento populacional; (n*) número de locos que desviaram para o Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW).; Nível de significância, * $P < 0,05$.

Tabela 2. Resultados da Análise de Variância Molecular (AMOVA) para os quatro grupos de locos de microssatélites em populações de cativo e selvagens de *Arapaima gigas* da Amazônia brasileira.

Fonte de Variação	Soma dos Quadrados	Componentes da Variância	Porcentagem da Variação	p-valor
GRUPO A				
Entre as populações	46,369	0,282 (F_{ST})	23,309	0,000*
Entre as populações				
Dentro dos indivíduos	80,770	-0,144 (F_{IS})	-11,839	1,000
Dentro dos indivíduos	114,000	1,073 (F_{IT})	88,530	0,036*
GRUPO B				
Entre as populações	124,978	0,787(F_{ST})	25,590	0,000*
Entre as populações				
Dentro dos indivíduos	210,605	-0,182(F_{IS})	-5,931	1,000
Dentro dos indivíduos	256,500	2,459(F_{IT})	80,241	0,000*
GRUPO C				
Entre as populações	190,274	1,204(F_{ST})	25,382	0,000*
Entre as populações				
Dentro dos indivíduos	304,410	-0,514(F_{IS})	-10,837	1,000
Dentro dos indivíduos	424,000	4,055(F_{IT})	85,455	0,000*
GRUPO D				
Entre as populações	263,960	1,689(F_{ST})	27,568	0,000*
Entre as populações				
Dentro dos indivíduos	381,162	-0,656(F_{IS})	-10,698	1,000
Dentro dos indivíduos	535,500	5,095(F_{IT})	83,130	0,000*

* $P < 0,05$ indica diferença estatística significativa

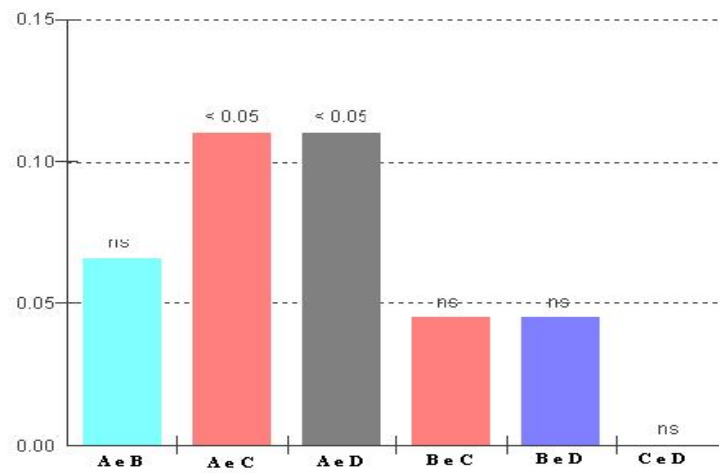


Figura 1. Comparação entre os pares de grupos a partir das médias da heterozigosidade observada entre os quatro grupos de marcadores microsatélites, aplicando a ANOVA e o teste de Bonferroni. (A, grupo A; B, grupo B; C, grupo C e D, grupo D, respectivamente).

Tabela S1. Valores obtidos para os índices de diversidade genética e da Estatística-*F* para os quatro grupos de locos de microssatélites em populações de cativo e selvagens de *Arapaima gigas* da Amazônia brasileira.

GRUPO A (cinco locos microssatélites)								
Locos	<i>AT</i>	<i>AR</i>	<i>PIC</i>	<i>F_{IT}</i>	<i>F_{IS}</i>	<i>F_{ST}</i>	<i>R_{ST}</i>	<i>PI (biased)</i>
AgCTm5	22	6,955	0,695	0,308*	-0,064	0,349*	0,119	1,049e-01 ⁽¹⁾
AgCTm8	9	2,630	0,302	-0,146	-0,542	0,257*	0,295	5,203e-03 ⁽⁴⁾
AgCAm18	9	3,058	0,246	0,010	-0,055	0,062*	0,095	2,919e-03 ⁽⁵⁾
AG_02	9	2,982	0,420	0,140	0,021	0,122*	0,193	3,472e-02 ⁽²⁾
AG_11	12	4,451	0,434	0,032	-0,257	0,229*	0,184	1,104e-02 ⁽³⁾
Média				0,115	-0,154	0,233	0,147	
GRUPO B (10 locos microssatélites)								
AgCTm5	22	6,955	0,695	0,308*	-0,064	0,349*	0,119	2,654e-04 ⁽³⁾
AgCTm8	9	2,630	0,302	-0,146	-0,542	0,257*	0,295	1,997e-07 ⁽⁹⁾
AgCAm16	19	8,231	0,830	0,390*	0,120*	0,307*	0,339	4,090e-02 ⁽¹⁾
AgCAm18	9	3,058	0,246	0,010	-0,055	0,062*	0,095	6,716e-08 ⁽¹⁰⁾
AgCAm26	16	5,238	0,591	0,122	-0,128	0,221*	0,208	7,354e-06 ⁽⁵⁾
AG_01	11	6,673	0,782	0,299*	-0,088	0,356*	0,075	2,530e-03 ⁽²⁾
AG_02	9	2,982	0,420	0,140	0,021	0,122*	0,193	2,435e-06 ⁽⁶⁾
AG_07	15	5,570	0,620	0,103	-0,175	0,236*	0,204	4,143e-05 ⁽⁴⁾
AG_11	12	4,451	0,434	0,032	-0,257	0,229*	0,184	7,743e-07 ⁽⁷⁾
AG_15	15	4,327	0,424	0,298*	0,151	0,174*	0,089	2,541e-07 ⁽⁸⁾
Média				0,198	-0,080	0,257	0,229	
GRUPO C (15 locos microssatélites)								
AgCTm3	14	3,850	0,628	0,294*	-0,137	0,379*	0,479	1,848e-01 ⁽⁶⁾
AgCTm4	21	8,205	0,792	-0,010	-0,300	0,223*	0,861	2,245e-03 ⁽²⁾
AgCTm5	22	6,955	0,695	0,308*	-0,064	0,349*	0,119	1,171e-06 ⁽⁵⁾
AgCTm7	11	2,927	0,356	0,111	0,073	0,041*	0,052	2,846e-11 ⁽¹³⁾
AgCTm8	9	2,630	0,302	-0,146	-0,542	0,257*	0,295	1,341e-11 ⁽¹⁴⁾
AgCAm4	7	2,000	0,355	-0,422	-0,659	0,143*	0,143	7,017e-11 ⁽¹²⁾
AgCAm16	19	8,231	0,830	0,390*	0,120*	0,307*	0,339	4,090e-01 ⁽¹⁾
AgCAm18	9	3,058	0,246	0,010	-0,055	0,062*	0,095	7,522e-12 ⁽¹⁵⁾
AgCAm26	16	5,238	0,591	0,122	-0,128	0,221*	0,208	5,121e-09 ⁽⁸⁾
AG_01	11	6,673	0,782	0,299*	-0,088	0,356*	0,075	1,389e-04 ⁽³⁾
AG_02	9	2,982	0,420	0,140	0,021	0,122*	0,193	1,696e-09 ⁽⁹⁾
AG_07	15	5,570	0,620	0,103	-0,175	0,236*	0,204	2,885e-08 ⁽⁷⁾
AG_11	12	4,451	0,434	0,032	-0,257	0,229*	0,184	5,392e-10 ⁽¹⁰⁾
AG_12	23	7,959	0,739	0,131	-0,265	0,313*	0,077	1,116e-05 ⁽⁴⁾
AG_15	15	4,327	0,424	0,298*	0,151*	0,174*	0,089	1,770e-10 ⁽¹¹⁾
Média				0,145	-0,145	0,254	0,375	
GRUPO D (19 locos microssatélites)								
AgCTm1	9	2,780	0,418	0,611*	0,107	0,565*	0,607	7,628e-12 ⁽¹²⁾
AgCTm3	14	3,850	0,628	0,294*	-0,137	0,379*	0,479	2,012e-08 ⁽⁷⁾
AgCTm4	21	8,205	0,792	-0,010	-0,300	0,223*	0,861	2,245e-03 ⁽²⁾
AgCTm5	22	6,955	0,695	0,308*	-0,064	0,349*	0,119	1,274e-07 ⁽⁶⁾
AgCTm7	11	2,927	0,356	0,111	0,073	0,041*	0,052	4,239e-14 ⁽¹⁷⁾
AgCTm8	9	2,630	0,302	-0,146	-0,542	0,257*	0,295	1,997e-14 ⁽¹⁸⁾
AgCAm4	7	2,000	0,355	-0,422	-0,659	0,143*	0,143	1,045e-13 ⁽¹⁶⁾
AgCAm16	19	8,231	0,830	0,390*	0,120*	0,307*	0,339	4,090e-02 ⁽¹⁾
AgCAm18	9	3,058	0,246	0,010	-0,055	0,062*	0,095	1,120e-14 ⁽¹⁹⁾
AgCAm26	16	5,238	0,591	0,122	-0,128	0,221*	0,208	9,546e-11 ⁽¹⁰⁾
AG_01	11	6,673	0,782	0,299*	-0,088	0,356*	0,075	1,389e-04 ⁽³⁾
AG_02	9	2,982	0,420	0,140	0,021	0,122*	0,193	2,525e-12 ⁽¹³⁾
AG_03	16	5,214	0,701	0,276*	-0,077	0,328*	0,092	1,215e-06 ⁽⁵⁾

AG_07	15	5,570	0,620	0,103	-0,175	0,236*	0,204	3,141e-09 ⁽⁸⁾
AG_09	13	3,601	0,514	0,530*	0,134	0,458*	0,622	2,296e-11 ⁽¹¹⁾
AG_11	12	4,451	0,434	0,032	-0,257	0,229*	0,184	8,031e-13 ⁽¹⁴⁾
AG_12	23	7,959	0,739	0,131	-0,265	0,313*	0,077	1,116e-05 ⁽⁴⁾
AG_13	15	4,097	0,605	-0,380	-0,508	0,085*	0,135	5,377e-10 ⁽⁹⁾
AG_15	15	4,327	0,424	0,298*	0,151*	0,174*	0,089	2,636e-13 ⁽¹⁵⁾
Média				0,169	-0,148	0,276	0,375	

AT, Alelos totais; *AR*, riqueza alélica; *PIC*, Conteúdo de Informação de Polimorfismo; *PI*, Probabilidade de identidade, (n) probabilidade de identidade e rank dos locos mais informativos.

* $P < 0,05$ indica diferença estatística significativa.

Conclusões gerais

Os novos marcadores microssatélites apresentaram altos níveis de polimorfismos e serão importantes em futuros estudos genético-populacionais e evolutivos para a espécie *Arapaima gigas*.

As populações de pirarucu apresentaram uma moderada diversidade genética, com um elevado número de alelos totais e alelos privados.

Os índices de diferenciação genética mostraram que as populações de cativeiro e selvagens estão bastante diferenciadas e isso deve estar relacionado com o isolamento reprodutivo entre as populações de cativeiro. Além disso, verificamos que todas as populações estão com excesso de heterozigotos.

Verificamos que 84,5% da variabilidade genética está dentre os indivíduos (intrapopulacional) e 28,8% dentre as populações (interpopulacional).

As populações de pirarucu estão altamente estruturadas apresentando-se como populações distintas. Os dados do coeficiente de associação mostraram que as populações de pirarucu não estão misturadas.

Constatamos que as populações selvagens estão menos distantes geneticamente do que as populações de cativeiro, porém, um tempo maior de isolamento em cativeiro tenderá a aumentar ainda mais a distância genética entre essas populações.

Verificamos que todas as populações de *A. gigas* passaram por um gargalo populacional recente, sendo verificado um excesso de heterozigotos nas populações, e para os indivíduos de piscicultura o fator principal para essa redução populacional se deve ao efeito fundador das estações de pisciculturas.

Observamos que seis marcadores microssatélites apresentaram pressão seletiva positiva, enquanto restantes dos locos de microssatélites se mostram como marcadores neutros.

Determinamos que o número mínimo necessário de marcadores microssatélites para um estudo de diversidade genética em *A. gigas* é de 10 locos microssatélites. Porém, estudos envolvendo espécies com tamanho populacional bastante reduzido e altamente ameaçado de extinção devem utilizar um número de locos de microssatélites superior a 10 locos.

Referências Bibliográficas

Aczél J, Daróczy Z. (1975). On measures of information and their characterizations. **Mathematics in Science and Engineering**, 115: 234p.

Adams MB, Powell MD, Purser GJ. (2001). Effect of acute and chronic ammonia and nitrite exposure on oxygen consumption and growth of juvenile big billed seahorse. **Journal of Fish Biology**, 58: 848-860.

Agostinho AA, Tomaz SM, Gomes LC. (2005). Conservação da biodiversidade em águas continentais do Brasil. **Megadiversidade**, 1: 70-78.

Albagli S. (1998). **Geopolítica da biodiversidade**. Brasília: Edições Ibama. 276p.

Albagli S. (2001). Amazônia: fronteira geopolítica da biodiversidade. **Revista Parcerias Estratégicas**, 4(12): 5-19.

Alcântara FB, Guerra HF. (1992). Cultivo del paiche, *Arapaima gigas*, utilizando bujurqui, *Cichlassoma bimaculatum*, como presa. **Folia Amazônica**, 4: 129-139.

Alfaro MR, Bocanegra FA, Garcia MV. (1999). **Manual de piscicultura del paiche (*Arapaima gigas* Cuvier)**. Caracas: FAO/Instituto de Investigaciones de la Amazonia Peruana – IIAP. 32p.

Allendorf FW, Luikart G. (2007). **Conservation and the genetics of populations**. Blackwell Publishing, Oxford. 641p.

Almeida-Val VMF, Val AL. (1990). Adaptação bioquímica em peixes da Amazônia. **Ciência Hoje**, 11(64): 62-66.

Amaral JS. (2009). **Esteróides gonadais e metabolismo lipídico ao longo do ciclo reprodutivo de *Arapaima gigas* (Schinz, 1822) em ambiente natural**. 2009. 152f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Universidade de São Paulo, Instituto de Biociências, São Paulo, 2009.

Antao T, Lopes A, Lopes RJ, Beja-Pereira A, Luikart G. (2008). LOSITAN: a workbench to detect molecular adaptation based on a F_{ST} -outlier method. **BMC Bioinformatics**, 9: 323.

Arante CC. (2009). **Ecologia do pirarucu *Arapaima gigas* (Schinz, 1822) na várzea da Reserva de Desenvolvimento Sustentável de Mamirauá, Amazonas, Brasil**. 2009. 85f. Dissertação (Mestrado em Zoologia) – Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, Bahia, 2009.

Arantes CC, Garcez DS, Castello L. (2006). Densidades de pirarucu (*Arapaima gigas*, Teleostei, Osteoglossidae) em lagos das reservas de desenvolvimento sustentável de Mamirauá e Amanã, Amazonas, Brasil. **Uakari**, 2(1): 37-43.

Arantes CC, Castello L, Garcez DS. (2007). Variações entre contagem de *Arapaima gigas* (Schinz) (Osteoglossomorpha, Osteoglossidae) feitas por pescadores individualmente em Mamirauá, Brasil. **Pan-American Journal of Aquatic Sciences**, 2(3): 263-269.

Ardura A, Linde AR, Moreira JC, Garcia-Vazquez E. (2010). DNA barcoding for conservation and management of Amazonian commercial fish. **Biological Conservation**, 143: 1438-1443.

Arif IA, Khan HA. (2009). Molecular markers for biodiversity analysis of wildlife animals: a brief review. **Animal Biodiversity and Conservation**, 32: 9-17.

Avise JC. (2004). **Molecular markers, natural history and evolution**. Sunderland: Sinauer Associates. 2nd edition. 684p.

Baca LC. (2001). **Historia biológica del paiche o pirarucu *Arapaima gigas* (Cuvier) y bases para su cultivo en la Amazonia Iquitos – Peru**. Instituto de Investigaciones de La Amazonia Peruana, Programa de Biodiversidad. 27p.

Baldisserotto B. (2002). **Fisiologia de peixes aplicada à piscicultura**. Santa Maria: Editora UFSM. 212p.

Barker GC. (2002). Microsatellite DNA: a tool for population genetic analysis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, 96: S1/21-S1/24.

Barletta M, Jaureguizar AJ, Baigun C, Fontoura FN, Agostinho AA, Almeida-Val VMF, Val AL, Torres RA, Jimenes-Segura LF, Giarrizzo T, Fabré NN, Batista VS, Lasso C, Taphorn DC, Costa MF, Chaves PT, Vieira JP, Corrêa MFM. (2010). Fish and aquatic habitat conservation of South America: a continental overview with emphasis on neotropical fishes. **Journal of Fish Biology**, 76: 2118-2176.

Bayley PN, Petrere M. (1989). Amazon fisheries: assessment methods, current status and management options. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences (Special publications)**, 106: 385-398.

Beaumont MA, Nichols RA. (1996). Evaluating loci for use in the genetic analysis of population structure. **Proceedings of the Royal Society B**, 363: 1619-1626.

Bell GI, Jurka J. (1997). The length distribution of perfect dimer repetitive DNA is consistent with its evolution by an unbiased single-step mutation process. **Journal of Molecular Evolution**, 44: 414-421.

Belkhir K, Borsa P, Chikhi L, Raufaste N, Bonhomme F. (2004). **GENETIX 4.05, logiciel sous Windows™ pour la génétique des populations**. Laboratoire Génome, Populations, Interactions, CNRS UMR 5171, Université de Montpellier II, Montpellier (France).

Benjamini Y, Hochberg Y. (1995). *Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing*. **Journal of the Royal Statistical Society Series B**, 57: 289-300.

Benzecri JP. (1973). **L'Analyse des données**. vol 2: L'Analyse des Correspondances Dunod, Paris.

Berra TM. (2001). **Freshwater fish distribution**. San Diego: Academic Press. 604p.

Billotte N, Lagoda PJR, Risterucci AM, Baurens FC. (1999). Microsatellite-enriched libraries: applied methodology for the development of SSR markers in tropical crops. **Fruits**, 54: 277-288.

Bowcock AM, Ruiz-Linares A, Tomfohrde J, Minch E, Kidd JR, Cavalli-Sforza LL. (1994). High resolution of human evolutionary trees with polymorphic microsatellites. **Nature**, 368: 455-457.

Brandão FR, Gomes LC, Chagas EC. (2006). Resposta de estresse em pirarucu (*Arapaima gigas*) durante práticas de rotina em piscicultura. **Acta Amazônica**, 36(3): 349-356.

Brauner CJ, Val AL. (1996). The interaction between O₂ and CO₂ exchange in the obligate air breather, *Arapaima gigas*, and the facultative air breather, *Lipossarcus pardalis*. In: Val AL, Almeida-Val VMF, Randall DJ. (Eds.). **Physiology and biochemistry of the fishes of the Amazon**. Manaus: Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, cap. 9, 101-110p.

Brauner CJ, Matey V, Wilson JM, Bernier NJ, Val AL. (2006). Transition in organ function during the evolution of air-breathing; insights from *Arapaima gigas*, an obligate air-breathing teleost from the Amazon. **The Journal of Experimental Biology**, 207: 1433-1438.

Buckup PA, Menezes NA, Ghazzi M. (2007). **Catálogo das espécies de peixes de água doce do Brasil**. Rio de Janeiro: Museu Nacional. 195p.

Bull LN, Pabón-Peña CR, Freimer NB. (1999). Compound microsatellite repeats: practical and theoretical features. **Genome Research**, 9: 830-838.

Callen DF, Thompson AD, Shen Y, Phillips HA, Richards RI, Mulley JC, Sutherland GR. (1993). Incidence and origin of "null" alleles in the (AC)_n microsatellite markers. **American Journal of Human Genetics**, 52: 922-927.

Carrero E, Renshaw MA, Winemiller KO, Hurtado LA. (2011). Isolation and characterization of nuclear-encoded microsatellite DNA primers for the African bonytongue, *Heterotis niloticus*. **Conservation Genetics Resources**, 3(3): 537-539.

Cavero BAS. (2002). **Densidade de estocagem de juvenis de pirarucu, *Arapaima gigas* (Cuvier, 1829) em tanques-rede de pequeno volume**. 2002. 51 f. Dissertação (Mestrado em Biologia de Água Doce e Pesca Interior) - Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia/Fundação Universidade do Amazonas, Manaus, 2002.

Cavero BAS, Ituassú DR, Pereira-Filho M, Roubach R, Bordinhon AM, Fonseca FAL, Ono EA. (2003a). Uso de alimento vivo como dieta inicial no treinamento alimentar de juvenis de pirarucu. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 38(8): 1011-1015.

Cavero BAS, Pereira-Filho M, Roubach R, Ituassú DR, Gandra AL, Crescêncio R. (2003b). Efeito da densidade de estocagem na homogeneidade do crescimento de juvenis de pirarucu, em ambiente confinado. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 38(1): 103-107.

Cavero BAS, Pereira-Filho M, Roubach R, Ituassú DR, Gandra AL, Crescêncio R. (2003c). Biomassa sustentável de juvenis de pirarucu em tanques-rede de pequeno volume. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 38(6): 723-728.

Cavero BAS, Pereira-Filho M, Bordinhon AM, Fonseca FAL, Ituassú DR, Roubach R, Ono EA. (2004). Tolerância de juvenis de pirarucu ao aumento da concentração de amônia em ambiente confinado. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 39(5): 513-516.

Castello L. (2004). A method to count pirarucu: fishers, assessment and management. **North American Journal of Fisheries Management**, 24: 379-389.

Castello L.(2008). Lateral migration of *Arapaima gigas* in floodplains of the Amazon. **Ecology of Freshwater Fish**, 17: 38-46.

CEPF. (2000). **Ecosystem profile: Vilcabamba-Amboró forest ecosystem of the tropical Andes Biodiversity Hotspot – Peru and Bolivia**. Washington, D.C.: Critical Ecosystem Partnership Fundation.

Chambers GK, MacAvoy ES. (2000). Microsatellites: consensus and controversy. **Comparative Biochemistry and Physiology – Part B**, 126: 455-476.

Chistiakov DA, Hellemans B, Volckaert FAM. (2006). Microsatellites and their genomic distribution, evolution, function and applications: a review with special reference to fish genetics. **Aquaculture**, 255: 1-29.

Cope ED. (1871). On the fishes of the tertiary shales of green river, wyoming territory. In: Hayden FV. (ed.). **Preliminary Report of the United States Geological**

Survey of Wyoming. Government Printing Office, Washington: Government Printing Office, p. 425-431.

Cornuet JM, Luikart G. (1996). Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data. **Genetics**, 144: 2001-2014.

Crawford NG. (2010). SMOGD: software for the measurement of genetic diversity. **Molecular Ecology Resources**, 10: 556-557.

Crescêncio R. (2001). **Treinamento alimentar de alevinos de pirarucu, *Arapaima gigas* (Cuvier, 1829), utilizando atrativos alimentares.** 2001. 35 f. Dissertação (Mestrado em Biologia de Água Doce e Pesca Interior) – Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia/Fundação Universidade do Amazonas, Manaus, 2001.

Crescêncio R, Ituassú DR, Roubach R, Pereira-Filho M, Cavero BAS, Gandra AL. (2005). Influência do período de alimentação no consumo e ganho de peso do pirarucu. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 40(12): 1217-1222.

Csink AK, Henikoff S. (1998). Something from nothing: the evolution and utility of satellite repeats. **Trends in Genetics**, 14(5): 200-204.

Dakin EE, Avise JC. (2004). Microsatellite null alleles in parentage analysis. **Heredity**, 93: 504-509.

Dieringer D, Schlötterer C. (2003). Two distinct modes of microsatellite mutation processes: evidence from the complete genomic sequences of nine species. **Genome Research**, 13: 2242-2251.

di Rienzo A, Peterson AC, Garza JC, Valdes AM, Slatkin M, Freimer NB. (1994). Mutational processes of simple sequence repeat loci in human populations. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 91: 3166-3170.

Eisen JA. (1999). Mechanism basis for microsatellite instability. In: Goldstein DB, Schlötterer C. **Microsatellites, Evolution and Applications.** Oxford: Oxford University Press. 352p.

Ellegren H. (2004). Microsatellites: simple sequences with complex evolution. **Nature Reviews Genetics**, 5: 435-445.

Estoup A, Jarne P, Cornuet JM. (2002). Homoplasy and mutation model at microsatellite loci and their consequences for population genetics analysis. **Molecular Ecology**, 11: 1591-1604.

- 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, Lischer HEL. (2010). Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to performance populations genetics analyses under Linux and Windows. **Molecular Ecology Resources**, 10: 564-567.
- Falush D, Stephens M, Pritchard JK. (2003). Inference of population structure using multilocus genotype data: linked loci and correlated allele frequencies. **Genetics**, 164: 1567-1587.
- Farias IP, Harbek 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.
- Foll M, Gaggiotti O. (2008). A genome-scan method to identify selected loci appropriate for both dominant and codominant markers: a Bayesian perspective. **Genetics**, 180: 977-995.
- Fontenele O. (1948). Contribuição para o conhecimento da biologia do pirarucu, *Arapaima gigas*, (Cuvier), em cativo (Actinopterygii, Osteoglossidae). **Revista Brasileira de Biologia**, 8(4): 445-459.
- Fontenele O. (1955). Contribuição ao conhecimento do pirarucu *Arapaima gigas* (Cuvier) em cativo (Actinopterygii, Osteoglossidae). **Departamento Nacional de Obras Contra as Secas**, 166: 235-250.
- Garutti V. (2003). **Piscicultura ecológica**. São Paulo: Editora UNESP. 330p.
- Gill P, Sparkes R, Kimpton C. (1997). Development of guidelines to designate alleles using an STR multiplex system. **Forensic Science International**, 89: 185-197.
- Ginot F, Bordelais I, Nguyen S, Gyapay G. (1996). Correction of some genotyping errors in automated fluorescent microsatellite analysis by enzymatic removal of one base overhangs. **Nucleic Acids Research**, 24: 540-541.
- Godinho AL, Lamas IR, Godinho HP. (2010). Reproductive ecology of Brazilian freshwater fishes. **Environmental Biology of Fish**, 87: 143-162.
- Godinho HP, Santos JE, Formagio PS, Guimarães-Cruz RJ. (2005). Gonadal morphology and reproductive traits of the Amazonian fish *Arapaima gigas* (Schinz, 1822). **Acta Zoologica**, 86: 289-294.

- Goudet J. (2001). FSTAT, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices (version 2.9.3.2). Updated from Goudet J. (1995). FSTAT, a computer program to calculate F-statistics. **Journal of Heredity**, 86: 485-486.
- Goulding M. (1980). **The fishes and the forest**. Los Angeles: University of California Press, 200p.
- Graef EW. (1995). Espécies de peixes com potencial para criação no Amazonas. In: Val AL, Honczaryk A. (Eds.). **Criando peixes na Amazônia**. Manaus: Editora INPA, Capítulo 4, 29-43p.
- Grande L. (1986). The first articulated freshwater teleost fish from the Cretaceous of North America. **Palaeontology**, 29: 365-371.
- Guichoux E, Lagache L, Wagner S, Chaumeil P, Léger P, Lepais O, Lepoittevin C, Malausa T, Revardel E, Salin F, Petit RJ. (2011). Current trends in microsatellites genotyping. **Molecular Ecology Resources**, 11: 591-611.
- Guyer MS, Collins FS. (1993). The Human Genome Project and the future of medicine. **American Journal of Diseases of Children**. 147: 1145-1152.
- Hargreaves JA, Kucuk S. (2001). Effects of diel un-ionized ammonia fluctuation on juvenile hybrid striped bass, channel catfish, and blue tilapia. **Aquaculture**, 195: 163-181.
- Harding RM, Boyce AJ, Clegg JB. (1992). The evolution of tandemly repetitive DNA: recombination rules. **Genetics**, 132: 847-859.
- Hartl DL, Clark AG. (2010). **Princípios de genética de populações**. In: Utz LRP, Borges-Osório MR, Fagundes NJR. (tradutores). 4º edição, Porto Alegre: Artmed, 660p.
- Hedrick PW. (1999). Perspective: highly variable loci and their interpretation in evolution and conservation. **Evolution**, 53: 313–318.
- Hedrick PW. (2005). A standardized genetic differentiation measure. **Evolution**, 59: 1633–1638.
- Hoar WS. (1969). Reproduction. In: Hoar WS, Randall DJ. (Eds.). **Fish Physiology**. New York: Academic Press, Chapter 1, 1-72p.
- Hrbek T, Farias IP. (2008). The complete mitochondrial genome of the pirarucu (*Arapaima gigas*, Arapaimidae, Osteoglossiformes). **Genetics and Molecular Biology**, 31(suppl): 293-302.

Hrbek T, Crossa M, Farias IP. (2007). Conservation strategies for *Arapaima gigas* (Schinz, 1822) and the Amazonian várzea ecosystem. **Brazilian Journal of Biology**, 67(4): 909-917.

Hrbek T, Farias IP, Crossa M, Sampaio I, Porto JIR, 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.

Imbiriba EP. (1991). **Produção e manejo de alevinos de pirarucu, *Arapaima gigas* (Cuvier)**. Circular Técnica, n. 57, Belém: EMBRAPA-CPATU, 19p.

Imbiriba EP. (2001). Potencial da criação de pirarucu, *Arapaima gigas*, em cativeiro. **Acta Amazônica**, 31(2): 299-316.

Jarne P, Lagoda PJJ. (1996). Microsatellites, from molecules to populations and back. **Trends in Ecology and Evolution**, 11: 424-429.

John B. (1998). The biology of heterochromatin. In: Verna RS. (Ed.). **Heterochromatin: molecular and structural aspects**. New York: Cambridge University Press, 1-147p.

Jost L. (2008). G_{ST} and its relatives do not measure differentiation. **Molecular Ecology**, 17(18): 4015-4026.

Kalinowski ST, Taper ML, Marshall TC. (2007). Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. **Molecular Ecology**, 16: 1099-1106.

Katti MV, Ranjekar PK, Gupta VS. (2001). Differential distribution of simple sequence repeats in eukaryotic genome sequences. **Molecular Biology and Evolution**, 18: 1161-1167.

Kerr WS, Carvalho GA, Silva AC, Assis MGP. (2001). Aspectos pouco mencionados da biodiversidade. **Revista Parcerias Estratégicas**, 4(12): 20-41.

Kimura M, Crow J. (1964). The number of alleles that can be maintained in a finite population. **Genetics**, 49: 725-738.

Kimura M, Ohta T. (1978). Stepwise mutation model and distribution of allelic frequencies in a finite population. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 75: 2868-2872.

Kress WJ, Heyer WR, Acevedo P, Coddington J, Cole D, Erwin TL, Meggers BJ, Pogue M, Thorington RW, Vari RP, Weitzman MJ, Weitzman SH. (1998). Amazonian biodiversity: assessing conservation priorities with taxonomic data. **Biodiversity and Conservation**, 7: 1577-1587.

Kumazawa Y, Nishida M. (2000). Molecular phylogeny of Osteoglossoids: a new model for Gondwanian origin and plate tectonic transportation of the Asian arowana. **Molecular Biology and Evolution**, 17(12): 1869-1878.

Lavoué S, Sullivan JP. (2004). Simultaneous analysis of five molecular markers provides a well-supported phylogenetic hypothesis for the living bony-tongue fishes (Osteoglossomorpha: Teleostei). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, 33: 171-185.

Lévêque C, Oberdorff T, Paugy D, Stiassny MJL, Tedesco PA. (2008). Global diversity of fish (Pisces) in freshwater. **Hidrobiologia**, 595: 545-567.

Levinson G, Gutman AG. (1987). Slipped-Strand Mispairing: A major mechanism for DNA sequence evolution. **Molecular Biology and Evolution**, 4: 203-221.

Lewis PO, Zaykin D. (2000). **Genetic Data Analysis: computer program for the analysis of allelic Data**, Version 1.0. (d15). University of Connecticut, Storrs, Connecticut.

Li GQ. (1996). A new species of late cretaceous osteoglossid (Teleostei) from the oldman formation of alberta, Canada, and its phylogenetic relationships. In: Arratia G, Viohl G. (Eds.). **Mesozoic fishes – systematic and paleoecology**. München: Verlag Dr. Friedrich Pfeil, p. 285-298.

Li GQ, Wilson MVH. (1996). The discovery of Heterotidinae (Teleostei: Osteoglossidae) from the Paleocene paskapoo formation of Alberta, Canada. **Journal of Vertebrate Paleontology**, 16: 198-209.

Li GQ, Grande L, Wilson MVH. (1997). The species of *Phareodus* (Teleostei: Osteoglossidae) from the Eocene of North America and their phylogenetic relationships. **Journal of Vertebrate Paleontology**, 17: 487-505.

Li YC, Korol AB, Fahima T, Beiles A, Nevo E. (2002). Microsatellites: genomic distribution, putative functions and mutational mechanisms: a review. **Molecular Ecology**, 11: 2453-2465.

Litt M, Luty JA. (1989). A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. **American Journal of Human Genetics**, 44: 397-401.

Lopes K, Queiroz HL. (2009). Uma revisão das fases de desenvolvimento gonadal de pirarucus *Arapaima gigas* (Schinz, 1822) por meio da análise macroscópica como uma proposta para unificação destes conceitos e sua aplicação prática nas reservas Mamirauá e Amanã. **Uakari**, 5(1): 39-48.

Lundberg JG. (1993). African-South American freshwater fish clades and continental drift: problems with a paradigm. In: Goldblatt P. (Ed.). **Biological relationshipp**

between African and South America. New Haven: Yale University Press, 156-199p.

Lundberg JG, Kottelat M, Smith GR, Stiassny M, Gill AC. (2000). So many fishes, so little time: An overview of recent ichthyological discovery in continental waters. **Annals Missouri Botanical Garden**, 87: 26-62.

Lundberg JG, Pérez MHS, Dahdul WM, Aguilera OA. (2010). The Amazonian Neogene fish fauna. In: Hoorn C, Wesselingh FP. (Eds.). **Amazonia – landscape and species evolution: A look into the past.** Oxford: Wiley-Blackwell Publishing Ltd., Chapter 17, p. 281-301.

Marmontel M. (2006). **Levantamento de aspectos biológicos das espécies carismáticas da RDSA como subsídio para o plano de manejo da Reserva de Desenvolvimento Sustentável de Amanã.** Amanã: Relatório Final da Consultoria Corredores Ecológicos, 94p.

Marques DK. (2003). **Caracterização genética do pirarucu *Arapaima gigas* (Cuvier) (Teleostei, Osteoglossidae) da bacia Tocantins – Araguaia, Estado do Mato Grosso.** 2003. 66f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – Universidade Federal de São Carlos, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, São Paulo, 2003.

Marques DK, Venere PC, Galetti-Júnior PM. (2006). Chromosomal characterization of the bonytongue *Arapaima gigas* (Osteoglossiformes: Arapaimidae). **Neotropical Ichthyology**, 4(2): 215-218.

Menezes NA. (1996). Methods for assessing freshwater fish diversity. In: Bicudo CEM, Menezes NA. (Eds.). **Biodiversity in Brazil.** São Paulo: CNPq. 289-295p.

Molecular Ecology Resources Primer Development Consortium, Agata K, Alassad S, Almeida-Val VMF, Álvarez-Dios JA, Barbisan F, Beadell JS, Beltrán JF, Benítez M, Bino G, Bleay C, Bloor P, Bohlmann J, Booth W, Bosdari E, Caccone A, Campos T, Carvalho BM, Clímaco GT, Clobert J, Congiu L, Cowger C, Dias G, Doadrio I, Farias IP, Ferrand N, Freitas FD, Fusco G, Galetti PM, Gallardo-Escárate C, Gaunt MW, Ocampo ZG, Gonçalves H, Gonzales EG, Haye P, Honnay O, Hyseni C, Jacquemyn H, Jowers MJ, Kakezawa A, Kawagushi E, Keeling C, Kwan Y-S, la Spina M, Lee W-O, Lesniewska M, Li Y, Liu H, Liu X, Lopes S, Martínez P, Meeus S, Murray BW, Nunes AG, Okedi LM, Ouma JO, Pardo BG, Parks R, Paula-Silva MN, Pedraza-Lara C, Perera OP, Pino-Querido A, Richard M, Rossini BC, Samarasekera NG, Sánchez A, Sanchez JA, Santos CHA, Shinohara W, Soriguer RC, Sousa ACB, Sousa CFS, Steves VM, Tejedo M, Valenzuela-Bustamante M, van de Vliet MS, Vandepitte K, Vera M, Wandeler P, Wang W, Won Y-J, Yamashiro A, Yamashiro T, Zhu C. (2011). Permanent genetic resources added to molecular ecology resources database 1 December 2010 – 31 January 2011. **Molecular Ecology Resources**. 11: 586-589.

Monteiro LBB. (2005). **Caracterização do crescimento, reprodução e perfil hormonal dos esteróides sexuais do pirarucu, *Arapaima gigas* (Schinz, 1822), em**

condições de cativeiro. 2005. 84f. Dissertação (Mestrado em Recursos Pesqueiros e Aquicultura) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Pesca, Pernambuco, 2005.

Monteiro LBB, Soares MCF, Catanho MTJ, Honczaryk A. (2010). Aspectos reprodutivos e perfil hormonal dos esteróides sexuais do pirarucu, *Arapaima gigas* (Schinz, 1822), em condições de cativeiro. **Acta Amazonica**, 40(3): 435-450.

Moxon ER, Wills C. (1999). DNA microsatellites: agents of evolution? **Scientific American**, January: 72-77.

Nelson JS. (2006). **Fishes of the World**. New Jersey: John Wiley & Sons. 4rd edition, 539p.

Nei M. (1973). Analysis of gene diversity in subdivided populations. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 70(12): 3321-3323.

Nei M, Chesser RK. (1983). Estimation of fixation indices and gene diversities. **Annals of Human Genetics**, 47(3): 253-259.

Newbrey MG, Bozek MA. (2000). A new species of Joffrichthys (Teleostei: Osteoglossidae) from the sentinel butte formation, (Paleocene) of north Dakota, USA. **Journal of Vertebrate Paleontology**, 20(1): 12-20.

Oliveira C, Foresti F, Hilsdorf AWS. (2009). Genetics of neotropical fish: from chromosomes to populations. **Fish Physiology Biochemical**, 35: 81-100.

Oliveira EJ, Pádua JG, Zucchi MI, Vencovsky R, Vieira MLC. (2006). Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. **Genetics and Molecular Biology**, 29(2): 294-307.

Oliveira V, Poleto SL, Venere PC. (2005). Feeding of juvenile pirarucu (*Arapaima gigas*, Arapaimidae) in their natural environment, lago Quarto Bocas, Araguaiana – MT, Brazil. **Neotropical Ichthyology**, 3(2): 312-314.

Ono EA, Nunes ESS, Cedano JCC, Pereira-Filho M, Roubach R. (2008). Digestibilidade aparente de dietas práticas com diferentes relações energia:proteína em juvenis de pirarucu. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 43(2): 249-254.

Ortiz WS, Salcedo RDL, Ruíz LC, Macías JNL. (2007). Potencial acuícola de pirarucu (*Arapaima gigas*) em la cueca Amazónica. **Revista Electrónica de Ingeniería en Producción Acuícola**, 2: 75-83.

Pérez-Figueroa A, García-Pereira MJ, Saura M, Rolán-Alvarez E, Caballero A. (2010). Comparing three different methods to detect selective loci using dominant markers. **Journal of Evolutionary Biology**, 23: 2267-2276.

- Perez-Sweeney BM, Rodrigues FP, Melnick DJ. (2003). Metodologias moleculares utilizadas em genética da conservação. In: Culler-Júnior L, Rudran R, Valladares-Padua C. (Eds.). **Métodos de estudos em biologia da conservação & manejo da vida silvestre**. Curitiba: Editora da UFPR; Fundação o Boticário de Proteção a Natureza. 343-338p.
- Piorski NM, Sanches A, Carvalho-Costa LF, Hatanaka T, Carrillo-Avila M, Freitas PD, Galetti-Júnior PM. (2008). Contribution of conservation genetics in assessing neotropical freshwater fish biodiversity. **Brazilian Journal of Biology**, 68(4): 1039-1050.
- Piry S, Luikart G, Cornuet JM. (1999). Bottleneck: a computer program for detecting recent reductions in the effective population size using allele frequency data. **Journal of Heredity**, 90: 502-503.
- Porto C. (2001). Macrocenários da Amazônia. **Revista Parcerias Estratégicas**, 4(12): 187-213.
- Porto-Foresti F, Foresti F. (2004). Genética e biotecnologia em piscicultura: usos na produção, manejo e conservação dos estoques de peixes. In: Cyrino JEP, Urbinati EC, Fracalossi DM, Castagnolli N. (Eds.). **Tópicos especiais em piscicultura de água doce tropical intensiva**. São Paulo: TecArt; Sociedade Brasileira de Aquicultura e Biologia Aquática. 195-215p.
- Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P. (2000). Inference of population structure using multilocus genotype data. **Genetics**, 155: 945-959.
- Queiroz HL. (1999). A pesca, as pescarias e os pescadores de Mamirauá. In: Queiroz HL, Crampton WGR. (Eds). **Estratégias para manejo de recursos pesqueiros em Mamirauá**. Brasília: SCM-MCT-CNPq. Capítulo 3, p. 37-71.
- Queller DC, Strassmann JE, Hughes CR. (1993). Microsatellites and kinship. **Trends in Ecology and Evolution**, 8: 285-298.
- Reis RE, Kullander SO, Ferrari Jr CJ. (2003). **Check list of the freshwater fishes of South and Central America**. Porto Alegre: EDPUCRS. 729p.
- Rice WR. (1989). Analyzing tables of statistical tests. **Evolution**, 43: 223-225.
- Ríos GR. (2004). Experiencias en el aprovechamiento de *Arapaima gigas* “paiche” em La cocha El Dorado, Cuenca Yanayacu Pucate – Reserva Nacional Pacaya Samiria – 2003. **Revista Eletrônica Manejo de Fauna Silvestre em Amazonia y Latinamérica**. Edición Memorias: 280-288.
- Ryman N. (1991). Conservation genetics considerations in fishery management. **Journal of Fish Biology**, 39: 221-224.

Salati E. (1985). The climatology and hydrology of Amazonia. In: Prance GT, Lovejoy TE. (Editors). **Key environments Amazonia**. Oxford: Pergamon Press. 1985. 18-48p.

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. (1989). **Molecular cloning: a laboratory manual**, 2nd ed, New York: Cold Spring Harbor Laboratory.

Santos CHA, Clímaco GT, Sousa CFS, Paula-Silva MN, Sousa ACB, Farias IP, Campos T, Almeida-Val VMF. (2011). Development and characterization of microsatellite loci in *Arapaima gigas*, an important neotropical fish. **Molecular Ecology Resources**. 11: 586-589.

Santos RS. (1985). *Laeliichthys ancestralis*, novo gênero e espécie de Osteoglossiformes do Aptiano da formação areado, estado de Minas Gerais, Brasil. **Paleontologia e Estratigrafia**, 2: 161-167.

Schaefer SA. (1998). Conflict and resolution: impact of new taxa on phylogenetic studies of the neotropical cascudinhos (Siluroidei: Loricariidae). In: Malabarba LR, Reis RE, Vari RP, Lucena ZMS, Lucena CAS. (Eds.). **Phylogeny and classification of Neotropical fishes**. Porto Alegre: EDIPUCRS. 375-400p.

Schlötterer C. (2004). The evolution of molecular markers – just a matter of fashion? **Nature Reviews Genetics**, 5: 63-69.

Schlötterer C, Tautz D. (1992). Slippage synthesis of simple sequence DNA. **Nucleic Acids Research**, 20(2): 211-215.

Schmidt-Nielsen K. (2002). **Fisiologia animal: adaptação e meio ambiente**. São Paulo: Editora Santos. 609p.

Schuelke M. (2000) An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. **Nature Biotechnology**, 18: 233-234.

Slatkin MA. (1995). A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies. **Genetics**, 130: 457-462.

Su DZ. (1986). The discovery of a fossil osteoglossid fish in China. **Vertebrata Palasiatica**, 24: 10-19.

Tachida H, Iizuka M. (1992). Persistence of repeated sequences that evolve by replication slippage. **Genetics**, 131: 471-478.

Taylor JS, Sanny P, Breden F. (1999). Microsatellite alleles size homoplasmy in the guppy (*Poecilia reticulata*). **Journal of Molecular Evolution**, 48: 245-247.

Tautz D. (1993). Notes on the definition and nomenclature of tandemly repetitive DNA sequences. In: Pena DJ, Chakraborty R, Epplen JT, Jeffreys AJ. (Eds.). **DNA fingerprinting: state of the science**. Basel: Birkhäuser Verlag, 67: 21-28.

Tautz D, Schlötterer C. (1994). Simple sequences. **Current Opinion in Genetics & Development**, 4: 832-837.

Tavares-Dias M, Barcellos JFM, Marcon JL, Menezes GC, Ono EA, Affonso EG. (2007). Hematological and biochemical parameters for the pirarucu *Arapaima gigas* Schinz, 1822 (Osteoglossiformes, Arapaimatidae) in net cage culture. **Electronic Journal of Ichthyology**, 2: 61-68.

Temnykh S, DeClerck G, Lukashova A, Lipovich L, Cartinhour M, McCouch S. (2001). Computational and experimental analysis of microsatellites in rice (*Oryza sativa* L.): frequency, length variation, transposon association, and genetic marker potential. **Genome Research**, 11: 1441-1452.

Tsallis C, Bigatti E. (2004). Nonextensive statistical mechanics: A brief introduction. **Continuum Mechanics and Thermodynamics**, 16(3): 223-235.

USAID – United States Agency for International Development. (2005). **Conserving biodiversity in the Amazon basin: context and opportunities for USAID**. Washington, D.C.: U.S. Agency for International Development. 111p.

Val AL. (2004). Amazônia: conhecimento, preservação e progresso. In: Cadernos SBPC 3. **Registro de debates da 56ª Reunião Anual. Biodiversidade e clima**. Cuiabá: SBPC. 30-42p.

Valière N. (2002). GIMLET: a computer program for analyzing genetic individual identification data. **Molecular Ecology Note**, 2(3): 377-379.

van Oosterhout C, Hutchinson WF, Wills DPM, Shipley P. (2004). Micro-Checker: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. **Molecular Ecology Notes**, 4: 535-538.

Vari RP, Malabarba LR. (1998). Neotropical ichthyology: an overview. In: Malabarba LR, Reis RE, Vari RP, Lucena ZMS, Lucena CAS. (Editors). **Phylogeny and classification of neotropical fishes**. Porto Alegre: Edipucrs. 1-11p.

Venturieri R, Bernardino G. (1999). Pirarucu, espécie ameaçada pode ser salva através do cultivo. **Revista Panorama da Aqüicultura**, 9: 13-21.

Veríssimo J. (1895). **A pesca na Amazônia**. Rio de Janeiro: Livraria Alves. 137p.

Viana JP, Castello L, Damasceno JM, Amaral ESR, Estupiñán G, Arantes CC, Batista G, Garcez DS, Barbosa S. (2007). Manejo comunitário do pirarucu *Arapaima gigas* na Reserva de Desenvolvimento Sustentável de Mamirauá, Amazonas, Brasil. In:

- Viana JP, Castello L, Damasceno JM, Amaral ESR, Estupiñán G, Arantes CC, Batista G, Garcez DS, Barbosa S. (Org.). **Áreas protegidas como instrumento de gestão pesqueira**. Brasília: Núcleo da Zona Costeira Marinha. 4: 239-261.
- Vitalis R, Dawson K, Boursot P, Belkhir K. (2003). DetSel 1.0: a computer program to detect markers responding to selection. **Journal of Heredity**, 94(5): 429-431.
- Weber JL. (1990). Informativeness of human (dC-dA)_n · (dG-dT)_n polymorphisms. **Genomics**, 7: 524-530.
- Weir BS, Cockerham CC. (1984). Estimating F statistics for the analysis of population structure. **Evolution: International Journal of Organic Evolution**, 38: 1358-1370.
- Wilson EO. (1997). A situação atual da diversidade biológica. In: Wilson EO. (Editor). **Biodiversidade**. Rio de Janeiro: Editora Nova Fronteira. 3-24p.
- Winemiller KO, Agostinho AA, Caramaschi EP. (2003). Fishes. In: Dudgeon D, Cressa C. (Eds.). **Tropical stream ecology**. Amsterdam: Elsevier Science.
- Wolff RK, Plaetke R, Jeffreys AJ, Blanc R. (1989). Unequal crossing over between homologous chromosomes is not the major mechanism involved in the generation of new alleles at VNTR loci. **Genomics**, 5: 382-384.
- Wright S. (1921). Systems of mating. **Genetics**, 6: 111-178.
- Wright S. (1965). The interpretation of population structure by F-statistics with special regard to systems of mating. **Evolution**, 19: 395-420.
- Xu X, Peng M, Fang Z, Xu X. (2000). The direction of microsatellite mutations is dependent upon allele length. **Nature Genetics**, 24: 396-399.
- Yue GH, Liew WC, Orban L. (2006). The complete mitochondrial genome of a basal teleost the Asian arowana (*Scleropages formosus*, Osteoglossidae). **BMC Genomics**, 7: 242. doi:10.1186/1471-2164-7-242.
- Zajac P, Öberg C, Ahmadian A. (2009). Analysis of short tandem repeats by parallel DNA threading. **PLoS One**, 4(11): e7823. doi:10.1371/journal.pone.0007823.
- Zhang D, Hewitt GM. (2003). Nuclear DNA analyses in genetic studies of populations: practice, problems and prospects. **Molecular Ecology**, 12: 563-584.
- Zhivotovsky LA. (1999). Estimating population structure in diploids with multilocus dominant DNA markers. **Molecular Ecology**, 8: 907-913.
- Zhu Y, Queller DC, Strassmann JE. (2000). A phylogenetic perspective on sequence evolution in microsatellite loci. **Journal of Molecular Evolution**, 50: 324-338.

This document was created with Win2PDF available at <http://www.win2pdf.com>.
The unregistered version of Win2PDF is for evaluation or non-commercial use only.
This page will not be added after purchasing Win2PDF.