



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PROGRAMA MULTI-INSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM BIOTECNOLOGIA-PPGBIOTEC



Análise populacional de *Brycon amazonicus* (SPIX & AGASSIZ, 1829) na bacia do rio Madeira utilizando marcadores moleculares mitocondriais e microsatélites

MOZANIL CORREIA PANTOJA

MANAUS/AM

2022



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PROGRAMA MULTI-INSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
BIOTECNOLOGIA



**Análise populacional de *Brycon amazonicus* (SPIX & AGASSIZ, 1829) na bacia do
rio Madeira utilizando marcadores moleculares mitocondriais e microssatélites**

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Biotecnologia da
Universidade Federal do Amazonas
como requisito parcial para a obtenção
do título de mestre em Biotecnologia

Orientadora: Dra. Izeni Pires Farias

Co-Orientadora: Dra. Valéria Nogueira Machado

MANAUS/AM

2022

Ficha Catalográfica

Elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

-
- P198a Pantoja, Mozanil Correia
Análise populacional de Brycon amazonicus (SPIX & AGASSIZ, 1829)
na bacia do rio Madeira utilizando marcadores moleculares mitocondriais e
microssatélites / Mozanil Correia Pantoja. - 2022.
44 f. : il., p&b. ; 31 cm.
- Orientador(a): Izeni Pires Farias.
Coorientador(a): Valéria Nogueira Machado.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Amazonas, Programa
de Pós-Graduação em Biotecnologia, Manaus , 2022.
1. Genética. 2. molecular . 3. Brycon amazonicus (SPIX & AGASSIZ,
1829). 4. microssatélites . 5. populacional . I. Farias, Izeni Pires. II.
Machado, Valéria Nogueira. III. Universidade Federal do Amazonas.
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. IV. Título
-

DEDICATÓRIAS

Primeiramente a Deus, por ter me dado o dom da vida, sabedoria para enfrentar as dificuldades encontrada na vida.

A minha orientadora Dr. Izeni Pires Farias, pelas oportunidades concedidas, por confiar no meu trabalho como mestrando, e por sua generosa contribuição no conhecimento científico e pela oportunidade de realização deste trabalho.

A minha Co-orientadora Dr. Valéria Nogueira Machado, por sempre me apoiar nos momentos difíceis, e por não ter desistido de mim em nenhum momento dessa jornada.

Aos colegas do Laboratório da evolução e Genética animal -LEGAL, Aline, Sandra, Sena, Dr. Fabio, Alexandre e Fabricio.

A minha querida Turma da UFAM, que sempre foi companheira e na distância me ajudou com as burocracias.

Ao meus amigos Keven Vladier e Cleiton mendes por apoio nas atividades desse trabalho

Ao Dr. Spartaco Astolfi Filho por autorizar parte da execução deste trabalho no Laboratório de genômica no bloco M.

Ao Professor Dr. Pedro de Queiroz Costa Neto pelo apoio quando estive em Manaus, o meu muito obrigado.

Aos meus pais Moisaníel Filgueira Maciel e Valdeirez Correia Pantoja, e por todo o apoio dado.

À minha companheira Antônia Barbara da Silva Pantoja, por toda força dada mesmo nos momentos mais difícil de nossas vidas.

Ao meu querido sobrinho Jhonatha Correia Pantoja sempre tinha eu como espelho nos estudos.

Agradeço a todos aqueles que de forma direta e indireta contribuíram para a realização deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

UFAM (Universidade Federal do Amazonas) pelo apoio e por ter concedido os laboratórios é todo suporte necessário quando aluno e mestrando.

À PPG-BIOTEC (Programa Multi-Institucional de Biotecnologia) pelo acesso ao título de mestre na respectiva área, agradeço desde já.

Ao CNPq (Conselho Nacional de Pesquisa e Tecnologia) pelos auxílios cedidos na forma da bolsa de estudo concedida a minha pessoa.

LTBM-INPA (Ao Laboratório Temático de Biologia Molecular) onde foram realizados partes do sequenciamento.

LEGAL (Laboratório da evolução e Genética animal) onde realizei as atividades por mim desenvolvida.

RESUMO

A bacia Amazônica constitui o maior sistema hidrográfico do planeta, com aproximadamente sete milhões de km². Entre seus principais rios destaca-se o rio Madeira, um dos maiores tributários do Amazonas, que nasce nos Andes bolivianos e percorre mais de 3.000 km até desaguar no rio Amazonas. A bacia do rio Madeira abriga elevada diversidade de peixes, incluindo diversas espécies de importância comercial, sendo reconhecidos seis grandes portos de desembarque pesqueiro na região. A produção pesqueira baseia-se principalmente em espécies migradoras, entre as quais se destacam os peixes popularmente conhecidos como matrinxã.

O presente estudo teve como objetivo caracterizar a diversidade genética das populações naturais de *Brycon amazonicus* ao longo da bacia do rio Madeira, utilizando marcadores microssatélites e mitocondriais. Foram analisadas 131 amostras coletadas ao longo da calha do rio. Os resultados indicaram níveis heterogêneos de variabilidade genética entre as localidades amostradas. Os testes de neutralidade (D de Tajima e F_s de Fu) não foram significativos, sugerindo equilíbrio genético e ausência de desvios da neutralidade para o marcador mitocondrial. As 131 sequências do gene ATPase (subunidades 6 e 8) foram agrupadas em sete haplótipos, cujas frequências variaram entre as localidades.

Para os 10 loci de microssatélites, os parâmetros de diversidade genética também apresentaram variação espacial. O número médio de alelos (NA) variou de 4,50 (Reservatório) a 9,71 (Manicoré). A heterozigosidade observada (HO) variou de 0,49 (rio Aripuanã) a 0,73 (Humaitá), enquanto a heterozigosidade esperada (HE) variou de 0,59 (rio Aripuanã) a 0,83 (Nova Olinda). A Análise de Variância Molecular (AMOVA) revelou que 94,63% da variância genética total estava distribuída dentro das populações e 5,37% entre populações ($F_{ST} = 0,05369$; $P = 0,01$). A diferenciação genética par a par (Φ_{ST}) foi, em geral, baixa ou negativa entre a maioria das localidades, indicando ausência de estruturação genética significativa ao longo do rio Madeira para o marcador mitocondrial ($P < 0,05$), com exceção das comparações envolvendo a localidade de Montante.

A análise Bayesiana de estrutura populacional identificou o rio Aripuanã como geneticamente estruturado em relação às demais localidades. Os resultados do programa STRUCTURE indicaram um padrão complexo, sugerindo a existência de três estoques populacionais coexistindo e comigrando na bacia do rio Madeira. De modo geral, ambos os marcadores evidenciaram diferenciação da população do rio Aripuanã e sugerem que as cachoeiras do alto rio Madeira podem atuar como barreiras parciais ao fluxo gênico de *Brycon amazonicus*.

ABSTRACT

The Amazon Basin is the largest hydrographic system on the planet, covering approximately seven million km². Among its main rivers, the Madeira River stands out as one of the largest tributaries of the Amazon, originating in the Bolivian Andes and flowing for more than 3,000 km before reaching its confluence with the Amazon River. The Madeira River basin harbors high fish diversity, including several species of commercial importance, and six major fish landing ports are recognized in the region. Fisheries production is based primarily on migratory species, among which the fishes popularly known as matrinxã are particularly important.

The present study aimed to characterize the genetic diversity of natural populations of *Brycon amazonicus* along the Madeira River basin using microsatellite and mitochondrial markers. A total of 131 samples were collected along the main channel of the river. The results revealed heterogeneous levels of genetic variability among sampling sites. Neutrality tests (Tajima's D and Fu's Fs) were not significant, indicating genetic equilibrium and no evidence of deviation from neutrality for the mitochondrial marker. The 131 sequences of the ATPase gene (subunits 6 and 8) were grouped into seven haplotypes, whose frequencies varied among localities.

For 10 microsatellite loci, genetic diversity parameters also showed spatial variation. The mean number of alleles (NA) ranged from 4.50 (Reservoir) to 9.71 (Manicoré). Observed heterozygosity (HO) ranged from 0.49 (Aripuanã River) to 0.73 (Humaitá), while expected heterozygosity (HE) ranged from 0.59 (Aripuanã River) to 0.83 (Nova Olinda). Analysis of Molecular Variance (AMOVA) revealed that 94.63% of the total genetic variation was distributed within populations and 5.37% among populations ($F_{ST} = 0.05369$; $P = 0.01$). Pairwise genetic differentiation (Φ_{ST}) was generally low or negative among most localities, indicating a lack of significant genetic structuring along the Madeira River for the mitochondrial marker ($P < 0.05$), except for comparisons involving the Montante locality.

Bayesian population structure analysis identified the Aripuanã River population as genetically structured relative to the other localities. STRUCTURE results indicated a complex pattern, suggesting the existence of three coexisting and comigrating population stocks within the Madeira River basin. Overall, both markers revealed differentiation of the Aripuanã population and suggest that the waterfalls of the upper Madeira River may act as partial barriers to gene flow in *Brycon amazonicus*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. <i>Brycon amazonicus</i> (Spix&Agassiz, 1829).....	15
Figura 2. Mapa esquemático do genoma mitocondrial.....	20
Figura 3. Barragens que fazem parte do complexo hidrelétrico do rio Madeira - usina hidrelétrica de Jirau/ RO.....	21
Figura 4. Garimpo para extração de ouro ao longo do rio Madeira.....	22
Figura 5. Mapa indicando as localidades amostradas ao longo da bacia do rio Madeira.....	24
Figura 6. Rede de haplótipos mostrando compartilhamento de haplótipos entre os indivíduos de <i>Brycon amazonicus</i> das oito localidades amostradas no rio Madeira.....	30
Figura 7. Resultado das análises no programa BAPS evidenciando a distribuição da diversidade populacional em <i>B.Amazonicus</i>	34
Figura 8 Resultado das análises do programa Structure evidenciando a presença de três grupos populacionais identificadas pelas cores verde, azul e laranja. As barras verticais correspondem aos indivíduos amostrados.....	34

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Localidades de coleta e tamanho amostral de <i>Brycon amazonicus</i> na calha do rio Madeira.....	26
Tabela 2. Localidades e tamanho amostral de <i>Brycon amazonicus</i> na calha do rio Madeira para <i>ATPase</i> e para os microssatélites	28
Tabela 3. Valores de Φ_{ST} par a par entre as populações amostradas para <i>B. amazonicus</i> na bacia do rio Madeira DNAm (P<0.05).....	29
Tabela 4. Principais parâmetros genéticos para <i>Brycon amazonicus</i> , incluindo tamanho da amostra (N), Número médio de alelos (NA), média calculada da diversidade genética considerando os 8 loci microssatélites, heterozigosidade observada (HO), e heterozigosidade esperada (HE).	30
Tabela 5. Fluxo gênico a partir dos valores de <i>N_m</i> (número de fêmeas migrantes por geração) entre as localidades amostradas com dados de <i>ATPase</i> para <i>B. amazonicus</i> na bacia do rio Madeira.....	32
Tabela 6. Fluxo gênico a partir dos valores de <i>N_m</i> (número de fêmeas migrantes por geração) entre as localidades amostradas com dados de <i>ATPase</i> para <i>B. amazonicus</i> na bacia do rio Madeira.....	33

Sumário

DEDICATÓRIAS	4
AGRADECIMENTOS	5
RESUMO	6
ABSTRACT	7
1 INTRODUÇÃO	11
2 O RIO MADEIRA	13
2.1 A pesca no rio madeira	14
2.2 <i>BRYCON AMAZONICUS</i>	15
3. CONSERVAÇÃO DOS RECURSOS GENÉTICOS	16
3.1 Marcadores microssatélites	17
4 PRINCIPAIS AMEAÇAS A <i>Brycon amazonicus</i> NA BACIA DO MADEIRA	20
5 OBJETIVOS	23
5.1 Geral	23
5.2 Específicos	23
6 METODOLOGIA	23
6.1 Obtenção dos dados mitocondriais	25
6.2 Análises populacionais com atpase	25
6.3 Análises populacionais com microssatélites	26
6.4 Análise de variabilidade genética e equilíbrio de hardy-weinberg (EHW)	27
6.5 Análise da estruturação genética	27
7 RESULTADOS E DISCUSSÃO	28
7.1 Diversidade genética de <i>B. amazonicus</i> na bacia do rio Madeira	28
7.2 Estrutura populacional de <i>B. amazonicus</i> na bacia do rio Madeira	32
8 CONCLUSÃO	36
REFERÊNCIAS	37

1 INTRODUÇÃO

A região Neotropical a qual inclui a maior parte da América do Sul e Central possui a mais diversificada fauna de peixes de água doce do mundo (Reis *et al.*, 2016). Somente a bacia Amazônica contribui com 25% dessa diversidade contabilizando um total de 1.800 espécies identificadas e catalogadas (Dagosta e De Pinna, 2019). Este número pode ser bem superior se considerados os vários ambientes que ainda não foram amostrados devido à dificuldade em acesso (Macedo *et al.*, 2015).

A bacia Amazônica é o maior sistema hidrográfico do planeta com aproximadamente sete milhões de Km², drenando cerca de 35% do continente Sul-Americano; estende-se por nove países (Brasil, Peru, Bolívia, Colômbia, Equador, Venezuela, Suriname, Guiana e Guiana Francesa). De toda essa área de drenagem, 63% estão em território brasileiro, e sua descarga anual (175.000 m³/seg.) equivale a quase 20% de toda a água doce que deságua no oceano em todo o planeta (Sioli, 1975).

O rio Madeira, um dos principais tributários do Amazonas, nasce nos Andes bolivianos e percorre mais de três mil quilômetros até sua foz no rio Amazonas. Abriga cerca de mil espécies de peixes com muitas delas contribuindo significativamente para a pesca comercial na região (Ohara *et al.*, 2013). Tamanha riqueza ictiofaunística faz desse rio, entre os já estudados, o rio com a maior diversidade de peixes do planeta. Antes do represamento do rio para geração de energia, milhares de peixes enfrentavam mais de 300 km de forte correnteza na época da piracema para se reproduzir (Queiroz *et al.*, 2013.,Torrente, 2009).

Apesar da grande abundância de pescado na região, já é notória uma diminuição de alguns estoques pesqueiros por causa da excessiva pressão da pesca e isso é facilmente verificado, tanto pela redução da quantidade quanto pelo tamanho dos espécimes capturados (Santos *et al.*, 2010).

Na bacia do rio Madeira são reconhecidos seis grandes portos de desembarque pesqueiro: Guajará-Mirim, Porto Velho, Humaitá, Manicoré, Borba e Nova Olinda do Norte (Cardoso, 2006). A produção pesqueira nessa região está baseada principalmente em espécies migradoras, cujas migrações para fins reprodutivos, tróficos ou de dispersão, são fortemente influenciadas pelo nível da água do rio (Goulding, 1979).

Dentre as espécies de importância econômica para a pesca encontram-se os

peixes popularmente conhecidos como matrinxãs pertencentes à ordem Characiformes que contém aproximadamente 1700 espécies (Oliveira et al., 2011; Chakrabarty et al., 2017). *Brycon* é um dos gêneros de Characiformes mais especiosos contendo 44 espécies (Reis et al., 2003; Lima, 2017), mas inúmeras linhagens e espécies candidatas ainda a serem descritas (Arruda et al., 2019). Com o nome popular de matrinxãs esses peixes são de médio a grande porte e são importantes economicamente em toda América Central e do Sul (Goulding, 1980). *Brycon amazonicus* contribui de forma efetiva com a pesca na região Amazônica e seu cultivo em piscicultura vem crescendo nos últimos anos (Reis et al., 2003; Kubitz, 2015; de Oliveira et al., 2017).

O peixe constitui a principal fonte de proteína para as populações ribeirinhas na Amazônia, com consumo médio de 400 g de pescado por dia para o Estado do Amazonas (Viana, 2004). O aumento da população na Amazônia ocasiona uma maior pressão sobre os estoques pesqueiros e está diminuindo o tamanho das populações naturais e com isso, uma redução da variabilidade genética da população e possível endogamia na espécie (Hilsdorff, 2013).

Entender a estrutura populacional de uma dada espécie é um passo fundamental para a implementação de medidas de conservação e uso sustentável do recurso, pois permite conhecer as diferenças genéticas que são geradas por processos vicariantes e suas relações com as diferenças adaptativas das populações (Avise, 1994).

Um dos tributários do rio Amazonas de grande importância para os recursos pesqueiros na região Amazônica é o rio Madeira. Ao longo de sua extensão de aproximadamente 3200 Km² o rio Madeira é uma das regiões mais habitadas e comercialmente exploradas na Amazônia, cuja principal atividade desenvolvida é a pesca artesanal comercial e de subsistência (Brito et al., 2016). Estima-se que na bacia do rio Madeira a pesca envolve um número aproximado de 1.700 pescadores somente nas comunidades localizadas entre Guajará-Mirim em Rondônia e Humaitá no Estado do Amazonas e, mais de 1.800 embarcações variando entre barco de pesca e canoas motorizadas e a remo (Brito et al., 2016). As principais características do rio Madeira são a cor barrenta de suas águas e a presença de rochas ao longo de seu trecho alto formando corredeiras entre as cidades de Guajará-Mirim e Porto Velho no Estado de Rondônia; atualmente essa área foi impactada devido à construção de dois empreendimentos hidrelétricos para geração de energia, uma hidroelétrica onde era a Cachoeira de Santo Antônio (UHE Santo Antônio) e onde era a Cachoeira do Jirau (UHE Jirau).

O rio Madeira é um rio com um grande volume de água que formam grandes correntezas. O ambiente lótico das corredeiras desse rio é altamente propício à desova para a grande maioria dos peixes migradores dos rios de água branca. Nesse sentido, é inegável que a eliminação destes biótopos, ou sua transformação em ambientes lênticos, se constitui num impacto altamente negativo para a vida dos peixes na bacia do rio Madeira (Santos, 2008).

Com a construção das hidrelétricas de Santo Antônio e Jirau em Rondônia, as populações de *B. amazonicus* podem estar sendo seriamente afetadas, não apenas a reprodução por conta das corredeiras estarem submersas, mas também porque a hidrelétrica é uma barreira física que afeta o fluxo gênico entre as populações dessa espécie a jusante e a montante desses empreendimentos.

Para o entendimento da dinâmica das populações de *B. amazonicus* que migram ao longo do rio Madeira, ferramentas moleculares como os marcadores microssatélites e mitocondriais são os mais indicados para estimar a variabilidade genética e a dinâmica populacional dessa espécie, o que pode nortear os programas de conservação, manejo da pesca e uso sustentável desse recurso, tão importante para essa região.

2 O RIO MADEIRA

O rio Mamoré ao encontrar-se com o rio Beni forma o rio Madeira, o maior afluente da margem direita da bacia do sistema Solimões-Amazonas. O rio Madeira recebe drenagens do oeste e parte do noroeste do escudo brasileiro, mas a maior parte de suas águas é oriunda dos Andes peruanos e bolivianos (Lundberg *et al.* 1998).

O rio Madeira é um rio de águas fortemente barrentas ou “brancas”, caracterizado pela presença de áreas de várzea nas suas margens (com vegetação e solos adaptados aos ciclos de enchente e vazante do rio) alternadas com áreas de terra firme (vegetação e solo fora do alcance dos níveis máximos da água do rio), enquanto seus tributários, com origem no escudo brasileiro, apresentam águas claras. Os maiores destes tributários de águas claras, (Aripuanã e Machado), estão localizados na margem direita do rio Madeira que apresenta ainda tributários de menor porte com águas pretas (Goulding *et al.*, 2003).

O vale do Madeira engloba aproximadamente 1.4 milhões de km², cobrindo cerca de 20% da bacia Amazônica. Tem seus formadores em território boliviano e peruano, com nascentes (na Bolívia) distando até 3.300 km da sua desembocadura no rio Amazonas, no Brasil, sendo o mais longo tributário da bacia amazônica, responsável

por cerca de 15% de toda a descarga do rio Amazonas no Atlântico. Cerca de 50% da drenagem do Madeira corre na Bolívia, 10% no Peru e 40% no Brasil (Goulding *et al.*, 2003).

O rio Madeira é um dos poucos rios de águas brancas que dispõe de extenso trecho de corredeiras ao longo de seu curso, contudo, o conjunto mais importante de corredeiras foi inundado por empreendimentos hidroelétricos entre os anos de 2011 e 2012. As primeiras corredeiras surgem próximas à cidade de Cochabamba, na Bolívia, a 3.300 km da confluência do Madeira com o rio Amazonas. No entanto, num trecho de 293 km em território brasileiro estavam concentradas 18 corredeiras, sendo as duas últimas, Teotônio e Santo Antônio, imediatamente a montante da cidade de Porto Velho, consideradas a maior barreira a navegação (Cella-Ribeiro *et al.*, 2013) e também a migração das espécies de peixes (Goulding *et al.* 2003).

2.1 A pesca no rio madeira

A ocupação da Amazônia se deu ao longo de seus principais rios, como o Amazonas e o Madeira. Nesse processo se estabeleceram comunidades ribeirinhas às margens dos rios, que também podem ser classificadas como tradicionais (Nascimento, 1996). As comunidades vivem estreitamente relacionadas ao ciclo das águas, com grande parte de sua alimentação vinda dos sistemas aquáticos.

O peixe é a principal fonte de proteína animal da população na Amazônia. A alta demanda por pescado na região confere à atividade pesqueira um importante papel econômico, social e cultural (Barthem e Fabré, 2004; Batista *et al.*, 2004), sendo considerada uma das principais atividades da várzea, onde a maioria dos moradores se dedica à pesca em período integral ou parcial (Almeida, 2006). Um dos principais recursos explorados por essas comunidades é o pescado, onde 99% dos pescadores exercem a pesca de pequena escala, tanto para subsistência quanto para comercialização, atividade essa, que é de grande importância para os mercados pesqueiros regionais (Berkes *et al.*, 2006).

A matrinxã é uma das principais espécies de peixe capturadas pelas pescarias amazônicas e contribui significativamente com o desembarque pesqueiro e a comercialização nos principais portos da região (Merona e Bitencourt, 1988). Somente em 2007, a matrinxã contribuiu em 14% para o crescimento do pescado comercializado em Rondônia (IBAMA, 2007). Esse Estado é um dos principais receptores de pescado oriundos da bacia do rio Madeira. No período de dezembro de 2003 a fevereiro de 2005,

a produção registrada em seis principais portos de desembarques na bacia do Madeira nesse Estado, foi em torno de 570 toneladas (Doria *et al.*, 2005).

Um estudo realizado em 2016 mostra que a matrinxã (*B. amazonicus*) representou aproximadamente 30% do total de peixes desembarcados no município de Porto Velho com um total de 35.748 kg (Doria *et al.*, 2016).

2.2 *BRYCON AMAZONICUS*

Popularmente conhecida como matrinxã ou jatuarana *B. amazonicus* (Figura 01) pertence à ordem Characiformes, família Characidae e subfamília Bryconinae. Ocorre naturalmente nas bacias do Amazonas, Orinoco e Essequibo (Reis *et al.*, 2003). É considerada uma das maiores espécie do gênero podendo alcançar até 70 cm de comprimento e, contribui significativamente com as pescarias nessas bacias (Lima, 2017).

A matrinxã da Amazônia brasileira amplamente cultivada no Brasil tem sido denominada na maioria dos trabalhos de piscicultura como *Brycon cephalus*, no entanto, Lima (2017), em uma revisão do gênero *Brycon* caracterizou essa espécie como *B. amazonicus*, com base em características filogenéticas, sendo atualmente adotada esta classificação. Este autor restringe o nome *B. cephalus* a espécie com distribuição no alto rio Amazonas no Peru e na Bolívia.



Figura 01: *Brycon amazonicus* (Spix & Agassiz, 1829). Fonte: SANTOS (2001).

A espécie habita rios de águas brancas, claras e pretas, realiza grandes migrações entre a calha do rio Madeira e os tributários (Goulding, 1980). De hábito alimentar onívoro, o matrinxã possui tendência a herbivoria, com amplo espectro alimentar na

fase adulta, sendo dependente de alimentos alóctones durante a época da cheia e tendo disponível na época da seca, em sua maioria, alimentos de origem autóctone (Zaniboni Filho, 2006; Silva, 2007).

Espécie de hábito diurno, desova total e fecundação externa, na vazante forma cardumes que se deslocam em direção ao encontro dos rios de águas brancas e pretas para desovar. As fêmeas iniciam o processo de maturação sexual aos 16,5 cm de comprimento padrão (Lima e Araújo-Lima, 2004).

Realiza migração reprodutiva no início da enchente, quando desce os afluentes para desovar nos rios de água branca. Faz também migração trófica, na enchente/cheia, para se alimentar na floresta alagada e deixa essa área no período de seca, adentrando no leito dos rios, onde o alimento é mais abundante. Os jovens são criados nas áreas de várzea, no período que vai da enchente até a seca. Os adultos e jovens são recrutados, no movimento rio acima no período da seca (Santos *et al.*, 2006).

3. CONSERVAÇÃO DOS RECURSOS GENÉTICOS

O ambiente aquático no planeta terra sempre pareceu uma fonte inesgotável de alimentos e riquezas para a humanidade. O incremento tecnológico atrelado à pesca fez com que o mito de que os recursos biológicos aquáticos são uma fonte inesgotável fosse colocado em dúvida. Tais recursos podem sim ser finitos se não propriamente manejados (FAO, 2011).

A retirada constante de animais maiores ao longo do tempo, afeta a composição genética do estoque, eliminando os genes relacionados ao crescimento rápido e diminuindo o tamanho médio dos indivíduos remanescentes (Conover e Munch, 2002). A exploração de estoques, sem o conhecimento prévio de sua variabilidade genética e do número real de espécies existentes pode levar à perda de linhagens isoladas reduzindo a variabilidade genética total das mesmas (Frankham, 2005).

Um avanço nos estudos da variabilidade genética das espécies, foi a utilização de marcadores moleculares dentro de programas de melhoramento genético, com o objetivo de verificar desde o grau de consanguinidade, até fazer estimativas do tamanho efetivo das populações (N_e) (Norris *et al.* 2000).

Com aumento demográfico na região amazônica, as espécies comercialmente importantes para a pesca como *B. amazonicus*, por exemplo, vêm sofrendo uma pressão da captura muito grande pela pesca comercial, contribuindo assim para diminuição de

indivíduos na natureza. Para que os programas de conservação e produção de peixes apresentem resultados satisfatórios imediatos e de longo prazo, é necessário realizar o monitoramento genético das populações de peixes visando evitar a endogamia (Lopera-Barrero *et al.*, 2002).

Os recursos genéticos, especificamente de água doce, não estão somente baseados na diversidade interespecífica, mas também, no que concerne à viabilidade em longo prazo da espécie, que é a diversidade interpopulacional. Populações locais são susceptíveis a fragmentação ambiental e tal realidade está cada vez mais presente nas bacias hidrográficas brasileiras devido às pressões econômicas por geração de energia para o crescimento econômico e ocupação populacional de regiões próximas aos recursos hídricos (Hiltsdorf, 2013).

3.1 Marcadores microssatélites

Os marcadores moleculares são ferramentas muito úteis em estudos populacionais, podendo ser utilizados como auxiliares para pesquisas em diferentes campos: estimativa de níveis de heterozigosidade, estruturação de populações selvagens ou cultivadas, taxas de divergências genéticas entre populações, migração, tamanho populacional, seleção natural e eventos históricos (Parker *et al.*, 1998; Sunnucks, 2000).

Os microssatélites (Sequências Simples Repetidas; SSR) consistem de um a seis nucleotídeos repetidos em *tandem* e têm sido detectados nos genomas de eucariotos e procariotos. Esses marcadores podem ser encontrados em regiões codificantes e não codificantes e são caracterizados por altos níveis de polimorfismo (Zane *et al.*, 2002). São classificados de acordo com o tipo de sequência repetida, como perfeitos, imperfeitos, interrompidos ou compostos. Em um microssatélite perfeito, a sequência repetida não é interrompida por alguma base não pertencente ao motivo (p. ex.: TATATATATATATATA), enquanto em um microssatélite imperfeito há um par de bases entre os motivos repetidos que não corresponde com o motivo da sequência (p. ex.: TATATACATATATA) (Weber, 1990; Goldstein e Schlotterer, 1999).

Devido ao elevado nível de polimorfismo, herança Mendeliana e ao fato de eles aparentemente seguirem modelos evolutivos simples, os microssatélites são os marcadores moleculares mais utilizados atualmente em estudos genéticos com peixes (Yue *et al.*, 2002). Os primers desenvolvidos para uma espécie também podem ser amplificados em outras espécies embora não haja necessidade de que essas espécies sejam intimamente relacionadas, a porcentagem dos locos amplificados decresce à

medida que aumenta o tempo que separa as espécies (Fitzsimmons *et al.*, 1995).

Esses marcadores tem sido utilizados em vários estudos com espécies de peixes da bacia Amazônica. Em um estudo populacional com *Arapaima gigas* utilizando marcadores microssatélites, Hrbek e colaboradores em (2007) concluem que o pirarucu forma uma população contínua com grande fluxo genético entre as localidades amostradas, com um efeito de isolamento por distância observada entre os extremos da distribuição ao longo da calha do sistema Solimões-Amazonas. Oliveira *et al* (2017) avaliando a diversidade genética de populações silvestres e de piscicultura de *Brycon amazonicus*, utilizando dez loci microssatélites verificaram que as frequências alélicas mostraram que muitos alelos estavam faltando na população de aquicultura de Balbina, e a diversidade foi mais baixa comparada com as demais populações, porém não houve diferença significativa na heterozigosidade entre a aquicultura e as populações silvestres. No entanto as populações de aquicultura são diferenciadas umas das outras e das populações silvestres devido à ação da deriva genética em estoques populacionais pequenos. Os autores ainda constataram que *B. amazonicus* forma apenas uma população na bacia central da Amazônia.

Outra abordagem utilizando dados de 13 loci microssatélites e dois genes mitocondriais foi realizada por Santos *et al.*, (2018) com populações naturais de tambaqui (*Colossoma macropomum*). Na pesquisa os autores encontraram moderados níveis de variabilidade genética considerando os loci microssatélites. No entanto, na análise de estrutura populacional utilizando ambos marcadores os resultados indicaram que o tambaqui forma uma única e grande população panmítica na calha do sistema Solimões-Amazonas, suportado por um intenso fluxo gênico entre as localidades. Por outro lado, os resultados também mostraram uma estrutura genética para as populações de tambaqui das regiões de cabeceiras dos rios Juruá, Purus, Madeira e Tapajós e também para as populações provenientes de rios de águas pretas, sendo as maiores diferenciações genéticas observadas entre a bacia do Amazonas e a sub-bacia Boliviana.

Estudo em outra espécie de *Brycon* realizada por Sanches (2007), evidenciaram uma estrutura genética populacional em *Brycon hilarii*, através dos marcadores microssatélites, e mostrou que as populações apresentaram níveis de diversidade genética bastante similares, mas com, pelo menos, duas populações geneticamente estruturadas coexistindo dentro da extensão amostrada.

O DNA MITOCONDRIAL

Na década de 1980, a molécula do DNA mitocondrial (DNAm) despertou a atenção dos geneticistas de populações, pois esta molécula apresenta características favoráveis para estudos genéticos populacionais. Uma das razões em se usar o DNAm nesse tipo de estudo deve-se a sua alta taxa de mutação, estimada entre cinco a dez vezes maior ($5,7 \times 10^{-8}$ substituição/sítio/ano) do que a de genes codificadores de proteínas do DNA nuclear, o fato dessa molécula não sofrer recombinação (Brown *et al.*, 1982). Isto porque outro fator que ocorre por conta que 95% do oxigênio molecular metabolizado é processado nas mitocôndrias, sendo este oxigênio altamente reativo podendo provocar danos no DNA e aumentar a quantidade de erros durante a replicação (Richter *et al.*, 1988).

O gene da ATPase codifica a enzima ATPase que é responsável pela hidrólise do ATP produzindo ADP e fosfato na respiração celular. Por ser um gene codificante, tende a ser mais conservado que os outros segmentos do DNAm como o *D-loop*, por exemplo. Os genes das subunidades 6 e 8 da ATPase são sobrepostos e por isso se espera que a taxa de evolução desses genes seja mais lenta que a encontrada nas sequências similares com somente uma fase de leitura. A razão é que a proporção de sítios não degenerados é maior nestes genes, reduzindo assim a proporção de mutações sinônimas em relação ao número total de mutação (Miyata e Yasunaga, 1978).

O genoma mitocondrial (Figura 02) inclui 13 genes codificadores de proteínas representando 90% do genoma, 22 RNAs transportadores (tRNAs), 2 RNAs ribossomais (12S e 16S rRNA) e uma região não codificadora chamada de região controle ou alça D (DLoop), (Avice, 1986; Meyer, 1993). Este genoma é geneticamente mais eficiente do que o DNA nuclear (Gray, 1989), por não conter sequências duplicadas e íntrons (Wolstenholme e Clary, 1985). O DNAm é haplóide e sexualmente herdado de linhagem materna, o que permite traçar genealogias de fêmeas de uma população natural (Lasman *et al.*, 1981).

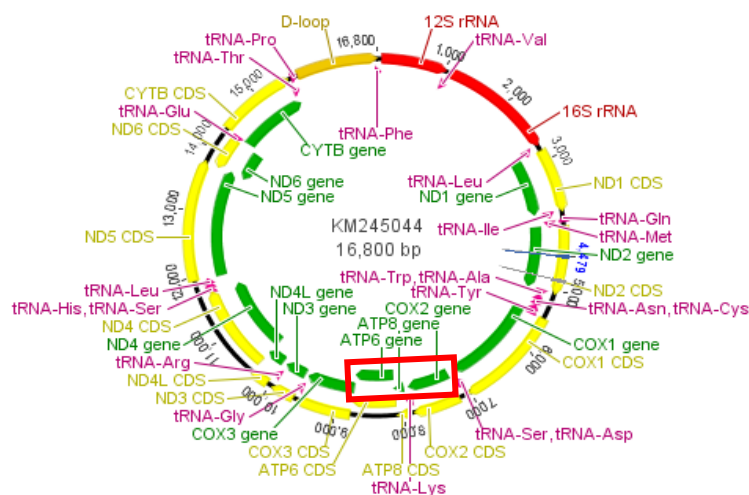


Figura 02: Mapa esquemático do genoma mitocondrial de *Brycon orbignyanus*. Em destaque as subunidades 8 e 6 da ATPase. Dados obtidos de Brandão-Dias *et al.*, 2014.

Estudos com o DNA mitocondrial de peixes da bacia Amazônica de maneira geral mostram alto grau de variabilidade genética: Hrbek *et al.*, 2005; Machado *et al.*, 2017; de Oliveira *et al.*, 2017; Santos *et al.*, 2018.

Schneider *et al.*, (2007), analisando a variabilidade genética de *Carnegiella strigata* provenientes de localidades dos rios Negro e Uatumã na Amazônia central, utilizando sequências nucleotídicas dos genes ATPase 8 e 6 do DNA mitocondrial (646 pb), constataram a presença de duas linhagens monofiléticas de *Carnegiella* com distância genética entre as duas variando de 10 a 12%.

Utilizando as regiões ATPase 6 e 8 do DNA mitocondrial para inferir as relações filogenéticas entre espécies do gênero *Prochilodus* nas bacias dos rios Paraná, Amazonas, Orinoco e Magdalena, Sivasundar *et al.*, (2001), encontraram cada bacia abrigando uma linhagem exclusiva de *Prochilodus*.

4 PRINCIPAIS AMEAÇAS A *Brycon amazonicus* NA BACIA DO MADEIRA

Uma das maiores ameaças para qualquer tipo de espécie é a perda de habitat isso leva a efeitos catastróficos na redução das espécies. Essa perda de habitat aconteceu para muitas espécies de peixes habitantes das corredeiras do rio Madeira com a construção dos complexos hidrelétricos de Santo Antonio e Jirau nessa bacia (Figura 03). Especificamente em relação ictiofauna e a pesca, os principais impactos provocados pelas hidrelétricas estão fortemente vinculados a interrupção das rotas migratórias, ao desaparecimento de biótopos e as alterações da dinâmica e qualidade da

água (Santos, 2008).



Figura 03: Uma das barragens do complexo hidrelétrico do rio Madeira - usina hidrelétrica de Jirau/ RO: Fonte: ecoa.org.br (2016).

O programa brasileiro de aproveitamento hidrelétrico (AHE) do Alto rio Madeira realizou a construção de duas hidrelétricas relativamente próximas entre si, ambas situadas entre trechos marcados pela presença de corredeiras. Nesses trechos, existem diversas ilhas, constituídas de afloramentos rochosos, local de reprodução de diversas espécies de peixes, entre elas *B. amazonicus* (Santos, 2008).

Outra ameaça a *B. amazonicus* é o garimpo ilegal que ocorre ao longo do rio Madeira (Figura 04), pois essa atividade além de destruir o meio ambiente é responsável por contaminação da água e do solo por mercúrio. As populações ribeirinhas da Bacia Amazônica são dependentes do consumo de peixe para o seu sustento. O estudo com peixes é importante quando se trata de um ecossistema aquático porque estes organismos apresentam diferentes hábitos alimentares e de vida e ocupam diferentes nichos (Kasper *et al.*, 2007). Observa-se que os peixes carnívoros são as principais via de exposição do metilmercúrio à população que se alimenta desse pescado.



Figura 04: Garimpo para extração de ouro ao longo do rio Madeira. Fonte: Estado de RO, 2004

Os rejeitos da exploração do garimpo ilegal são despejados nos córregos e são carregados ao rio, afetando a vida das comunidades de peixes e população ribeirinha que depende do pescado para sua alimentação e fonte de renda através da pesca realizada ao longo do rio Madeira.

A pesca é uma das atividades mais antigas desenvolvidas na bacia do Madeira, seja ela para subsistência das famílias ribeirinhas ou para comércio nos grandes centros urbanos. *B. amazonicus* é uma das espécies de peixes mais apreciadas pela população ribeirinha por ser bastante palatável e alcançar bom rendimento em peso. É a segunda espécie mais criada pelos piscicultores na região, no entanto, *Brycon* forma grandes cardumes que fazem migração para se reproduzir.

As pescarias ocorreram principalmente nos rios, onde são capturados cerca de 80% do pescado desembarcado, em segundo lugar estão os lagos, onde são capturados cerca de 10%. Os demais ambientes, igapós e igarapés, juntos, corresponderam a aproximadamente 5% da produção. A pesca nos rios é realizada todo o ano, porém é mais intensa no período da vazante/seca quando os cardumes estão migrando. Nos lagos, as capturas também ocorrem durante todo o ano, sendo numericamente maior na enchente e na vazante (Doria *et al.*, 2012).

A pesca comercial na região do médio rio Madeira incide principalmente sobre um grupo de aproximadamente 30 espécies ou grupos de espécies, sendo os jaraquis (*Semaprochilodus* spp), o pacu (*Mylossoma albiscopeum*), a curimatã (*Prochilodus nigricans*), as sardinhas (*Triportheus* spp) e as matrinxãs ou jatuaranas (*Brycon* spp) as mais frequentemente capturadas (Cardoso e Freitas, 2007).

Assim, conhecer os níveis de diversidade genética e testar a estrutura populacional da espécie é de fundamental importância para qualquer medida de manejo e conservação futuros.

5 OBJETIVOS

5.1 Geral

Caracterizar a diversidade genética das populações naturais de *Brycon amazonicus* ao longo da bacia do rio Madeira, através de marcadores microssatélites e mitocondriais, com uma abordagem que possa auxiliar na conservação de recursos genéticos dos estoques naturais.

5.2 Específicos

Examinar a existência de estruturação genética nas populações naturais de *B. amazonicus* na calha principal do rio Madeira;

Estimar os níveis de fluxo gênico entre as populações de *B. amazonicus* analisadas;

Verificar se as corredeiras do rio Madeira são barreiras ao fluxo gênico das populações de *B. amazonicus*;

6 METODOLOGIA

Amostras de *Brycon amazonicus* foram coletadas ao longo da calha do rio Madeira nas localidades de Nova Olinda do Norte, Borba, rio Aripuanã, Manicoré e Humaitá no estado do Amazonas e na região das antigas corredeiras desse rio no estado de Rondônia (Figura 5). Nessa área as coletas foram realizadas em pontos a montante da hidrelétrica de Jirau, no reservatório entre as duas hidrelétricas e a jusante da hidrelétrica de Santo Antônio.



Figura 05: Mapa indicando as localidades amostradas ao longo da bacia do Rio Madeira. Da foz à montante: Nova Olinda do Norte, Borba, Novo Aripuanã, Manicoré, Humaitá no estado do Amazonas. Jusante da hidrelétrica de Santo Antônio, Reservatório entre Santo Antônio e Jirau e Montante da hidrelétrica de Jirau.

Os espécimes foram obtidos com pescadores locais coletados através de pesca artesanal nos arredores das cidades. As amostras de tecido desses exemplares encontram-se depositadas na Coleção de Tecidos de Genética Animal – CTGA-UFAM da Universidade Federal do Amazonas e na Coleção de tecidos da Universidade Federal de Rondônia.

Pedaços de tecidos musculares ou nadadeiras dos peixes coletados foram preservados em álcool 96% para posterior análise em laboratório. O DNA genômico foi extraído seguindo os procedimentos gerais de: rompimento da célula, separação dos ácidos nucleicos através da remoção de proteínas e restos celulares e, purificação final. Para tanto foi utilizada uma solução de CTAB 2% (NaCl, EDTA 0,5 M, Tris Hcl 1M, Pvppolivinil) (Doyle e Doyle, 1987), com algumas modificações e adição de Proteinase K. O DNA foi então purificado, removendo dos ácidos nucleicos as proteínas contaminantes (Kreuzer e Massey, 2002) por meio de lavagem com clorofórmio/álcool isoamílico. Após a remoção das proteínas, o DNA foi precipitado utilizando-se isopropanol frio e em seguida foi submetido a uma lavagem com álcool etílico a 70%. O pellet formado secou em temperatura ambiente e foi então resuspendido em 50 µL de água miliq. Em seguida a concentração do DNA extraído foi checada em gel de agarose

1% e no espectrofotômetro NanoDrop 2000 (ThermoCientific).

6.1 Obtenção dos dados mitocondriais

O gene mitocondrial ATPase (subunidades 6 e 8) foi amplificado por meio de reação em cadeia da polimerase em um volume final de 15 μL sendo: 1 μL de DNA genômico total; 1.2 μL de MgCl_2 (25mM); 1.2 μL de DNTP (10mM); 1.5 μL de Buffer 10X (Tris-KCl 200 mM pH 8.5); 1.5 μL de cada um dos primers (BryATP_F 5' ATA CCC CTC CCC ATC AAA TC 3' e BryATP_R 5' AAT GAT GGC GGT TAG GAG TG 3'); 0.3 μL de Taq DNA Polimerase (1U/ μL) e 6.8 μL de H_2O deionizada.

As condições de ciclagem consistiram em desnaturação inicial a 93°C por 1 minuto (uma única vez), seguido de 35 ciclos de: desnaturação a 73°C por 10 segundos; anelamento na temperatura de 50°C por 45 segundos e extensão a 72°C por 1 minuto e 30 segundos. Após os 35 ciclos, finalizou-se com uma extensão final a 72°C por 7 minutos (uma única vez). O produto da PCR foi purificado via ExoSAP-IT® seguindo a orientação do fabricante.

As reações de sequenciamento foram feitas para um volume final 10 μL , utilizando o kit *Big Dye terminator* seguindo o protocolo do fabricante (Thermo Fisher). Ao término da reação de sequenciamento, o produto resultante foi submetido ao protocolo EtOH/EDTA de precipitação. O produto precipitado foi ressuspenso em 10 μL de Hi-Di formamida (Thermo Fisher), e as sequências nucleotídicas foram determinadas pelo sequenciador automático ABI 3500 (Applied Biosystem). As sequências obtidas foram visualizadas, alinhadas e editadas no programa Geneious 7.0.6 (Kearse *et al.*, 2012).

6.2 Análises populacionais com atpase

Para as análises de polimorfismo de DNA, foi utilizado o programa Arlequin 3.5 (Excoffier e Lischer, 2010). Ainda no Arlequin 3.5, foram realizados os testes de neutralidade F_s de Fu (Fu, 1997) e D de Tajima (Tajima, 1983) para determinar se as populações estão em equilíbrio com relação à deriva e mutações. A estrutura genético-populacional foi estimada pela Análise de Variância Molecular AMOVA (Excoffier *et al.*, 1992) e pelo Φ_{ST} par-a-par. O fluxo gênico foi estimado através de número de migrantes por geração (N_m). Estas análises também foram realizadas no programa Arlequin 3.5 (Excoffier e Lischer, 2010).

A presença de possíveis grupos biológicos dentro das populações de *B.*

amazonicus na bacia do rio Madeira foi avaliada pelo método Bayesiano usando o programa BAPS – *Bayesian Analysis of Population Structure* - versão 4.14 (Corander *et al.*, 2003).

Uma rede de haplótipos foi construída utilizando o programa Haploviewer (Salzburger *et al.*, 2011) com objetivo de visualizar a relação e a frequência dos haplótipos com a área de amostragem. Uma reconstrução filogenética de máxima verossimilhança foi realizada no programa RAxML (Stamatakis, 2014) e a árvore resultante foi utilizada como parte do *input* no programa Haploviewer, juntamente com alinhamento contendo todas as sequências.

6.3 Análises populacionais com microssatélites

Foram utilizados 10 loci de microssatélites (Tabela 1) desenvolvidos para *Brycon opalinus* (Barroso *et al.*, 2003) e *Brycon hilarii* (Sanches e Galetti, 2006) para genotipar os 141 indivíduos de *B. amazonicus* da bacia do rio Madeira. A reação em cadeia da polimerase seguiu o protocolo econômico descrito por Schuelke (2000) com condições de ciclagem consistindo em 30 ciclos de desnaturação a 94°C por 20 segundos, temperatura específica para anelamento dos primers por 20 segundos e extensão final a 68°C por 30 segundos. Para a genotipagem foi usado 1 ul do produto de PCR diluído (10-40X, dependendo da intensidade do PCR no gel de agarose), 1 ul do Rox ("homemade" protocol) e 8 ul de formamida (ThermoFisher, Inc.). As amostras foram genotipadas no sequenciador automático ABI 3130xl (Applied Biosystems) e os tamanhos dos alelos (em pares de base) foram estimados usando o programa GeneMapper versão 4.0.

Tabela 01: Dez loci microssatélites usados genotipados em indivíduos de *Brycon amazonicus*.

Loco	Sequência dos primers (5'-3')	Amplitude (bp)
Bh 5 <i>Brycon hilarii</i>	Barroso <i>et al.</i> , 2003	204-220
Bh 6 <i>Brycon hilarii</i>	Barroso <i>et al.</i> , 2003	160-184
Bh 15 <i>Brycon hilarii</i>	Barroso <i>et al.</i> , 2003	130-142
Bh 17 <i>Brycon hilarii</i>	Barroso <i>et al.</i> , 2003	152-212
Bo M1 <i>Brycon opalinus</i>	Sanches e Galetti, 2006	139-173
Bo M2 <i>Brycon opalinus</i>	Sanches e Galetti, 2006	162-242
Bo M5 <i>Brycon opalinus</i>	Sanches e Galetti, 2006	117-151
Bo M6 <i>Brycon opalinus</i>	Sanches e Galetti, 2006	142-178
Bo M7 <i>Brycon opalinus</i>	Sanches e Galetti, 2006	172-236
Bo M13 <i>Brycon opalinus</i>	Sanches e Galetti, 2006	154-176

Foram calculados: o número de alelos, a heterozigosidade esperada e observada

para cada locus, desequilíbrio de ligação entre os pares de *loci* e equilíbrio de Hardy-Weinberg para cada locus. Também foram estimados os índices de endogamia (F_{IS}) e de fixação de alelos (F_{ST}) dentro e entre as localidades. Foi estimada a estruturação genética geral pela Análise de Variância Molecular - AMOVA (Excoffier *et al.*, 1992). A significância estatística das estimativas foi determinada por testes de permutação (1000 permutações) e os níveis de significância dos testes envolvendo múltiplas comparações foram ajustados usando a correção sequencial de Bonferroni (Rice, 1989). Esses testes foram realizados no programa Arlequin 3.5 (Excoffier e Lischer, 2010). O programa HPrare (Kalinowski, 2005) foi utilizado para estimar a riqueza alélica através da análise de rarefação para que possíveis problemas ligados à representatividade dos números amostrais não interfiram nos resultados.

6.4 Análise de variabilidade genética e equilíbrio de hardy-weinberg (EHW)

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

6.5 Análise da estruturação genética

As estimativas de subdivisão entre os grupos de indivíduos analisados neste estudo foram realizadas pela Análise de Variância Molecular (AMOVA) (Excoffier *et al.*, 1992) aplicando-se o F_{ST} de Wright (1969) que representa a quantidade de diferenciação e fluxo gênico entre as populações (Neigel, 2002). Essas análises foram realizadas com 10.000 permutações e foram implementadas no programa ARLEQUIN 3.1 (Excoffier *et al.*, 2006).

Para complementar a análise de genética de populações tradicional, descrita acima foi realizada a análise Bayesiana implementada no programa *Structure* (Pritchard *et al.*, 2000). Esse método de análise tem como base o modelo de separação de grupos em agrupamentos (*Clusters*). Esse programa atribui indivíduos a um número K de

populações com base na estimativa Bayesiana em conformidade aos equilíbrios esperados de Hardy - Weinberg e ausência de Desequilíbrio de Ligação entre os *loci* analisados dentro de cada população. Dessa forma são definidos o número e a forma das populações, aos quais pertencem os indivíduos, não sendo necessária informação *a priori* sobre a localidade de origem de cada indivíduo.

Abaixo segue a Tabela 2 com a distribuição dos indivíduos das populações utilizados para cada marcador molecular.

Tabela 02: Localidades e tamanho amostral de *Brycon amazonicus* na calha do rio Madeira para *ATPase* e para os microssatélites.

Localidade	Data de coleta	ATPase	Microssatélites
Montante	2009, 2010, 2011	08	08
Reservatório	2009, 2010	05	07
Jusante	2010, 2011, 2012	28	22
Humaitá	09/2009	25	20
Manicoré	06 e 08/2011	14	30
Rio Aripuanã	11/2014	19	20
Borba	08/2011	32	20
Nova Olinda	06/2011	-	10
Total		131	137

7 RESULTADOS E DISCUSSÃO

7.1 Diversidade genética de *B. amazonicus* na bacia do rio Madeira

Foram sequenciadas 131 amostras para o gene da ATPase subunidades 6 e 8, distribuídos em sete localidades. Essas sequências tiveram um tamanho de 360 pares de bases (pb), onde foram observadas 19 mutações do tipo transição e oito transversões. O maior número de transições foi observado nas amostras à montante da hidrelétrica de Jirau, e as transversões nas amostras do rio Aripuanã. A composição de bases nucleotídicas apresentou 31,97% de citosina, 27,78% de timina, 25,56% de adenina e 14,69% de guanina.

Os níveis de variabilidade genética foram bastante heterogêneos ao longo da área amostrada. O número de haplótipos variou de 2 (Reservatório) a 6 (Rio Aripuanã),

localidades que apresentaram também o menor (0,40) e maior (0,80) valores de diversidade haplotípica, respectivamente. A maior diversidade nucleotídica foi observada na população a montante da hidrelétrica de Jirau e a menor no Reservatório. Todos os valores se encontram na Tabela 03.

Os testes de neutralidade seletiva de D de Tajima e F_s de Fu não foram significantes indicando portanto que as populações estão em equilíbrio genético com respeito ao gene do DNA mitocondrial, não indicando desvios da neutralidade. Entretanto, foram observados valores negativos para algumas localidades, indicando um crescimento populacional (Tajima, 1989; Fu, 1997)

Tabela 03: Índices de diversidade de *B. amazonicus* na bacia do rio Madeira baseados no gene mitocondrial ATPase. ($p \leq 0.05$).

Localidades	N	Número de haplótipos	Diversidade haplotípica	Diversidade nucleotídica	D de Tajima	F_s de Fu
Montante	08	4	0.75	0.008442	-0.16751	0.00547
Reservatório	05	2	0.40	0.003288	-1.04849	1.68758
Jusante	28	3	0.63	0.003440	1.38055	2.08388
Humaitá	25	4	0.67	0.003452	0.51186	0.80057
Manicoré	14	3	0.48	0.004150	0.07683	0.78325
Rio Aripuanã	19	6	0.80	0.003429	-0.38937	-1.67931
Borba	32	4	0.69	0.003496	0.71911	1.11174

As 131 sequências do gene ATPase subunidades 6 e 8 de *B. amazonicus*, foram resumidas em sete haplótipos (Figura 6) que apresentaram diferenças nas suas frequências entre as localidades. Observou-se três haplótipos mais comuns observados em praticamente todas as localidades. Outros haplótipos menos frequentes foram observados nas localidades do Rio Aripuanã, Borba, Humaitá e a Montante.

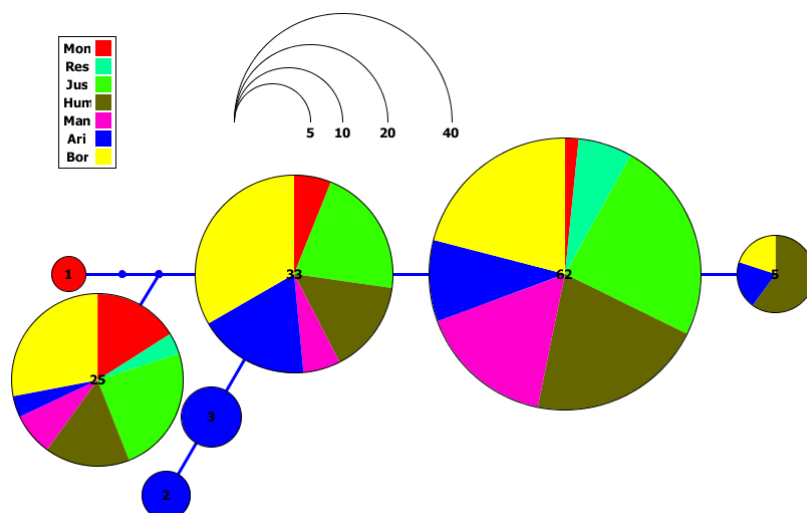


Figura 6 - Rede de haplótipos mostrando o compartilhamento de haplótipos entre os indivíduos de *B. amazonicus* das sete localidades amostradas no rio Madeira. *Nota:* Mon= Montante

Para os marcadores microssatélites os parâmetros de diversidade genética podem ser visualizados na Tabela 4. Os valores dos índices de diversidade genética também foram bastante heterogêneos entre as localidades. O número médio de alelos (NA) variou de 4.50 (Reservatório) a 9.71 (Manicoré). A heterozigosidade observada (HO) variou de 0.49 (Rio Aripuanã) a 0.73 (Humaitá), sendo acompanhada por valores maiores de heterozigosidade esperada (HE) que variou de 0.59 (Rio Aripuanã) a 0.83 em Nova Olinda.

Não foi observado desequilíbrio de ligação entre os loci. Desequilíbrio de Hardy-Weinberg foi observado em dois ou três loci de forma heterogênia entre as localidades, entretanto, o locus 2 dois apresentou desequilíbrio de H-W para todas as localidades. Poderíamos pensar que isso seja uma influência de ausência de dados, mas os micros que apresentaram mais ausência de dados foram os loci 1 e 5. Provavelmente o locus 2 possa estar sofrendo influência de alguma força evolutiva, mas não foi possível se testar essa hipótese neste momento.

Tabela 4. Principais parâmetros genéticos para *Brycon amazonicus*, incluindo tamanho da amostra (N), Número médio de alelos (NA), média calculada da diversidade genética considerando os 8 loci microssatélites, heterozigosidade observada (HO), e heterozigosidade esperada (HE).

Localidades	N	NA	Média de diversidade genética	Average HO – HE
-------------	---	----	-------------------------------	--------------------

1. Montante	8	4.86	0.58 ± 0.37	$0.57 - 0.68z$
2. Reservatório	7	4.50	0.55 ± 0.35	$0.63 - 0.74$
3. Jusante	22	7.71	0.66 ± 0.40	$0.63 - 0.74$
4. Humaitá	20	7.57	0.79 ± 0.44	$0.73 - 0.78$
5. Manicoré	30	9.71	0.74 ± 0.44	$0.61 - 0.79$
6. Rio Aripuanã	20	6.00	0.40 ± 0.29	$0.49 - 0.59$
7. Nova Olinda	10	6.71	0.83 ± 0.46	$0.67 - 0.83$
8. Borba	20	6.57	0.71 ± 0.41	$0.65 - 0.72$

Observou-se uma grande heterogeneidade nos valores dos índices de variabilidade genética independente do marcador molecular utilizado. Entretanto, em média os valores foram bastante similares, com 0.63 de diversidade haplotípica e 0.65 de diversidade gênica para marcador mitocondrial e marcador nuclear, respectivamente. Sugerindo uma diversidade genética mediana. Esses resultados também são similares aos obtidos por Oliveira et al. (2017) que utilizou seis dos microsatélites usados no presente estudo para *B. amazonicus* de três localidades diferentes da calha do rio Amazonas. Os autores reportaram valores de HO média de 0.68. Valores também similares a estes foram reportados para as populações da espécie *Brycon opalinus*, também com o mesmo marcadores microsatélites, obtendo uma média de HO de 0.56 (Barroso et al., 2005). Isso sugere que do ponto de vista da diversidade genética parece que *B. amazonicus* ainda não foi afetado pela pesca intensa nesta região. Isso provavelmente tem a ver com seu grande tamanho efetivo populacional em suas populações naturais sugeridos por Oliveira et al. (2017), o que é esperado para uma espécie r estrategista. Entretanto, esses resultados devem ser vistos com cautela uma vez que testar o efeito da pesca não foi o foco do presente trabalho.

Em 1981, a FAO recomendava o monitoramento da variabilidade genética de estoques de peixes cultivados e de populações selvagens, visando à manutenção dos recursos genéticos pesqueiros. A variabilidade genética é importante na medida em que permite que as populações se adaptem a um ambiente em transformação. A quantidade de variabilidade genética em uma população é determinada pelo número de genes em seu *pool* genético e pelo número de alelos para cada gene polimórfico (Frankham *et al.*, 2002).

De maneira geral, as preocupações e ações referentes aos impactos sobre a biodiversidade nos ecossistemas aquáticos estão muito mais relacionadas à percepção do desaparecimento de uma dada espécie do que à diminuição de sua diversidade genética. A depauperação da variabilidade genética dentro e entre populações pode ser um componente decisivo para a sobrevivência de uma espécie a médio e longo prazo, uma vez que, a habilidade de uma espécie de se adaptar às constantes modificações do meio ambiente depende em grande parte do nível de diversidade genética encontrada na mesma (Frankham *et al.*, 2002).

Considerando os resultados de diversidade genética obtidos no presente trabalho recomenda-se um monitoramento deste parâmetro, uma vez que se deve estudar quais serão os efeitos das barragens a longo prazo sobre a diversidade genética da espécie.

7.2 Estrutura populacional de *B. amazonicus* na bacia do rio Madeira

A Análise de Variância Molecular (AMOVA) mostrou que 94.63% da variância total foi observada dentro das populações e 5.37% entre as populações de *B. amazonicus* ($F_{st}=0.05369$, $P=0.01$), ou seja, mesmo que pequena existe uma significativa estrutura populacional. Ao observarmos as comparações par a par do F_{st} percebe-se que significativa estrutura vem das comparações que envolvem a localidade de Montante (Tabela 5). Para as outras comparações a diferenciação genética (Φ_{ST}) par a par entre as localidades mostrou valores muito baixos ou negativos entre a maioria das localidades na bacia do rio Madeira, indicando que as populações de *B. amazonicus* não se encontram geneticamente diferenciadas ao longo do rio ($P<0.05$), para o marcador do DNA mitocondrial.

Tabela 5. Valores de Φ_{ST} par a par entre as populações amostradas de *B. amazonicus* na bacia do rio Madeira provenientes do gene ATPase ($P<0.05$).

	Montante	Reservatório	Jusante	Humaitá	Manicoré	Rio Aripuanã	Borba
Montante	0.00000						
Reservatório	0.23408	0.00000					
Jusante	0.20255	-0.06373	0.00000				

Humaitá	0.27445	-0.09347	-0.01280	0.00000			
Manicoré	0.32405	-0.13913	-0.01673	-0.03949	0.00000		
Rio Aripuanã	0.30594	0.04976	0.05667	0.05014	0.06288	0.00000	
Borba	0.16127	-0.01074	-0.02557	0.00826	0.02331	0.05452	0.00000

Como o fluxo gênico (N_m) é inversamente proporcional ao F_{st} , observou-se fluxo gênico de 1.04 a 9.55 indivíduos para as comparações envolvendo os indivíduos de Montante e rio Aripuanã. Os valores de migrantes foram bastante elevados entre todas as outras populações ao longo do rio Madeira (Tabela 06), mas as comparações incluindo essas duas localidades evidenciaram um fluxo gênico restrito (<10 indivíduos), principalmente para a localidade Montante (<3 indivíduos migrantes por geração).

Tabela 06. Fluxo gênico a partir dos valores de N_m (número de fêmeas migrantes por geração) entre as localidades amostradas com dados de ATPase para *B. amazonicus* na bacia do rio Madeira.

Localidades	Montante	Reservatório	Jusante	Humaitá	Manicoré	Rio Aripuanã	Borba
Montante							
Reservatório	1.64						
Jusante	1.97	Inf					
Humaitá	1.32	Inf	Inf				
Manicoré	1.04	Inf	Inf	Inf			
Rio Aripuanã	1.13	9.55	8.32	9.47	7.45		
Borba	2.60	Inf	Inf	60.01	20.09	8.67	

A Análise Bayesiana de Estrutura Populacional agrupou os 131 indivíduos em cinco *clusters*, evidenciada pelas diferentes cores na Figura 7, como a melhor probabilidade (-145.8331) de agrupamento. Entretanto, estes *clusters* estão distribuídos em todas as localidades, com exceção do cluster vermelho que está presente somente nas localidades do rio Aripuanã. Essa distribuição dos *clusters* sugere uma diversidade populacional distribuída de forma homogênea (Figura 7) para a maioria das localidades, e claramente identifica uma população geneticamente estruturada para o rio Aripuanã.

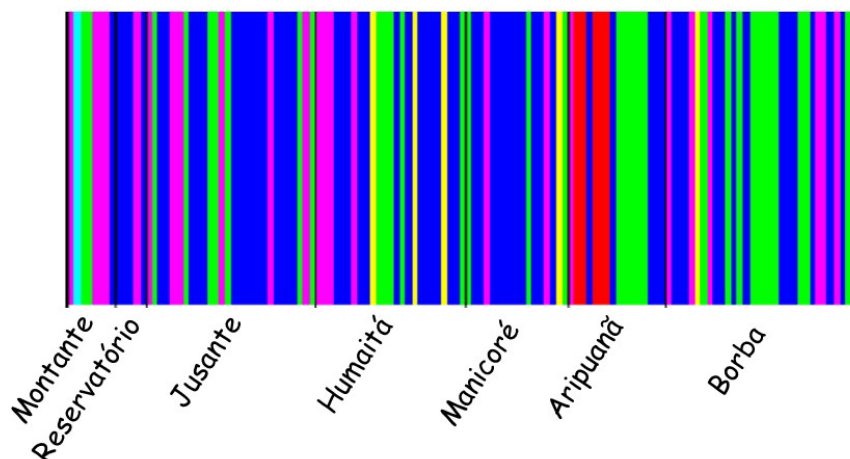


Figura 7. Resultado das análises no programa BAPS evidenciando a distribuição da diversidade populacional em *B. Amazonicus*. As cores dispostas verticalmente representam os diferentes clusters onde o cluster em cor vermelha apresenta ocorrência somente na região do rio Aripuanã.

Os resultados do programa Structure sugerem um total de três grupos populacionais correspondendo as cores azul, verde e laranja na figura 8. A predominância do grupo populacional “azul” ocorre principalmente nas localidades de Borba, parte de Manicoré e nas regiões Jusante, Reservatório e Montante das cachoeiras do alto rio Madeira. A predominância do grupo “verde” ocorre nas localidades de Nova Olinda parte de Manicoré e Humaitá. O grupo laranja foi predominante para a localidade do rio Aripuanã.

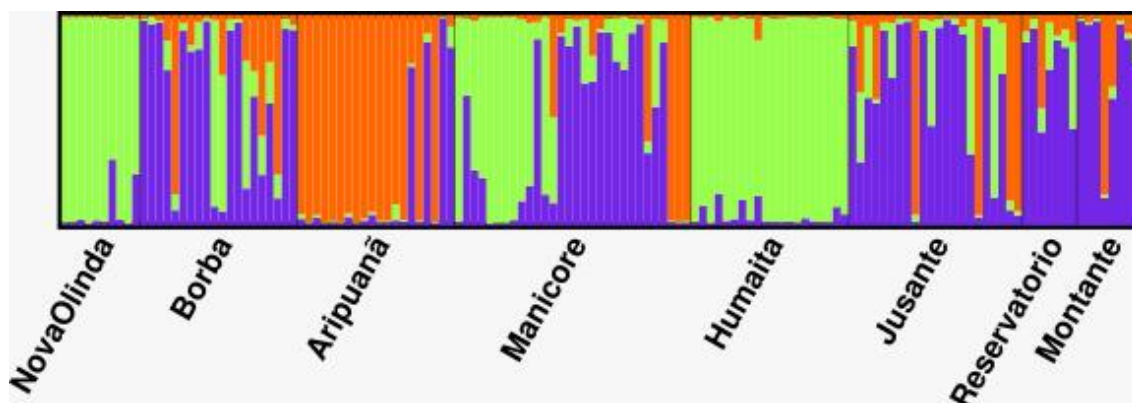


Figura 8. Resultado das análises do programa Structure evidenciando a presença de três grupos populacionais identificadas pelas cores verde, azul e laranja. As barras verticais correspondem aos indivíduos amostrados.

A estrutura populacional observada em *Brycon amazonicus* é um tanto quanto complexa, uma vez que pode indicar que diferentes estoques pesqueiros possam estar co-existindo e migrando em diferentes períodos. Esta hipótese é lançada ao se observar os três grupos populacionais obtidos e as datas das coletas (Tabela 2) percebe-se uma consistência entre os anos e os grupos populacionais. Por exemplo, as localidades de Nova Olinda, e Borba foram coletadas em junho e agosto de 2011, e elas compartilham o mesmo estoque genético; já a população de Manicoré apresenta duas populações geneticamente diferenciadas, uma coletada em junho e a outra coletada em agosto de 2011. Esses resultados estão em concordância com os resultados de Santos-Filho & Batista (2009) que através de dados de dinâmica populacional de *B. amazonicus* dos rios Purus, Madeira e Solimões, sugerem estruturação populacional nos estoques pesqueiros para a espécie, estimados pelas estruturas de tamanhos e curvas de crescimentos. Diferentes estoques pesqueiros geralmente implicam que uma determinada população está mais ou menos isolada de outros estoques da mesma espécie (Carvalho & Hauser, 1994). Estrutura populacional dentro de um mesmo sistema de drenagem tem sido encontrado para outras espécies de *Brycon*, como o observado em *Brycon lundii* (Wasko & Galetti Jr., 2002), e *Brycon orthotaenia* (Sanches et al., 2012). Interessantemente as localidades de Montante, Reservatório e Jusante apresentam padrões misturados desses estoques, e são condizentes com os diferentes anos de coleta dos indivíduos.

O padrão de estrutura populacional obtido por ambos os marcadores utilizados evidencia que as populações provenientes do rio Aripuanã são geneticamente estruturadas. Os resultados do BAPS e Structure são concordantes em evidenciar a estrutura genética da população proveniente do rio Aripuanã. Vale reportar que este rio, apesar de desembocar na margem direita do rio Madeira, nasce no Escudo Brasileiro na região do Mato Grosso. Este rio apresenta várias corredeiras e cachoeiras, sendo as principais as existentes nas imediações da cidade de Aripuanã (Salto das Andorinhas, Dardanelos, etc.). Entretanto, a coleta dos indivíduos desta localidade foi feita abaixo das cachoeiras alguns anos depois da amostragem das outras regiões. Ou seja, para esta localidade temos a questão espacial e temporal que poderiam estar contribuindo para a presença deste estoque diferenciado.

Interessantemente os resultados do Structure evidenciam alguns indivíduos que

apresentam parcelas diferentes de seu genoma provenientes dos diferentes estoques populacionais, observando-se indivíduos com até três parcelas diferentes dos estoques genéticos, como, por exemplo, alguns indivíduos da Jusante (Figura 8). Isso indica que apesar desses estoques serem geneticamente estruturados, eles ainda são capazes de fluxo gênico.

As cachoeiras do alto rio Madeira limitam o fluxo gênico dos indivíduos de *Brycon amazonicus*. Esses resultados vão de encontro aos achados de outros trabalhos realizados com outras espécies de peixes, tais como em *Colossoma macropomum* (Farias et al., 2010), *Prochilodus nigricans* (Machado et al., 2016), e *Pseudoplatystoma punctifer* (Cunha-Machado et al., 2022). As corredeiras do rio Madeira não são barreira biogeográfica à troca genética entre os espécimes a montante e jusante para *B. amazonicus*, mas exercem sim papel no isolamento parcial (fluxo gênico restrito) das populações dessa espécie.

Com a construção das hidroelétricas no alto rio Madeira foi feita há mais de 10 anos, seria muito interessante analisarmos como estão as populações atuais. Uma vez que essas hidroelétricas agora funcionam como uma barreira completa a passagem de indivíduos. Provavelmente as populações atuais, após quase 10 gerações, já estão muito mais estruturadas geneticamente. Assim, seria muito importante uma análise genética das populações de *Brycon amazonicus* nas populações atuais na drenagem do rio Madeira.

8 CONCLUSÃO

Os resultados aqui apresentados, provenientes dos dados do gene mitocondrial ATPase e dos microssatélites, sugerem que:

- Os níveis de diversidade genética obtidos para *Brycon amazonicus* são similares a outras espécies do gênero;
- Existem estoques genéticos diferentes co-migrando e co-existindo na bacia do rio Madeira;
- As cachoeiras do alto rio Madeira limitam parcialmente o fluxo gênico dos indivíduos de *Brycon amazonicus*.

REFERÊNCIAS

ALMEIDA, O. T. Manejo da pesca na Amazônia brasileira. São Paulo: Editora Petrópolis, 2006. 99 p.

ARRUDA, P. S. S.; FERREIRA, D. C.; OLIVEIRA, C.; VENERE, P. C. DNA Barcoding reveals high levels of divergence among mitochondrial lineages of *Brycon* (Characiformes, Bryconidae). *Genes*, 10(9) 639, 2019. <https://doi.org/10.3390/genes10090639>

AVISE, J. C. Mitochondrial DNA and the evolutionary genetics of higher animals. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, v. 312, n. 1154, p. 325–342, 1986. DOI: <https://doi.org/10.1098/rstb.1986.0011>

AVISE, J. C. Molecular markers, natural history and evolution. New York: Chapman & Hall, 1994. 511 p.

BARROSO, A. S.; HILSDORF, H. L. M.; MOREIRA, A. M.; MELLO, S. E. F.; GUIMARÃES, P. H.; CABELLO, Y. M.; TRAUB-CSEKO, Y. M. Identification and characterization of microsatellite loci in *Bryconopalinus* (Cuvier, 1819) (Characiformes, Characidae, Bryconiae). *Molecular Ecology Notes*, v. 3, n. 2, p. 297–298, 2003. <https://doi.org/10.1046/j.1471-8286.2003.00418.x>

BARTHEM, R. B.; FABRÉ, N. N. Biologia e diversidade dos recursos pesqueiros da Amazônia. In: RUFFINO, M. L. (Org.). A pesca e os recursos pesqueiros na Amazônia brasileira. Manaus: Provárzea, 2004. p. 11–55.

BATISTA, V. S.; ISAAC, V. J.; VIANA, J. P. Exploração e manejo dos recursos pesqueiros da Amazônia. In: RUFFINO, M. L. A pesca e os recursos pesqueiros da Amazônia brasileira. IBAMA/Provárzea, Manaus, 2004. p. 63–151.

BERKES, F.; MAHON, R.; McCONNEY, P.; POLLNAC, R.; POMERY, R. In: KALISKOSKI, D. C. (Org.). Gestão de pesca de pequena escala: diretrizes e métodos alternativos. Rio Grande: Editora FURG, 2006. 360 p.

BORGES, G. A. Ecologia de três espécies do gênero *Brycon* (Müller – Troschel, 1844) (Pisces, Characidae), no rio Negro – Amazonas, com ênfase na caracterização taxonômica e alimentação. 1986. 150 p. Dissertação (Mestrado) – Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus.

BRANDÃO-DIAS, P. F.; PORTO, J. I. R.; OLIVEIRA, C. Complete mitochondrial genome sequence of *Brycon orbignyanus* (Characiformes, Bryconidae). *Mitochondrial DNA Part A*, v. 27, n. 3, p. 1–2, 2014. <https://doi.org/10.3109/19401736.2014.971298>

BRITO, M. A. L.; FRETAS, C. E.; MORAES, S. M.; DORIA, C. R. C. Pesca artesanal no município de Humaitá, médio Rio Madeira, Amazonas, Brasil. *Boletim do Instituto de Pesca*, v. 42, n. 4, p. 914–923, 2016.

BROWN, W. M.; PRAGER, E. M.; WANG, A.; WILSON, A. C. Mitochondrial DNA sequences of primates: tempo and mode of evolution. *Journal of Molecular Evolution*, v. 18, n. 4, p. 225–239, 1982. <https://doi.org/10.1007/BF01734101>

CARDOSO, R. S.; FREITAS, C. E. C. Desembarque e esforço de pesca da frota pesqueira comercial de Manicoré (Médio rio Madeira), Brasil. *Acta Amazonica*, v. 37, n. 4, p. 605–612, 2007.

CARDOSO, R. S.; FREITAS, C. E. C. Avaliação dos desembarques da pesca comercial no município de Manicoré (rio Madeira), Amazonas, Brasil. In: Encontro Brasileiro de Ictiologia, João Pessoa, 2005. Resumos do XVI Encontro Brasileiro de Ictiologia, p. 88.

CARVALHO, V. Análise genético-populacional de *Brycon amazonicus* (Spix & Agassiz, 1829) selvagem da bacia Amazônica. Manaus: INPA, 2017. Dissertação (Mestrado).

CARVALHO, G. R.; HAUSER, L. Molecular genetics and the stock concept in fisheries. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, v. 4, p. 326–350, 1994.

CELLA-RIBEIRO, A.; TORRENTE-VILARA, G.; BARBALHO, D.; OLIVEIRA, M. As corredeiras do rio Madeira, p. 56–63. In: QUEIROZ, L. J.; TORRENTE-VILARA, G.; OHARA, W. M.; PIRES, T. H. S.; ZUANON, J.; DORIA, C. R. C. (Orgs.). Peixes do rio Madeira. Volume 1. São Paulo: Dialto, 2013. 399 p.

CHAKRABARTY, P. et al. Phylogenomic systematics of Ostariophysan fishes: ultraconserved elements support the surprising non-monophyly of Characiformes. *Systematic Biology*, v. 66, n. 6, p. 881–895, 2017. <https://doi.org/10.1093/sysbio/syx038>

CLARY, D. O.; WOLSTENHOLME, D. R. The mitochondrial DNA molecule of *Drosophila yakuba*: nucleotide sequence, gene organization, and genetic code. *Journal of Molecular Evolution*, v. 22, p. 252–271, 1985. DOI: <https://doi.org/10.1007/BF02099755>

CONOVER, D. O.; MUNCH, S. B. Sustaining fisheries yields over evolutionary time scales. *Science*, v. 297, p. 94–96, 2002.

CORANDER, J.; WALDMANN, P. M.; SILLANPAA, J. Bayesian analysis of genetic differentiation between populations. *Genetics*, v. 163, n. 1, p. 367–374, 2003. DOI: <https://doi.org/10.1093/genetics/163.1.367>

CUNHA-MACHADO, A. S. et al. Genetic differentiation and gene flow of the Amazonian catfish *Pseudoplatystoma punctifer* across the Madeira River rapids prior to the construction of hydroelectric. *Hydrobiologia*, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10750-021-04705-8>

DAGOSTA, F. C. P.; DE PINNA, M. The fishes of the Amazon: distribution and biogeographical patterns, with a comprehensive list of species. *Bulletin of the American Museum of Natural History*, v. 413, p. 1–163, 2019. DOI:

<https://doi.org/10.1206/0003-0090.413.1.1>

DE OLIVEIRA, R. C.; SANTOS, M. C. R.; BERNARDINO, G.; HRBEK, T.; FARIAS, I. P. From river to farm: an evaluation of genetic diversity in wild and aquaculture stocks of *Brycon amazonicus* (Spix & Agassiz, 1829), Characidae, Bryconinae. *Hydrobiologia*, v. 801, p. 75–88, 2017.

DORIA, C. R.; NETO, L. F. M.; BRASIL DE SOUZA, S. T.; LIMA, M. A. L. A pesca em comunidades ribeirinhas na região do médio Madeira, Rondônia. *Novas Cadernos NAEA*, v. 19, p. 163–188, 2016.

DORIA, C. R. C.; ARAÚJO, T. R.; LIMA, M. A. L.; LIMA, H. M. Diagnóstico participativo da atividade pesqueira e biologia do pescado na Reserva Extrativista do Cuniã. Relatório Técnico. Ecoporé/WWF/UNIR, 2005. 26 p.

DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin*, v. 19, p. 11–15, 1987.

EXCOFFIER, L.; SMOUSE, P. E.; QUATTRO, J. M. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics*, v. 131, p. 479–491, 1992.

EXCOFFIER, L.; LISCHER, H. E. L. Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources*, v. 10, p. 564–567, 2010.

FAO. Molecular genetic characterization of animal genetic resources. *Animal Production and Health Guidelines*, n. 9, Rome, 2011. 85 p.

FARIAS, I. P.; TORRICO, J. P.; GARCÍA-DÁVILA, C.; DOS SANTOS, M. C. F.; HRBEK, T.; RENNO, J.-F. Are rapids a barrier for floodplain fishes of the Amazon basin? A demographic study of the keystone floodplain species *Colossoma macropomum* (Teleostei: Characiformes). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, v. 56, p. 1129–1135, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2010.03.028>

FITZSIMMONS, N. N.; MORITZ, C.; MOORE, S. S. Conservation and dynamics of microsatellite loci over 300 million years of marine turtle evolution. *Molecular Biology and Evolution*, v. 12, p. 432–440, 1995.

FRANKHAM, R. Genetics and extinction. *Biological Conservation*, v. 126, p. 131–140, 2005.

FRANKHAM, R.; BALLOU, J. D.; BRISCOE, D. A. Introduction to conservation genetics. Cambridge: Cambridge University Press, 2002.

FRANKLIN, I. R. Evolutionary change in small populations. In: SOULE, M. E.; WILCOX, B. A. (Eds.). *Conservation biology: an evolutionary-ecological perspective*. Sunderland: Sinauer, 1980. p. 135–150.

FU, Y.-X. Statistical tests of neutrality of mutations against population growth,

- hitchhiking and background selection. *Genetics*, v. 147, p. 915–925, 1997.
- GOLDSTEIN, D. B.; SCHLOTTERER, C. *Microsatellites: evolution and applications*. Oxford: Oxford University Press, 1999.
- GOULDING, M.; BARTHEM, R.; FERREIRA, E. *The Smithsonian atlas of the Amazon*. Washington & London: Smithsonian Books, 2003.
- GOULDING, M. *The fish and the forest: explorations in Amazonian natural history*. Berkeley: University of California Press, 1980.
- GOULDING, M. *Ecologia da pesca no rio Madeira*. Manaus: CNPq/INPA, 1979. 172 p.
- HILSDORF, A. W. S. Marcadores moleculares e a caracterização dos recursos genéticos de peixes: desenvolvimento sustentável da aquicultura e da pesca de espécies nativas de água doce no Brasil. Pirassununga: [s.n.], 2013.
- HRBEK, T.; FARIAS, I. P.; CROSSA, M.; SAMPAIO, I.; PORTO, J. I. R.; MEYER, A. Population genetic analysis of *Arapaima gigas*, one of the largest freshwater fishes of the Amazon Basin: implication for its conservation. *Animal Conservation*, v. 8, p. 297–308, 2005.
- HRBEK, T.; CROSSA, M.; FARIAS, I. P. Conservation strategies for *Arapaima gigas* (Schinz, 1822) and the Amazonian várzea ecosystem. *Brazilian Journal of Biology*, v. 67, n. 4, Suppl., p. 909–917, 2007.
- IBAMA. Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. Estatística da aquicultura e pesca no Brasil – Ano 2007. Brasília: IBAMA/Ministério do Meio Ambiente, 2007. 151 p. Disponível em: <http://www.mpa.gov.br/mpa/seap/Jonathan/mpa3/info-statistica/docs/Estatistica-da-Aquicultura-e-Pesca-no-Brasil-2007.pdf>. Acessado em: 25 ago. 2011.
- KALINOWSKI, S. T. HP-Rare. 2005: A computer program for performing rarefaction on measures of allelic diversity. *Molecular Ecology Notes*, v. 5, p. 187–189, 2005.
- KASPER, D.; BOTARO, D.; PALERMO, E. F. A.; MALM, O. Mercúrio em peixes – fontes e contaminação. *Oecologia Brasileira (Online)*, v. 11, p. 228, 2007.
- KEARSE, M.; et al. Geneious Basic: An integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics*, v. 28, p. 1647–1649, 2012. DOI: 10.1093/bioinformatics/bts199.
- LASMAN, R. A.; SHADE, R. O.; SHAPIRA, J. F.; AVISE, J. C. The use of restriction endonucleases to measure mitochondrial DNA sequence relatedness in natural populations. *Journal of Molecular Evolution*, v. 17, p. 214–226, 1981.
- KUBITZA, F. *Aquicultura no Brasil: conquistas e desafios*. Panorama da Aquicultura, Ed., 150 p., 2015.

LOPERA BARRERO, N. M.; STREIT JR., D. P.; SIROL, R. N.; RIBEIRO, R. P.; POVH, J. A.; VARGAS, L.; GOMES, P. C.; LOPES, T. S.; JACOMETO, C. B.; BLANCK, D. V. Monitoramento da diversidade genética dos reprodutores e da progênie de *Piaractus mesopotamicus* obtidos pelo sistema seminatural. 1º Congresso Brasileiro de Produção de Peixes Nativos de Água Doce, Mato Grosso do Sul, 2007.

LIMA, A. C.; ARAÚJO-LIMA, C. A. R. M. The distributions of larval and juvenile fishes in Amazonian rivers of different nutrient status. *Freshwater Biology*, v. 49, p. 787–800, 2004.

LIMA, F. C. T. A revision of the cis-andean species of the genus *Brycon* Müller & Troschel (Characiformes: Characidae). *Zootaxa*, v. 4222, 189 p., 2017.

LUNDBERG, J. G.; MARSHALL, L. G.; GUERRERO, J.; HORTON, B.; MALABARBA, M. C. S. L.; WESSELINGH, F. P. The stage for Neotropical fish diversification: a history of tropical South American rivers. In: MALABARBA, L. R.; REIS, R. E.; VARI, R. P.; LUCENA, Z. M. S.; LUCENA, C. A. S. (Eds.). *Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes*. Porto Alegre: EDIPUCRS, 1998. p. 13–48.

MACEDO, M. G.; SIQUEIRA-SOUZA, F. K.; FREITAS, C. E. C. Abundancia y diversidad de peces predadores en lagos de várzea de la Amazonia Central. *Revista Colombiana de Ciencia Animal – RECIA*, v. 7, n. 1, p. 50–57, 2017.

MACHADO, V. N.; WILLIS, S. C.; TEIXEIRA, A. S.; HRBEK, T.; FARIAS, I. P. Population genetic structure of the Amazonian black flannel mouth characin (Characiformes, Prochilodontidae: *Prochilodus nigricans* Spix & Agassiz, 1829): contemporary and historical gene flow of a migratory and abundant fishery species. *Environmental Biology of Fishes*, v. 100, n. 1, p. 1–16, 2017.

MERONA, B.; BITTENCOURT, M. M. A pesca na Amazônia através dos desembarques do mercado de Manaus: resultados preliminares. *Memorias de La Sociedad de Ciencias Naturales La Salle*, v. 48, p. 433–453, 1988.

MIYATA, T.; YASUNAGA, T. Evolution of overlapping genes. *Nature*, v. 272, p. 532–535, 1978.

NASCIMENTO SILVA, M. G. S. Espaço ribeirinho: migração nordestina para os seringueiros da Amazônia. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Filosofia, Letras e Ciências Humanas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1996. 172 p.

NORRIS, A. T.; BRADLEY, D. G.; CUNNINGHAM, E. P. Parentage and relatedness determination in farmed Atlantic salmon (*Salmo salar*) using microsatellite markers. *Aquaculture*, v. 182, p. 72–83, 2000.

OLIVEIRA, C.; AVELINO, G. S.; ABE, K. T.; MARIGUELA, T. C.; BENINE, R. C.; ORTÍ, G.; VERI, R. P.; CASTRO, R. M. C. Phylogenetics relationships within the speciose family Characidae (Teleostei: Ostariophysi: Characiformes) based on multilocus analysis and extensive ingroup sampling. *BMC Evolutionary Biology*, v. 11, 275, 2011.

OHARA, W. M.; QUEIROS, L. J.; ZUANON, J.; TORRENTE-VILARA, G.; VIEIRA, F. G.; PIRES, T.; DORIA, C. R. C. O rio com a maior diversidade de peixes do mundo. Resumo apresentado na forma de banner. XX Encontro Brasileiro de Ictiologia, Universidade Estadual de Maringá, Paraná, 2013.

PARKER, P. G.; SNOW, A. A.; SCHUG, M. D.; BOOTON, G. C.; FUERST, P. A. What molecules can tell us about populations: choosing and using a molecular marker. *Ecology*, v. 79, n. 2, p. 361–382, 1998.

PRITCHARD, J. K.; STEPHENS, M.; DONNELLY, P. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, v. 155, p. 945–959, 2000.

QUEIROZ, L. J.; TORRENTE-VILARA, G.; OHARA, W. M.; PIRES, T. H. S.; ZUANON, J.; DORIA, C. R. C. Peixes do Rio Madeira. 1. ed. São Paulo: Dialeto Latin American Documentary, 2013.

REIS, R. E.; ALBERT, J. S.; DIDARIO, F.; MINCARONE, M. M.; PETRY, P.; ROCHA, L. A. Fish biodiversity and conservation in South America. *Journal of Fish Biology*, in press, 2016.

REIS, R. E.; KULLANDER, S. O.; FERRARIS, C. J. Jr. (Eds.) Check List of the Freshwater Fishes of South and Central America. Porto Alegre: Edipucrs, 2003.

RICE, W. R. Analyzing tables of statistical tests. *Evolution*, v. 43, p. 223–225, 1989.

RICHTER, C.; PARK, J. W.; AMES, N. B. Normal oxidative damage to mitochondrial and nuclear DNA is extensive. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, v. 85, p. 6465–6467, 1988.

SALZBURGER, W.; EWING, G.; VON-HAESELER, A. The performance of phylogenetic algorithms in estimating haplotype genealogies with migration. *Molecular Ecology*, v. 20, p. 1952–1963, 2011.

SANCHES, A. Estrutura genética populacional de *Brycon hilarii* (Characidae) da sub-bacia do Rio Miranda, e seu significado para programas de conservação. São Carlos: UFSCar, 2007. 113 p.

SANCHES, A.; GALETTI Jr., P. M.; GALZERANI, F.; DERAZO, J.; CUTILAK-BIANCHI, B.; HATANAKA, T. Genetic population structure of two migratory freshwater fish species (*Brycon orthotaenia* and *Prochilodus argenteus*) from the São Francisco River in Brazil and its significance for conservation. *Latin American Journal of Aquatic Research*, v. 40, n. 1, p. 177–186, 2012.

SANCHES, A.; GALETTI Jr., P. M. Microsatellites loci isolated in the freshwater fish *Brycon hilarii*. *Molecular Ecology Notes*, v. 6, p. 1045–1046, 2006.

SANTOS-FILHO, L. C.; BATISTA, V. S. Dinâmica populacional da matrinxã *Brycon amazonicus* (Characidae) na Amazônia Central. *Zoologia*, v. 26, n. 2, p. 195–203, 2009.

SANTOS, G. M.; FERREIRA, E. J. G.; VAL, A. L. Recursos pesqueiros e sustentabilidade na Amazônia: fatos e perspectivas. In: Revista de Direito Ambiental da Amazônia, ano 5, n. 8, p. 43–74, 2010.

SANTOS, M. C. F.; RUFFINO, M. L.; FARIAS, I. P. High levels of genetic variability and panmixia of the tambaqui *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1816) in the main channel of the Amazon River. Journal of Fish Biology, v. 77, p. 33–44, 2007.

SANTOS, M. C. F.; HRBEK, T.; FARIAS, I. P. A multilocus approach to understanding historical and contemporary demography of the keystone floodplain species *Colossoma macropomum* (Teleostei: Characiformes). Frontiers in Genetics, v. 9, 263, 2018. DOI: 10.3389/fgene.2018.00263.

SANTOS, G. M. Pesca e ictiofauna no rio Madeira. In: SWITKES, G. (Org.). Águas Turvas – alertas sobre as consequências de barrar o maior afluente do Amazonas. 1 ed. São Paulo: Internacional Rivers, v. 1, p. 94–119, 2008.

SCHNEIDER, C. H.; GROSS, M. C.; TERCENIO, M. L.; PORTO, J. I. R. Cryptic diversity in the mtDNA of the ornamental fish *Carnegiella strigata*. Journal of Fish Biology, v. 81, p. 1210–1224, 2012.

SCHUELKE, M. An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. Nature Biotechnology, v. 18, p. 233–234, 2000.

SILVA, S. A. A. Dieta natural de Brycon sp. n. “Cristalino” – matrinxã no Parque Estadual Cristalino, região norte de Mato Grosso. Tese de Doutorado – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2007.

SIOLI, H. Limnology and landscape evolution of a mighty tropical river and its basin. Dordrecht: W. Junk Publ., 1975.

SIVASUNDAR, A.; BERMINGHAM, E.; ORTÍ, G. Population structure and biogeography of migratory freshwater fishes (Prochilodus: Characiformes) in major South American rivers. Molecular Ecology, v. 10, p. 407–417, 2001.

STAMATAKIS, A. RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. Bioinformatics, v. 30, p. 1312–1313, 2014.

SUNNUCKS, P. Efficient genetic markers for population biology. Trends in Ecology & Evolution, v. 15, p. 199–203, 2000. DOI: 10.1016/S0169-5347(00)01825-5.

TAJIMA, F. The effect of change in population size on DNA polymorphism. Genetics, v. 123, p. 597–601, 1989.

TORRENTE-VILARA, G. Heterogeneidade ambiental e diversidade ictiofaunística do trecho de corredeiras do rio Madeira, Rondônia, Brasil. Tese de Doutorado, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, Amazonas, 2009. 194 p.

VIANA, J. P. A pesca no Médio Solimões. In: RUFFINO, M. L. (coord.). A pesca e os

recursos pesqueiros na Amazônia brasileira. Manaus: IBAMA/ProVárzea, p. 245–268, 2004.

WASKO, A. P.; GALETTI Jr., P. M. RAPD analysis in the Neotropical fish *Brycon lundii*: genetic diversity and its implications for the conservation of the species. *Hydrobiologia*, v. 474, p. 131–137, 2002.

WEBER, J. L. Informativeness of human (dC-dA)_n (dG-dT)_n polymorphisms. *Genomics*, v. 7, p. 524–530, 1990.

WRIGHT, S. The theory of gene frequencies. Evolution and the genetics of populations. Volume 2. Chicago: University of Chicago Press, 1969.

YUE, G.; LI, Y.; CHEN, F.; CHO, S.; LIM, L. C.; ORBAN, L. Comparison of three DNA marker systems for assessing genetic diversity in Asian arowana (*Scleropages formosus*). *Electrophoresis*, v. 23, p. 1025–1032, 2002.

ZANE, L.; BARGELLONI, L.; PATARNELLO, T. Strategies for microsatellite isolation: a review. *Molecular Ecology*, v. 11, p. 1–16, 2002.

ZANIBONI FILHO, E.; REYNALTE-TATAJE, D.; WEINGARTNER, M. Potencialidad del género *Brycon* en la piscicultura brasileña. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, v. 19, n. 2, p. 233–240, 2006.