



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE RORAIMA
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS NATURAIS**

SYLVIO ROMÉRIO BRIGLIA FERREIRA

**VARIABILIDADE GENÉTICA DA DOURADA (*Brachyplatystoma rousseauxii*-
SILURIFORMES:PIMELODIDAE), NA BACIA DO RIO BRANCO, RORAIMA,
AMAZÔNIA BRASILEIRA**

**Boa Vista
2007**

SYLVIO ROMÉRIO BRIGLIA FERREIRA

**VARIABILIDADE GENÉTICA DA DOURADA (*Brachyplatystoma rousseauxii*-
SILURIFORMES:PIMELODIDAE), NA BACIA DO RIO BRANCO, RORAIMA,
AMAZÔNIA BRASILEIRA**

**Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-graduação
em Recursos Naturais da
Universidade Federal de
Roraima, como parte dos
requisitos para obtenção do
título de mestre em Recursos
Naturais.**

**Orientador: Prof. Dr.º Mailson
Monteiro do Rego**

**Boa Vista
2007**

FOLHA DE APROVAÇÃO

SYLVIO ROMÉRIO BRIGLIA FERREIRA

**VARIABILIDADE GENÉTICA DA DOURADA (*Brachyplatystoma rousseauxii*-
SILURIFORMES:PIMELODIDAE), NA BACIA DO RIO BRANCO, RORAIMA,
AMAZÔNIA BRASILEIRA**

Dissertação apresentada como pré-requisito para a conclusão do curso de Mestrado em Recursos Naturais da Universidade Federal de Roraima, defendida em 25 de agosto de 2006 e avaliada pela seguinte banca examinadora:

Dr.Efrem Jorge Gondim Ferreira

Dr^a Izeni Pires Farias

Dr. Pablo Amezaga

À minha mãe, Diva, minha amiga e meu norte; que me mostrou como superar adversidades com humildade;

À minha esposa Iara, e meus filhos Caio e Daniel, que souberam entender os muitos momentos em que estive ausente.

AGRADECIMENTOS

Ao Doutor Maílson Monteiro do Rego que permitiu o acesso à Biofábrica e se dispôs a me orientar, colaborando de maneira efetiva para que esse trabalho fosse realizado;

Ao Doutor José Antonio Alves Gomes, que abriu as portas do INPA/LTBM, onde pude conhecer o fascinante mundo da biologia molecular dos peixes amazônicos;

Às pesquisadoras do INPA/ LTBM, Kyara Formiga e Jaqueline Batista sem as quais esse trabalho não poderia ter sido realizado;

Ao Doutor Reinaldo Imbrozio Barbosa, pela paciência e bons conselhos ao longo dessa jornada;

Aos meus tutores Flávia Pinto e Ciro Campos de Souza, que contribuíram em muito nos momentos decisivos;

À Bióloga Tatiana Marão (não teria conseguido sem sua ajuda);

À Universidade Federal de Roraima, através da Coordenação do Programa de Pós-Graduação, em especial ao Prof. Dr. Marcos Vital; Prof^ª. Dr^a Gardênia Holanda e Dona Inácia;

Ao projeto PIRADA, que permitiu a realização das análises no LTBM e arcou com os custos laboratoriais desse trabalho.

À CAPES pelo apoio financeiro.

Agradecimentos especiais a todos os professores do PRONAT.

Ao pessoal do Laboratório Temático de Biologia Molecular do INPA-Manaus: Naiara Vogt (pode me ajudar a editar?), Rosa Jaqueline, Iamille, Giuliano Huergo (bem na hora!) e todos os que contribuíram de alguma forma ao longo dessa jornada;

Aos colegas dessa primeira turma de Mestrado, que como eu, superaram tantos obstáculos.

Aos amigos e colegas, cúmplices sem o qual esse trabalho não teria sido possível: Bruno Souza, Bianca Costa, Wagner Costa, Estela München (!?), Sebastião Nascimento, Washington (sua contribuição foi decisiva!!), Gleidi Bednarczuk, Orib Ziedson, Sabá Bonitão, Cica, Gustavo, Shirley, Rosa, Mary, Pat e à toda minha enorme família, referência de qualquer pessoa de bem.

Por três modos podem ser úteis os estabelecimentos que se fizerem no rio Branco. Pelas pescas que se fizerem, pelos gados que se introduzirem, pelos gêneros que se colherem do mato e se cultivarem nas terras que lhe forem próprias.

Alexandre Rodrigues Ferreira
Diário do rio Branco – 1786

RESUMO

A dourada (*Brachyplatystoma rousseauxii*) é um dos grandes bagres migradores mais explorados na região Amazônica. Cinco países exploram esse recurso, considerado por vários autores como um único estoque que migra sazonalmente por toda a bacia, utilizando áreas distintas para reprodução, alimentação e crescimento. Dados ecológicos ou genéticos sobre essa espécie em Roraima são desconhecidos. Sabe-se apenas que ela é amplamente explorada pela pesca, principalmente no período de cheia na bacia do rio Branco (maio a setembro), sendo desembarcadas aproximadamente 27 toneladas anualmente. Este estudo teve como objetivo estimar a variabilidade genética das douradas provenientes da bacia do rio Branco, e verificar a existência ou não de correlação genética entre essas e outras populações (ou subpopulações) estudadas ao longo da bacia Amazônica. Foram coletados 54 indivíduos junto a desembarques pesqueiros em Caracaraí, dos quais foi extraído o DNA total, e seqüenciada toda a região controle do DNA mitocondrial. A partir dessas seqüências, foram realizadas análises de polimorfismo de DNA, e análise de variância molecular (AMOVA). Foram identificados 44 haplótipos, sendo 43 *singletons*. As análises filogenéticas e populacionais demonstraram que ocorre alta variabilidade genética, não ocorrendo segregação genética entre as populações estudadas, indicando a formação de uma mesma população panmítica da espécie na bacia do rio Branco, que utiliza grande parte da região Amazônica para completar seu ciclo de vida, corroborando outros autores.

Palavras-chave:

Variabilidade genética, dourada, *Brachyplatystoma rousseauxii*, rio Branco, Roraima

ABSTRACT

Dourada is one of the largest catfishes exploited in the Amazon region. Five countries exploit this resource, which is considered, by several authors, as a unique population with seasonal migration, occurring in the whole basin, using distinct areas for reproduction, feeding and growth. Ecological or genetic data about this specie in Roraima are unknown. The specie is largely exploited by fishing, mostly in the wet season in the Rio Branco basin (May to September). Production in Roraima is about 27 tons annually. This study had as objective to estimate the genetic variability of the *douradas* (*Brachyplatystoma rousseauxii*) from the Rio Branco basin and verify the existence of genetic correlation between these and other populations (or sub-populations) studied in the Amazonian basin. For this study, 54 individuals of *dourada* was collected from Caracaráí fishermen, which was extracted the total DNA, and analyzed the nucleotide sequence of the mitochondrial DNA controlled region. These nucleotides sequences were used in analyses of polymorphism of DNA, phylogenetics and AMOVA. Forty-four haplotypes had been identified, being 43 singletons. The population and phylogenetics analyses demonstrated that there is not genetic segregation inside the analyzed individuals of *dourada*. Therefore, the study outcomes indicate that the *douradas* collected in the Rio Branco are from the same panmitic population that uses the whole Amazonian basin to complete its life cycle, corroborating other authors.

Key words:

Genetic variability, giant catfish, *Brachyplatystoma rousseauxii*, rio Branco, Roraima

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 1. Diferenças Básicas entre o DNA Nuclear e o DNA Mitocondrial..... | 22 |
| Tabela 2. Concentrações finais dos reagentes utilizados..... | 30 |
| Tabela 3. Resultados da análise de polimorfismo..... | 35 |
| Tabela 4. Estimativas dos valores das taxas de fluxo gênico, Nm , entre as populações do rio Anauá , baixo rio Branco, Belém, rio Madeira e Tabatinga..... | 36 |
| Tabela 5. Matriz de distância genética dos haplótipos..... | 39 |
| Tabela 6. Análise molecular de variância entre e dentro das populações..... | 43 |
| Tabela 7. AMOVA entre as populações da bacia do rio Branco e outras..... | 44 |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1. Barco de pesca típico utilizado pelos pescadores de Caracaraí/ baixo rio Branco... | 17 |
| Figura 2. A dourada (<i>Brachyplatystoma rousseauxii</i>) | 18 |
| Figura 3. Disposição e ciclo de vida da dourada na Amazônia..... | 19 |
| Figura 4. Genoma mitocondrial de peixes. | 22 |
| Figura 5. Estado de Roraima e seus limites..... | 25 |
| Figura 6. Roraima e sua caracterização fitofisionômica..... | 26 |
| Figura 7. Hidrografia de Roraima..... | 27 |
| Figura 8. Gel de agarose 0,8% demonstrando o DNA total de 15 indivíduos..... | 33 |
| Figura 9. Gel de agarose 1,0 % da amplificação da região controle..... | 33 |
| Figura 10. Composição percentual das bases nucleotídicas..... | 34 |
| Figura 11. Árvore de haplótipos das amostras populacionais..... | 38 |
| Figura 12. Índice de fixação (F_{ST}) encontrado nas populações estudadas..... | 43 |
| Figura 13. Comparação com outros índices de fixação (F_{ST})..... | 44 |

SUMÁRIO

| | |
|--|----|
| 1 INTRODUÇÃO..... | 12 |
| 1.1 Revisão bibliográfica..... | 14 |
| 1.2 A pesca na Amazônia..... | 14 |
| 1.3 A pesca em Roraima..... | 16 |
| 1.4 A dourada..... | 17 |
| 1.5 Importância comercial da dourada..... | 19 |
| 1.6 Utilização de Marcadores Moleculares..... | 20 |
| 1.7 O DNA..... | 20 |
| 1.8 A região controle ou alça D..... | 21 |
| 2 OBJETIVO GERAL..... | 24 |
| 2.1 Objetivos específicos..... | 24 |
| 3 MATERIAIS E MÉTODOS..... | 25 |
| 3.1 Área de estudo..... | 25 |
| 3.2 Coleta dos dados..... | 27 |
| 3.3 Maceração do tecido..... | 28 |
| 3.4 Digestão do tecido muscular..... | 28 |
| 3.5 Extração do DNA a partir do material digerido..... | 28 |
| 3.6 Amplificação in vitro do DNA mitocondrial..... | 29 |
| 3.7 Preparação e Sequenciamento da região controle..... | 30 |
| 3.8 Precipitação e eletroforese da Reação de Sequenciamento..... | 31 |
| 3.9 Edição e alinhamento de seqüências nucleotídicas..... | 31 |
| 3.10 Análises populacionais..... | 31 |
| 4 RESULTADOS E DISCUSSÕES..... | 33 |
| 4.1 Extração e Amplificação do DNA..... | 33 |
| 4.2 Alinhamento das seqüências da região controle..... | 33 |
| 4.3 Seqüências da região controle (DNA mt)..... | 33 |
| 4.3.1 Composição nucleotídica e Análise do número de substituições (mutações)..... | 33 |
| 4.4 Análise e distribuição dos Haplótipos..... | 34 |
| 4.5 Análises populacionais..... | 35 |
| 4.6 Análise da variabilidade genética intraespecífica entre e dentro das localidades analisadas na bacia do Rio Branco..... | 37 |
| 4.7 Comparação da variabilidade genética das douradas da bacia do rio Branco, rio Madeira e da calha do Solimões/Amazonas..... | 43 |
| 5 CONCLUSÕES..... | 45 |
| REFERÊNCIAS..... | 46 |
| ANEXOS..... | 54 |

1 INTRODUÇÃO

O peixe é um dos recursos naturais mais abundantes e utilizados na região Amazônica. Apesar da sua relevância, poucos são os dados disponíveis para quantificar seus estoques ou seus níveis de exploração. A maior parte dos estudos realizados refere-se às espécies importantes para a pesca comercial. Mesmo assim, pouco sabemos sobre os indivíduos que compõem essas populações, se pertencem a um único estoque pesqueiro ou a vários (BATISTA, 2001). O advento da biologia molecular tornou possível usar a informação contida no DNA para estudos filogenéticos, de fluxo gênico, de especiação e ainda para avaliar a estrutura genética de populações, conferindo um caráter técnico científico para propor meios de conservar ou manejar adequadamente diversos organismos.

A biologia molecular tornou-se uma ferramenta fundamental para estimar a variabilidade genética de uma população, permitindo também a delimitação de diferentes populações (ou estoques) contidas em uma espécie.

Referi-me a estoques ou a populações, mas várias outras denominações podem ser utilizadas. Beaumont; Hoare (2003) esclarecem como devemos nomear esses grupos geneticamente diferenciados: Variedades, raças, linhagens, populações e estoques, sendo esta última a mais freqüente, especialmente quando tem valor comercial. Desta forma, estoque ou população podem ser definidos como um grupo de peixes explorado ou que existe em uma área em particular, ou seja, um grupo intraespecífico de indivíduos que cruzam aleatoriamente com integridade espacial e temporal.

Um problema freqüentemente encontrado para a manutenção do estoque no manejo de pescarias é a identificação de grupos geneticamente homogêneos. Na maior bacia hidrográfica do mundo isso se torna um problema ainda mais comum porque espécies de água doce em geral estão divididas em vários estoques, que por sua vez estão isolados reprodutivamente em várias bacias (ALLENDORF et al., 1987).

Os Siluriformes, popularmente conhecidos como bagres, são muito importantes tanto para a pesca comercial como de subsistência, e vem sendo explorados há várias décadas (BARTHEM; GOULDING, 1997). De maneira geral, os grandes bagres, aí incluídos a dourada (*Brachyplatystoma rousseauxii*), o filhote/piraíba (*Brachyplatystoma filamentosum*) a piramutaba (*Brachyplatystoma vaillantii*) e outros pimelodídeos, perfazem cerca de 80% das exportações de pescado na Amazônia (BARTHEM; GOULDING, 1997). A dourada, em todos os locais onde existem estatísticas pesqueiras, está sempre entre os peixes mais cobiçados. De cada 100 bagres capturados na região Amazônica, 70 são dourada ou piramutaba (PROVÁRZEA, 2005).

Dados ecológicos ou genéticos sobre a dourada, relativos à bacia do rio Branco, simplesmente não existem. Barthem; Goulding (1997) descrevem a ocorrência de cardumes dessa espécie subindo o rio Branco, mas relatam não haverem observado desova nessas cabeceiras e salientam a necessidade de estudos que venham a esclarecer melhor por que essa espécie migra para a região, sugerindo inclusive que esses padrões poderiam ser comuns antes dos tributários andinos dominarem a ecologia dos rios da Amazônia.

Segundo um modelo proposto por Barthem; Goulding (1997) os jovens de dourada podem ser encontrados no estuário e os adultos maduros no alto Amazonas, no Brasil, Peru, Bolívia, Equador e Colômbia, o que indica uma migração que pode chegar a 5.500 km. A calha do rio Amazonas e seus principais tributários serviriam como via de dispersão natural das larvas para o estuário e seria também o ambiente onde os adultos encontram suas presas (RUFFINO, 2000). De maneira geral, muitas questões relacionadas à migração dos grandes bagres ainda são desconhecidas e os estudos sobre a dinâmica populacional são insuficientes para que possamos manejar adequadamente esse recurso.

Quando a pesca é realizada em uma área onde existem diversas populações, é essencial para o manejo pesqueiro que possamos identificar a contribuição de cada população na captura total. Isso permite que as agências que regulam a pesca na região possam atuar com maior precisão, evitando a sobreexploração, a perda da variabilidade genética intraespecífica, a redução da população ou até mesmo sua extinção. Estudos moleculares que se proponham a avaliar geneticamente os recursos pesqueiros podem auxiliar no entendimento da dinâmica das populações de peixes da Amazônia, e contribuir para o melhor conhecimento dos estoques, permitindo o manejo adequado e o uso sustentado destes recursos.

1.1 Revisão bibliográfica

Vários trabalhos já foram realizados no mundo e na Amazônia com a utilização de marcadores moleculares para caracterizar populações de peixes.

Brown et al. (1993) verificaram a ocorrência de duas populações distintas de *Acipenser transmontanus* nos rios Columbia e Fraser nos Estados Unidos. Sato et al. (2001) encontraram diferenças populacionais para *Oncorhynchus keta*, no Japão. Martins et al. (2003) estudaram a variação do DNA mitocondrial de *Leporinus elongatus* na bacia do rio Paraná. Gleeson et al. (1999) estudaram as relações filogenéticas e a estruturação geográfica de sete populações de *Neochanna diversus* (Galaxiidae) provenientes de duas localidades da Nova Zelândia, usando a região controle do DNAm, e sugerem mediante divergência e

diversidade genética que existem duas espécies crípticas dessa espécie de peixe em uma das duas localidades.

Em relação à ictiofauna neotropical, uma publicação pioneira que utilizou metodologias moleculares foi a de Alves-Gomes et al. (1995) que objetivando entender a evolução dos órgãos sensoriais e eletrogênicos de Gymnotiformes, utilizou seqüências dos genes mitocondriais 16S e 12S, analisados pelos métodos de máxima parcimônia, máxima verossimilhança e evolução mínima para elaborar uma filogenia para a ordem, chegando inclusive a propor uma nova família: Eigenmaniidae.

Cerca de três anos após os estudos de Alves-Gomes surge a iniciativa da utilização de marcadores moleculares de DNA aplicados para o entendimento da distribuição geográfica e diversidade de peixes neotropicais de água doce. Dergam et al. (1998) utilizaram os padrões de diversidade genômica baseados em marcadores RAPD (*Random Amplified Polymorphism DNA*) como forma de avaliar a diferenciação genética de *Hoplias malabaricus* (traíras) oriundas dos rios Iguazu e Tibagi, que são bacias geograficamente vizinhas. Os autores sugeriram uma forte estruturação populacional dessa espécie nos dois rios e ainda a ocorrência de unidades biológicas novas, ainda não descritas.

Se nos referirmos ao Estado de Roraima, não existem trabalhos que se utilizem dessas metodologias para avaliar as populações de peixes presentes na bacia do rio Branco ou a qualquer representante da fauna. Com relação à questão ecológica, os estudos sobre a fauna de peixes são escassos e de pouca abrangência. Ferreira et al. (1988) em um trabalho feito no médio rio Mucajaí, região do Paredão, em 1986/87, determinaram a ocorrência de 126 espécies de peixes pertencentes a 28 famílias. Chao et al. (2001), realizou um trabalho no baixo rio Branco, mas limitou-se apenas aos peixes ornamentais, tendo encontrado 91 espécies. Alves-Gomes (1997) ao trabalhar também em Roraima, com a ordem Gymnotiformes, concluiu ser uma importante área de estudos para um melhor conhecimento não só da Ordem, mas da ictiofauna de toda a América do Sul. O autor destaca ainda a carência de estudos sobre os ambientes aquáticos da região.

Estudos especificamente sobre bagres ainda não foram realizados, apesar da importância que essa ordem tem na pesca artesanal e de subsistência praticada em toda a bacia do rio Branco (SEBRAE, 2002).

1.2 A pesca na Amazônia

Até aproximadamente 1960, a pesca na Amazônia era realizada por uma frota formada por embarcações pequenas, exclusivamente de madeira, e com propulsão a remo ou

vela. A liberação de incentivos fiscais para a região e a abertura da economia para as grandes empresas de outras regiões do Brasil trouxe um rápido desenvolvimento tecnológico da pesca. As embarcações ganharam então motores e artes de pesca mais resistentes (redes de náilon) e eficientes na captura das espécies de peixes e crustáceos (RUFFINO, 2000).

Mesmo assim, a pesca na região é considerada de pequeno porte, pois apenas o Estado do Pará possui uma atividade pesqueira de porte industrial. Essa frota concentra-se na captura de uma única espécie de peixe, a piramutaba (*Brachyplatystoma vaillantii*). Todo o restante da Amazônia utiliza embarcações consideradas pequenas e de caráter artesanal (BARTHEM; GOULDING, 1997). A piramutaba chegou a tornar-se a principal espécie de exportação da Amazônia, sendo o Pará o grande exportador. A produção nesse estado chegou a atingir 28.000 ton. no ano de 1977. Em 1986, gerou mais de 12 milhões de dólares, sendo nesse ano, o 3º principal pescado exportado pelo Brasil (CACEX, 1980). Atualmente a sua pesca já não possui o mesmo vigor, gerando cerca de 2 milhões de dólares por ano. A principal frota de captura continua sendo utilizada em busca desse peixe, mas tem sido utilizada também para capturar outros grandes bagres, entre eles, a dourada.

Na pesca de águas interiores existem unicamente embarcações artesanais, de madeira, que podem ser divididas em dois tipos: canoas e barcos geleiros. As canoas não possuem casaria, nem porão para guardar gelo ou pescado, e quando motorizadas podem alcançar até 10 metros de comprimento e transportar 500 kg de peixe. Os barcos geleiros podem ser classificados por sua modalidade de atuação, sendo a maioria utilizado como barco-mãe. Na maior parte dos casos a captura é realizada por pequenas canoas, que transportam o pescador até o local de pescaria, sendo o barco-mãe o depósito da produção, que é conservada em gelo (RUFFINO, 2000).

Além da importância econômica, o pescado é também a principal fonte protéica na alimentação das populações ribeirinhas na Amazônia, sendo o consumo estimado em 369 g/dia ou 134 kg/ano. Estes são os maiores valores de consumo de pescado no mundo (RUFFINO, 2000).

Dados do IBAMA (2004) apontam a região norte como a maior produtora de pescado extraído de ambientes naturais do Brasil, produzindo 140.962,5 t/ano, de um total produzido no país de 246.100,5 t. A região apresentou um crescimento de 5,7%, em 2004, se comparado ao ano de 2003. A produção total na Amazônia é estimada em 252.361 t/ano. Ressalta-se que esses dados incluem a pesca extrativa de água doce, marinha (Pará e Amapá) e a aquicultura. Considerando apenas a pesca extrativa de água doce, destacam-se os Estado do Pará (62.542,5 t) e Amazonas (59.695,5 t) como os maiores produtores.

1.3 A pesca em Roraima

Poucos são os dados disponíveis sobre a pesca em Roraima. A produção da pesca artesanal está voltada exclusivamente para o mercado interno, mas em virtude das condições naturais e técnicas utilizadas, entre outros motivos, a atividade não supre a demanda local tornando-se necessário importar pescado, principalmente *in natura* do Estado do Amazonas. De maneira geral, a frota pesqueira local é composta por embarcações de pequena autonomia, sendo o material utilizado para a construção dos barcos a madeira. A maior parte das embarcações tem um comprimento que varia entre 6 e 8 metros (figura 1). O número total de embarcações cadastradas é de 631, sendo os municípios de Rorainópolis (195 embarcações) e Caracarái (188 embarcações) os que possuem a maior frota pesqueira. Por se tratarem, de embarcações de pequeno porte, movidas em sua maioria por motores à combustão (79,84%) a tripulação embarcada é geralmente composta de apenas 2 tripulantes (71,95%) (IBAMA-RR, dados não publicados). Segundo a Secretaria Especial de Aquicultura e Pesca- SEAP (dados não publicados), cerca de 2.600 pescadores profissionais estão cadastrados no Estado.

Poucas espécies são exploradas comercialmente. Segundo Mello-Coutinho (1998) apenas cerca de duas dezenas, sendo as mais importantes a matrinxã (*Brycon spp*), a dourada (*Brachyplatystoma rousseauxii*), o filhote/piraíba (*Brachyplatystoma filamentosum*), o aracu (*Leporinus sp.*, *Schizodon sp.*), o surubim (*Pseudoplatystoma fasciatum*) o pacu (*Myleus sp*, *Mylossoma sp.*), o jaraqui (*Semaprochilodus sp.*) e o tambaqui (*Colossoma macropomum*), sendo este último, proveniente de pisciculturas instaladas no Estado.

Dados do SEBRAE (2002) apontam para um consumo anual de pescado em torno de 2.300 ton/ano para o município de Boa Vista, sendo 1.120 toneladas provenientes de criações em cativeiro, 880 toneladas importadas de outros estados e 300 toneladas capturadas dos estoques pesqueiros naturais. Isto perfaz uma média “per capita” de consumo da ordem de 7,7 kg/ano considerando-se o Censo Populacional de 2000 para o Município de Boa Vista, consumo que é muito menor do que a média da região Amazônica, com 44 kg anuais.

Outros dados são apresentados no anuário estatístico da pesca (IBAMA, 2004), e informam que a produção pesqueira em Roraima alcançou 2.129,5 toneladas em 2004, sendo 419,5 toneladas provenientes dos estoques pesqueiros naturais. Embora, segundo esses dados, 1.710 toneladas sejam provenientes da aquicultura, é provável que parte desse pescado seja importado de outros estados, levando em conta que a importação de peixes do Estado do Amazonas é uma prática comum no mercado local.

Se nos referirmos especificamente à dourada, foram capturadas e comercializadas em Roraima, no ano de 2003, 22 toneladas, passando a 27 toneladas no ano seguinte, o que

representa um incremento na captura, de 22,72 % (IBAMA, 2004). A pesca da dourada é realizada no período da cheia do rio Branco (maio a setembro) quando, segundo o conhecimento empírico dos pescadores da região, esse pimelodídeo migra para a bacia.



Figura 1. Barco de pesca típico utilizado pelos pescadores de Caracará/ baixo rio Branco. Foto: Fernando Mendonça

1.4 A dourada

Peixe da ordem Siluriformes, família Pimelodidae, a dourada, ou dourado, como é mais conhecido em Roraima (figura 2) é um grande bagre (> 50 cm) que habita os canais dos principais rios da bacia amazônica. Tem ampla distribuição na Amazônia, ocorrendo inclusive na bacia do rio Orinoco (BARTHEM; GOULDING, 1997). Sua estratégia de vida a coloca no grupo de estratégia em equilíbrio (k-estrategistas) por apresentar (i) altos valores de tamanho e idade média de maturação gonadal (ii) taxa de crescimento baixa (iii) alta sobrevivência de adultos e (iv) mortalidade natural baixa. Apesar dessa classificação, esses peixes também podem ser vistos como R-estrategistas, pois (i) sua época de reprodução é cíclica, dura de dois a três meses durante a cheia de cada ano, (ii) sua fecundidade é alta e seus ovos pequenos e

sem proteção parental, (iii) os ambientes utilizados pela espécie variam sazonalmente e (iv) seus mecanismos de dispersão e migração são amplos (ALONSO, 2002).

Na Amazônia central esse peixe é considerado o maior predador nos períodos de seca e enchente. Possui grande porte, sendo o maior tamanho conhecido 192 cm. Suas principais características morfológicas são: a cabeça prateada e achatada, corpo dourado e presença de barbilhões maxilares curtos. Diferencia-se das demais espécies do Gênero *Brachyplatystoma* não só pela cor, mas também pelo tamanho dos barbilhões e pela mandíbula e maxila do mesmo tamanho (FERREIRA et al., 1998).

Descrita em 1855 por Castelnau, e revisada taxonomicamente por Lundberg; Littman (2003), a dourada teve o seu nome específico mudado de *Brachyplatystoma flavicans* para *Brachyplatystoma rousseauxii*.



Figura 2. A dourada (*Brachyplatystoma rousseauxii*)

Foto: Batista, 2003.

A distribuição desse Pimelodídeo na Amazônia é ampla. Podem ser encontrados desde as águas de baixa salinidade da foz Amazônica, até as cabeceiras dos tributários de águas brancas (BARTHEM; GOULDING, 1997; FABRÉ et al., 2000; GOULDING et al., 2003). É encontrada também em tributários do rio Negro, Rio Tocantins e na Bacia do Orinoco (LEITE, 1993; GARCIA, 1995).

É um peixe migrador (figura 3), que parece desenvolver-se em três regiões distintas: as cabeceiras- locais de reprodução, o médio amazonas e seus afluentes- onde se desenvolve e alimenta-se, e o estuário- área de criação (BARTHEM; GOULDING, 1997). Seus habitats preferidos são os canais dos rios, incluindo tributários de água branca, preta e clara do rio Amazonas. Embora seja um bagre de grande porte, e viva próximo à superfície, ou meia água, pescadores relatam dificuldades para perceber os cardumes quando em migração, sendo o único recurso, observá-los nos raros momentos em que vem à tona (BARTHEM; GOULDING, 1997).

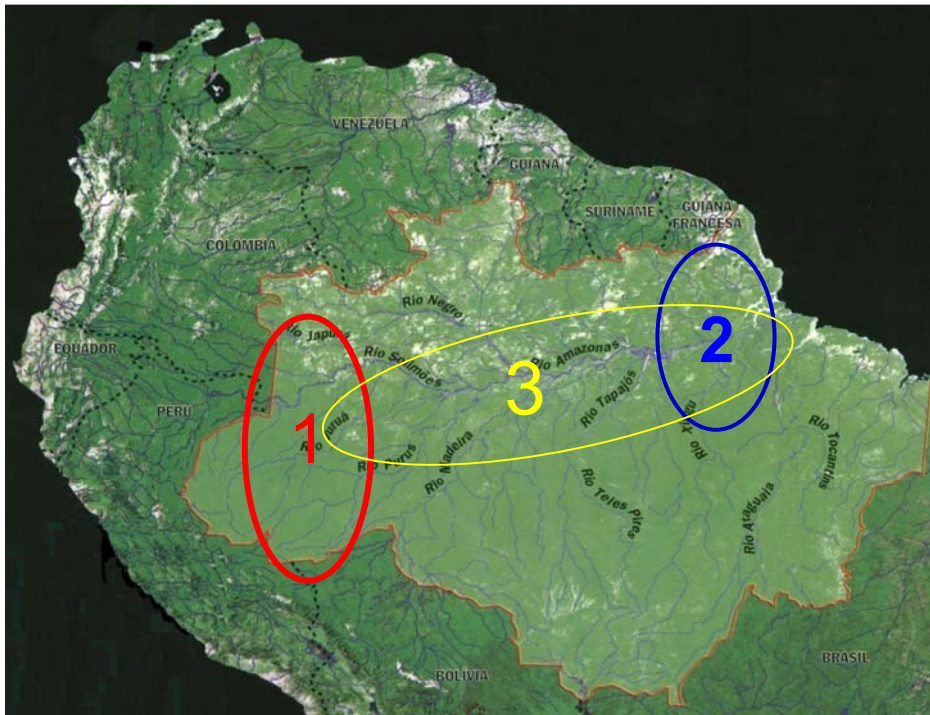


Figura 3: Disposição e ciclo de vida da dourada na Amazônia (1: área de reprodução, 2: criação e 3: alimentação e crescimento) segundo Barthem; Goulding, 1997.

1.5 Importância comercial da dourada

A dourada é uma das espécies mais importantes para a pesca comercial e artesanal na Amazônia, sendo capturada em seis países: Brasil, Bolívia, Colômbia, Peru, Venezuela e Equador. Esta espécie é avidamente explorada ao longo de toda a calha do Solimões/Amazonas e de seus maiores tributários (BARTHEM; GOULDING, 1997).

O mercado de exportação desse peixe teve início nos anos 70, com a conexão rodoviária ligando a Amazônia ao sul/sudeste, o que permitiu o transporte do peixe congelado para São Paulo e outros estados.

Em 2004 foram desembarcadas no Brasil, 20.057 toneladas de dourada, exclusivamente capturada pela frota pesqueira dos estados que compõem a Amazônia legal (IBAMA, 2004), destacando-se o Estado do Pará, com 15.425,5 toneladas desembarcadas.

Na Amazônia central, o consumo de bagres representa um tabu alimentar. Não se sabe ao certo, mas acredita-se que isso se deva à crença de que o consumo desses bagres causa ou agrava várias doenças, embora não se tenham evidências científicas sobre isso (ZUANON, 1990). A situação em Belém é bastante distinta, pois os bagres, e especificamente

as douradas e Piramutabas, tem excelente aceitação no mercado representando cerca de 25% do total comercializado para consumo local (BARTHEM; GOULDING, 1997; BARTHEM, 2004).

Em Roraima, dados do SEBRAE-RR (1996) relatam pescarias realizadas no baixo Rio Branco, no período da cheia, em que a dourada representou 45% da produção total, sem apresentar dados mais consistentes. Considerado peixe nobre pelos consumidores, a espécie tem ampla aceitação no mercado local, sendo comercializada *in natura* ou filetada (SEBRAE, 1996).

1.6 Utilização de Marcadores Moleculares

A descoberta do DNA como fonte de informações genéticas levou a um incrível avanço no conhecimento sobre a biologia no nível molecular. Novas técnicas como o PCR e o seqüenciamento do DNA possibilitaram o uso das informações genéticas nos estudos evolutivos e populacionais que vão desde as questões de filogenia até a filogeografia de todos os táxons.

As metodologias que utilizam o DNA são muito eficazes para a reconstrução filogenética e outras abordagens evolutivas de populações e espécies (AVISE, 1994). Em relação aos peixes, marcadores moleculares vêm sendo utilizados para estudar as variações genéticas dentro e entre populações, ou as relações filogenéticas entre espécies, famílias e ordens. O declínio do pescado em várias regiões do mundo vem criando interesse em ferramentas genéticas que permitam um melhor gerenciamento dos estoques de peixes (GAULDIE, 1991).

1.7 O DNA

Por ser a molécula da hereditariedade, o DNA, ou ácido desoxirribonucléico, ocupa lugar de destaque entre as macromoléculas biológicas utilizadas na busca pela compreensão da história evolutiva de populações e espécies. O conhecimento da filogenia e da biogeografia dos organismos permite um melhor gerenciamento dos estoques e subsidia ações de conservação que podem garantir o uso futuro de inúmeros organismos.

As mitocôndrias estão presentes em quase todas as células eucariontes e contém seu próprio DNA e RNA sintetizando algumas das suas próprias proteínas (ALBERTS et al., 1999).

Diferente do DNA nuclear que forma longas fitas, constituídas cada uma por dupla hélice e que codificam aproximadamente 100.000 genes, o DNA mitocondrial (DNAMt) representa de 1 a 2% do DNA celular, e tem uma conformação em duplo filamento circular, codificando 37 genes (tabela 1).

Seu genoma é constituído por moléculas circulares de DNA que estão presentes em cópias múltiplas por organela, numa organização simples e com tamanho variado entre as diferentes espécies. Em média, os genes dessa molécula apresentam tamanho inferior a dois Kb (AVISE 1984).

O DNA mitocondrial está exposto às reações metabólicas da cadeia respiratória, onde ocorre um alto fluxo de radicais de oxigênio com efeito mutagênico, além de não possuir mecanismos de reparo e realizar maior número de replicações, se comparado ao DNA nuclear. Tais características resultam em uma taxa de mutação cerca de 5 a 10 vezes maior do que as taxas apresentadas pelo DNA nuclear (MEYER, 1993).

As mutações que ocorrem no DNAMt são em sua maioria de transmissão materna, já que quase todas as mitocôndrias de ovos fertilizados são provenientes do ovócito e não do espermatozóide (COOPER, 2001).

Estas altas taxas de mutação permitem que o DNAMt seja utilizado para inferir as relações filogenéticas entre populações e espécies cujo tempo de divergência seja relativamente recente, entre milhares e alguns milhões de anos (BROWN et al, 1979).

Geneticamente, o DNA mitocondrial é mais eficiente que o DNA nuclear devido a algumas características tais como não possuir íntrons, raramente conter seqüências duplicadas e por possuírem geralmente menos de 10 pares de bases (pb) separando seus genes (WOLTENHOLME; CLARY, 1985).

O DNA mitocondrial nos peixes é constituído por 13 genes codificadores de proteínas (7 subunidades NADH desidrogenase, 3 subunidades de Citocromo C oxidase, 2 subunidades de ATP sintetase e o Citocromo *b*), 22 de RNA transportadores (tRNA) e 2 de RNA ribossômicos (12 S e 16 S) totalizando 37 genes. Existe ainda uma região não codificadora denominada região controle (figura 4) ou alça D (D-Loop ou Displacement loop structure) que contém os sítios de iniciação para replicação do DNAMt e transcrição do RNA (MEYER, 1993).

1.8 A região controle ou alça D

A região controle é responsável pela regulação da replicação e da transcrição de todo o DNAMt. A replicação tem início nesta região e é realizada por deslocamento de uma fita em relação à outra, formando uma alça, denominada *D-Loop* (BROWN et al., 1986).

Tabela 1. Diferenças Básicas entre o DNA Nuclear e o DNA Mitocondrial

| Parâmetro | DNA nuclear | DNA mitocondrial |
|---------------------------------|---|---|
| Localização | No núcleo da célula, protegido pela membrana nuclear. | Nas mitocôndrias, protegidas pela membrana mitocondrial – influência de radicais livres |
| Conformação | Dupla hélice | Dupla fita circular |
| Mecanismo de proteção | Protegido por histonas | Desprovido de histonas |
| Número de genes | 100.000 | 37 |
| Funcionamento | Autônomo | Necessita da cooperação do DNA nuclear |
| Composição | Regiões codificantes (éxons) e não codificantes (íntrons) | 90% DNA codificante |
| Característica do genoma | Genoma diploide (materno/paterno) – sofre recombinação | Genoma haplóide (herança materna) – não sofre recombinação |
| Número de pares de bases | Bilhões de pares de bases | Cerca de 16.000 pares de bases |
| Atividade da polimerase | Grande | Pequena |
| Sistema de reparo | Presente | Ausente |
| Taxa de evolução | Pequena | 5 a 10 x maior que a nuclear |

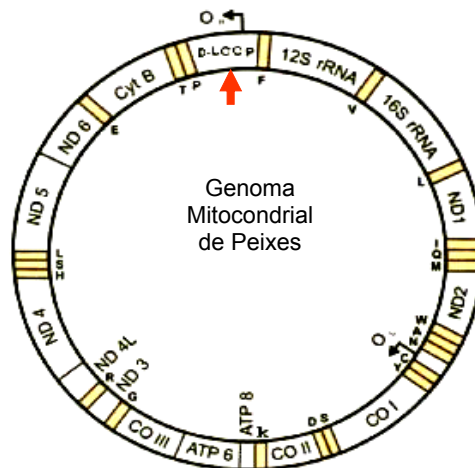


Figura 4 – Genoma mitocondrial de peixes. A seta vermelha indica a região controle (D-Loop), os demais são os genes codificadores de proteínas (Fonte: Modificado de Meyer, 1993).

Por causa da elevada variabilidade a região controle tem sido utilizada para análises de estrutura populacional de espécies de peixes intimamente relacionados (MEYER et al., 1990; SANTOS, 2004). Tzeng et al.(1992) verificaram que a região controle e os espaços entre os genes mitocondriais eram as únicas regiões que apresentavam variações nucleotídicas no nível intraespecífico, a partir do conhecimento prévio do genoma mitocondrial de peixes como *Petromyzon marinus* e *Squalus acanthias*.

Porto (1999) utilizando alguns genes mitocondriais, o segmento gênico D-Loop e dados cariotípicos, caracterizou geneticamente três populações de pacu (*Mylesinus paraschomburgkii*) provenientes de três regiões distintas: Uatumã, Trombetas e Jarí. Encontrou uma divergência populacional de 5,2 % na região controle, o maior dos índices das regiões gênicas estudadas.

Sivasundar et al. (2001) também utilizaram a região controle do DNAm para caracterizar a estrutura populacional de 26 espécimens de *Prochilodus lineatus* de 12 localidades no sistema Paraná-Paraguai-Uruguaí. Seus resultados mostraram que todos os indivíduos seqüenciados tiveram haplótipos únicos, com divergência nas seqüências variando de 0.3 a 3.6%, o que indicou a ocorrência de fluxo gênico entre as populações mesmo com corredeiras e cachoeiras se interpondo entre os grupos, demonstrando que estas não representavam barreiras naturais eficazes.

Batista (2001) verificou a partir da análise da região controle, o grau de variabilidade genética entre 45 indivíduos de dourada, amostrados em 03 localidades na calha principal do rio Solimões/Amazonas (Belém, Manaus e Tabatinga) avaliando também a correlação dessa variabilidade com a distribuição geográfica. A autora corrobora a hipótese proposta por Barthem; Goulding (1997) de um único estoque pesqueiro para a dourada no sistema Estuário/Amazonas/Solimões, porém sugere que esta espécie possa formar sub-populações nos afluentes. Seus resultados serão discutidos posteriormente.

Formiga-Aquino (2003) estudou a variabilidade genética da piramutaba (*Brachyplatystoma vaillantii*) também utilizando a região controle do DNAm, amostrando 5 localidades (Belém, Santarém, Manaus, Tefé e Tabatinga). Seus resultados demonstraram que não há estrutura de população entre os indivíduos de piramutaba, não existindo correlação entre distância genética e geográfica nos indivíduos das localidades amostradas.

Fica demonstrada a importância e confiabilidade exhaustivamente testada de amostragens baseadas no DNA mt e na região controle (D-Loop). Essa ferramenta pode nos auxiliar a melhor conhecer a distribuição e estrutura populacional de dourada na bacia do Rio Branco, possibilitando um manejo mais adequado, além de medidas mais eficazes de conservação.

2 OBJETIVO GERAL

Este trabalho tem por objetivo estimar a variabilidade genética da dourada (*Brachyplatystoma rousseauxii*) utilizando a seqüência nucleotídica da região controle do DNA mitocondrial de indivíduos provenientes da bacia do rio Branco.

2.1 Objetivos específicos

- ✓ Determinar a seqüência nucleotídica da região controle do DNA mitocondrial dos indivíduos de dourada;
- ✓ Determinar os haplótipos dos indivíduos coletados em duas localidades: o baixo rio Branco e o rio Anauá;
- ✓ Estimar a variabilidade genética entre e dentro das localidades amostradas na bacia do rio Branco;
- ✓ Comparar a variabilidade genética e verificar se há estrutura genética nas amostras coletadas;
- ✓ Comparar os dados da variabilidade genética entre os indivíduos de dourada coletados na bacia do rio Branco com indivíduos de outras localidades.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Área de estudo

O Estado de Roraima localiza-se no extremo norte do país. Politicamente, faz fronteira com dois países, a República Bolivariana da Venezuela e a República Cooperativista da Guiana (ex-Guiana Inglesa). Em relação às fronteiras nacionais, limita-se com os Estados do Amazonas e Pará (figura 5).



Figura 5. Estado de Roraima, seus limites e sua inserção na América do Sul e na Amazônia.

Antigo Território Federal, o Estado de Roraima foi criado pela Constituição Federal de 1988, com uma área física de 225.116 km² estabelecida no extremo norte da Amazônia brasileira, aproximadamente entre 5° 16' N e 1° 25' S e 58° 55' W e 64° 48' W (BARBOSA et al., 2005). Todo o estado ocupa cerca de 2,6 % do território brasileiro e 4,5 % da Amazônia Legal. Caracteriza-se pela ocorrência de uma imensa variedade de habitats: Montanhas ao norte e oeste, as serras Parima e Pacaraima, onde estão as nascentes dos principais rios que formam a bacia do rio Branco, uma região de florestas tipicamente amazônicas ao sul e uma

região de savanas (regionalmente conhecidas por Lavrado) à nordeste, que correspondem à cerca de 16% da área do estado e ainda uma região de campina/ campinarana no centro sul (figura 6).



Figura 6. O Estado de Roraima e sua caracterização fitofisionômica: em verde, Florestas; em magenta, o Lavrado (savana); em escuro, as Campinas e Campinaranas. Nota-se o rio Branco no sentido nordeste-sudoeste.

Fonte: Landsat TM, CENAGRO, 1988

O rio Branco tem uma extensão de 584 km e flui no sentido nordeste - sudoeste, sendo o maior tributário do rio Negro. Recebe esse nome a partir da confluência de dois rios: Tacutu e Uraricoera. Sua bacia domina quase toda a área de Roraima (figura 7), e grande parte do seu curso se dá através do escudo das Guianas. Apenas três rios não fazem parte dessa bacia, sendo tributários do Negro: o Jatapu, o Jauaperi e o Jufari, no extremo sul do estado. Seus principais tributários, da nascente para a foz, são os rios Cauamé, Mucajaí, Quitauaú, Ajarani, Anauá, Água Boa do Univini, Catrimani, Itapará e Xeriuni (LEMOS et al., 2003).

O Branco está dividido em três seções: o alto rio Branco, a partir da confluência dos rios Uraricoera e Tacutu até as corredeiras do bem-querer, com 172 Km, o médio rio Branco, das corredeiras do bem-querer até Vista Alegre, logo abaixo da cidade de Caracarái, com cerca de 24 Km, e o baixo rio Branco, da Vista Alegre até sua foz no rio Negro, com aproximadamente 388 Km (FREITAS, 1996). O baixo rio Branco é a parte do rio mais

utilizada na pesca profissional, e segundo muitos pescadores locais, a mais abundante em peixes.



Figura 7. Hidrografia de Roraima, demonstrando as principais bacias. Em vermelho, a BR 174, principal eixo rodoviário do estado.

3.2 Coleta dos dados

Foram coletadas 54 amostras de tecido muscular de douradas (*Brachyplatystoma rousseauxii*) capturadas na bacia do rio Branco, sendo 16 amostras provenientes do rio Anauá e 38 amostras provenientes do baixo rio Branco. Após acerto prévio para saber o local de pesca para o qual os barcos haviam se deslocado e sua data de chegada, me dirigi ao porto localizado no município de Caracaraí. As amostras foram então coletadas diretamente no desembarque, logo após a chegada do barco pesqueiro. Após identificação prévia da espécie, coletamos cerca de 1 cm³ (2g) do tecido muscular de cada exemplar, que foi retirado com o uso de material cirúrgico esterilizado, e em seguida preservado em álcool etílico 70%. Informações sobre cada um dos exemplares foram anotadas em uma ficha de campo com os

seguintes dados: nome popular, nome científico, data, local da pesca, local de coleta e comprimento furcal.

Em seguida o material coletado foi levado ao Laboratório Temático de Biologia Molecular (LTBM) do INPA, em Manaus, onde foram realizadas todas as etapas laboratoriais necessárias.

3.3 Maceração do tecido

O DNA total (DNA nuclear + DNA mitocondrial) foi extraído segundo o método descrito em Alves-Gomes (1995) com modificações de Batista (2001). Inicia-se o processo macerando aproximadamente 200 mg do tecido muscular. Depois de macerado, o produto é levado a um tubo Eppendorf de 1,5 ml para ser submetido à digestão.

3.4 Digestão do tecido muscular

Adicionou-se ao Eppendorf, tampão de extração à base de cloreto de sódio, Tris, Hcl, EDTA, Proteinase K e DTT (Ditiotreitol). Em seguida a amostra foi levada ao banho-maria, a uma temperatura de 37°C durante 12 horas, dando início ao processo de digestão. O material digerido é então purificado com sucessivas lavagens com fenol/clorofórmio/álcool isoamílico, em seguida precipitado em etanol 100% e ressuspenso em água. Este processo permite a digestão, que rompe as membranas e degrada lipídeos, proteínas e outras macromoléculas.

3.5 Extração do DNA a partir do material digerido

Após o processo de digestão o Eppendorf é centrifugado durante 5 minutos sendo o sobrenadante transferido para um novo tubo, onde adicionamos 180 µl de uma solução de NaCl, para precipitar as substâncias orgânicas, exceto o DNA. Centrifugamos novamente por 5 minutos e transferimos o sobrenadante para um novo tubo. Precipitamos o DNA com 420 µl de álcool isopropanol 100%, e visualizamos uma “nuvem” que supõe-se, é o DNA. Centrifugamos novamente até que um *pellet* fosse formado, para em seguida lavarmos com 250 µl de álcool 70%. Centrifugamos mais 1 minuto, descartamos o álcool e levamos à estufa para secagem. Após secar, ressuspendemos as amostras em água Milli-Q.

Em seguida analisamos a concentração de DNA, por intermédio de comparações com marcadores moleculares de concentração conhecida (DNA lambda não digerido), em eletroforese de gel de agarose a 1%. O gel foi então colocado em uma cuba eletroforética sob uma voltagem de 70 volts e corrente de 30 miliampéres por cerca de 40 minutos. Após a corrida o gel foi corado em uma solução de Brometo de etídeo, colocado em um transiluminador e fotografado em sistema de foto documentação *Eagle eye*. Uma vez extraído o DNA de cada espécime, este foi armazenado em tubos Eppendorf, rotulado e mantido em freezer a -20° para uso posterior.

3.6 Amplificação *in vitro* do DNA mitocondrial

A técnica conhecida por PCR (*Polimerase Chain Reaction*) consiste na amplificação de milhares de cópias do fragmento estudado, nesse caso, a região controle do DNA mitocondrial, que se dá com a utilização de *primers* (iniciadores) específicos.

PCR é uma sigla oriunda do inglês para reação em cadeia da polimerase que ocorre quando uma enzima especializada em copiar DNA é colocada sob condições ideais para realizar tal reação. Essa técnica foi descrita pelo cientista norte-americano Kary Mullis, em 1993. O princípio se baseia na amplificação de um segmento de DNA, com o início da síntese começando em duas diferentes posições na molécula. A reação em cadeia tem como principal agente a enzima termosensível DNA taq polimerase, que une nucleotídeos dispersos na reação para montar uma molécula, usando um DNA molde (DNA *template*).

Os *primers* (iniciadores) utilizados nessa etapa do trabalho foram desenhados por SIVASUNDAR et al. (2001) e tem as seguintes seqüências:

F-TTF 5' GCCTAAGAGCATCGGTCTTGTA-3' (que se anela à fita leve)

F-12R 5' GTCAGGACCATGCCTTTGTG- 3' (que se anela à fita pesada)

Estes *primers* anelam-se na seqüência adjacente à região controle e amplificam até cerca de 1000 pb presentes em um molde da região controle (DNAm_t).

A reação foi realizada em tubos Eppendorf de 0,2 ml (tabela 2). Os tubos foram colocados em um termociclador programado para 30 ciclos de um minuto a uma temperatura de 94° C para desnaturação das fitas de DNA. Um minuto a 53° C para anelamento dos *primers* e um minuto e meio a 72° C para extensão dos segmentos amplificados do DNA.

Tabela 2. Concentrações finais dos reagentes utilizados para amplificação da região controle do DNA mitocondrial dos espécimens de dourada.

| Reagentes | Concentração final |
|-----------------------|---------------------|
| Cloreto de Magnésio | 2mM |
| Tampão | 1X |
| dNTP | [0,2 mM] |
| F-TTF | [0,2mM] |
| F-12R | [0,2mM] |
| Taq DNA polimerase | [0,03 U/ μ l] |
| DNA total do espécime | [0,4-4 ng/ μ l] |

Fonte: Batista (2001)

Posteriormente o produto de PCR foi verificado em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo e fotodocumentado. Os produtos de PCR positivos foram, em seguida, purificados com colunas, utilizando o Kit de Purificação *GFX* (Ge HeathCare) seguindo a recomendação do fabricante.

3.7 Sequenciamento nucleotídico da região controle (DNAMt)

A reação de seqüenciamento foi realizada também por intermédio da técnica de PCR, sendo que para um volume final de 10 μ l, foram utilizados os seguintes reagentes:

- ✓ 4 μ l de *Dyynamic dye terminator* (Ge HeathCare)
- ✓ *Primer* F ou R a [0,4 μ M]
- ✓ 120 ng de DNA purificado
- ✓ Água Milli-Q autoclavada

Esse processo foi realizado em placas para seqüenciamento, contendo 96 *wells* (poços). As placas foram levadas ao termociclador por 30 ciclos com um perfil de 20 segundos a 95°C para desnaturar as fitas complementares, 15 segundos a 50 °C para o pareamento do *primer* e 1 minuto e 20 segundos para extensão da região a ser seqüenciada.

3.8 Precipitação e eletroforese da reação de seqüenciamento

O processo de precipitação tem a finalidade de eliminar reagentes não incorporados na reação. Cada produto da reação foi precipitado com 1 µl de Acetato de amônio a 7,5 M e 27,5 µl de etanol 100%. Segue-se a incubação à temperatura ambiente por 10 minutos. Centrifugou-se por 45 minutos a 4.000 rpm, descartou-se o sobrenadante por inversão e lavou-se o “pellet” com 120 µl de etanol 70%. Centrifugou-se novamente por 10 minutos a 4.000 rpm, descartou-se o sobrenadante por inversão e em seguida foi deixado para secar em temperatura ambiente. Ressuspendeu-se a amostra em Formamida (agente desnaturante do DNA).

A reação nucleotídica final foi então eletroinjetada no seqüenciador automático MegaBace 1000, no Laboratório Temático de Biologia Molecular - LTBM/INPA-Manaus.

3.9 Edição e alinhamento de seqüências nucleotídicas

Cada amostra de DNA foi seqüenciada em duas etapas, uma com o *primer F (forward)* e outra com o *primer R (reverse)*. Em cada uma dessas etapas se obteve aproximadamente 1.000 pares de bases sendo utilizadas no alinhamento cerca de 600 pares de bases. Compilação, conferência e edição foram realizadas com o auxílio dos programas BIOEDIT 7.0.5 (Hall, 1999) e Chromas 2.23. Originou-se então uma matriz de dados com 54 indivíduos de *Brachyplatystoma rousseauxii* provenientes da bacia do rio Branco.

3.10 Análises populacionais

As análises que estimam o índice de polimorfismo de DNA foram realizadas com o uso dos programas ARLEQUIN 3.01 (SCHNEIDER et al., 2005) e DNA sp 4.0 (Rozas; Rozas, 1999). Entre os parâmetros utilizados estão o número de haplótipos na população (H), o número de haplótipos únicos ou *Singletons* (HU), a quantidade de pares de bases (pb), os sítios polimórficos (S), o número total de mutações (ETA), a diversidade haplotípica, que é a probabilidade de cada duas seqüências serem distintas (HD), a diversidade nucleotídica, que nos indica a quantidade média de diferenças nucleotídicas por sítio (*Pi*) e a média das diferenças nucleotídicas entre pares de indivíduos (K).

Buscando verificar a ocorrência de populações distintas, inferir o grau de variabilidade genética dentro e entre as localidades amostradas na bacia do rio Branco,

comparar esses resultados com outros trabalhos realizados com a mesma espécie (*Brachyplatystoma rousseauxii*) na região Amazônica, utilizamos a análise de variância molecular (AMOVA), que foi realizada com o auxílio do programa computacional ARLEQUIN 3.01 (SCHNEIDER et al., 2005). Nesse modelo estatístico a diversidade genética é dividida pelos componentes variantes dentro da população e entre populações.

Foi estimado também o índice de fixação (F_{ST}) que foi obtido pela razão entre os componentes variantes (V_a e V_b), considerando que os haplótipos de DNA mitocondrial são de origem apenas materna.

Uma matriz de distância genética par a par foi elaborada, com o auxílio do PAUP 4.0 (SWOFFORD, 2002). Sendo construída também uma árvore de haplótipos com o auxílio do programa TCS 1.18 (CLEMENT et al., 2000) buscando facilitar a observação dos níveis de ancestralidade.

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 Extração e Amplificação do DNA

Extraímos o DNA total de 54 espécimes de *Brachyplatystoma rousseauxi*, 16 exemplares provenientes do rio Anauá (A), e 38 capturados na calha principal do baixo rio Branco (B), que foram submetidas à eletroforese em gel de agarose a 0,8%, para estimar a concentração de DNA extraído por amostra. Utilizamos o método qualitativo, por comparação com marcador molecular de concentração conhecido (DNA Lambda não digerido - 100 ng) (figura 8).

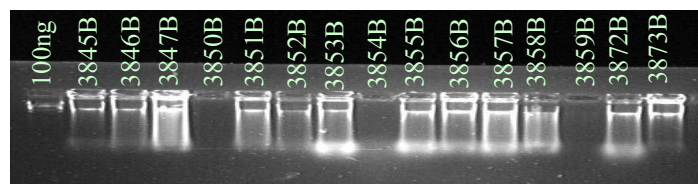


Figura 8. Gel de agarose 0,8% demonstrando o DNA total de 15 indivíduos.

As amostras foram então submetidas à amplificação da região controle do DNAm, por meio de reação de PCR utilizando os *primers* FTTF e F12R, específicos para essa região (Figura 9).

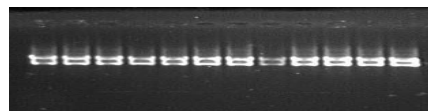


Figura 9. Gel de agarose 1,0 % da amplificação da região controle do DNA mitocondrial de 12 espécimes de dourada coletados na bacia do rio Branco.

4.2 Alinhamento das seqüências da região controle

Após edição, compilação e alinhamento das seqüências nucleotídicas dos 54 fragmentos da região controle do DNAm, foi verificado que essa região é constituída de 911 pb, não sendo necessária a introdução de *Gaps* (eventos de inserção ou deleção), que normalmente são incluídos no alinhamento com o propósito de estabelecer homologia dos sítios (anexo 1).

4.3 Seqüências da região controle (DNA mt)

4.3.1 Composição nucleotídica e Análise do número de substituições (mutações)

A região controle do DNAmT dos 54 indivíduos analisados apresentou os seguintes percentuais de composição nucleotídica: Citosina 21,26%, Timina 32,93%, Adenina 31,80% e Guanina 14,00% (figura 10). Esses resultados eram esperados já que em geral, Adenina e Timina são as bases nucleotídicas predominantes no DNA mitocondrial de organismos ectotérmicos, e em consequência Guanina e Citosina aparecem em menor quantidade nesses genomas (MEYER,1993).

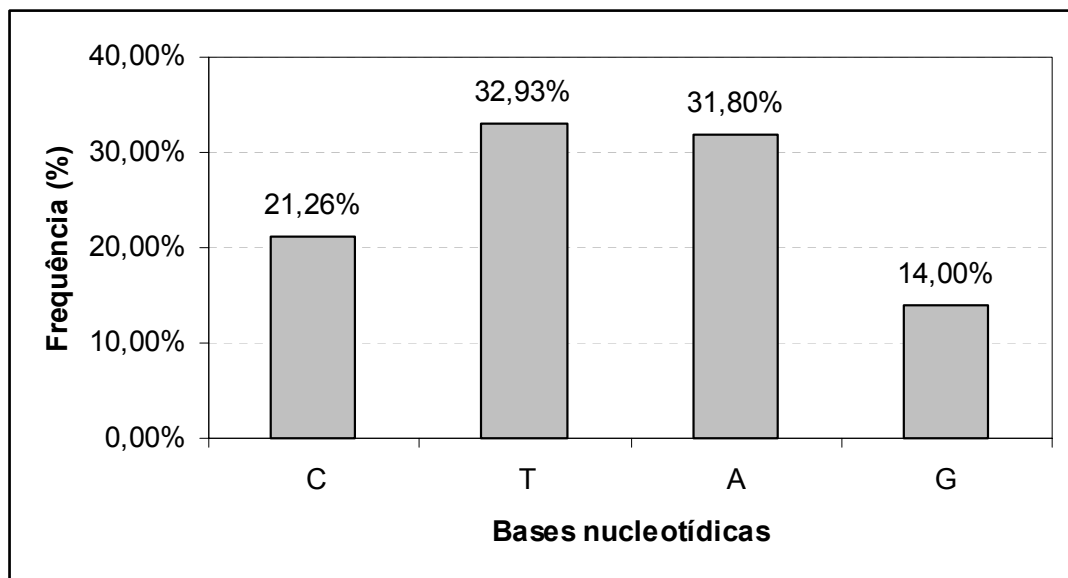


Figura 10. Composição percentual das bases nucleotídicas das 54 seqüências da região controle do DNA mitocondrial de *Brachyplatystoma rousseauxi*.

A partir da análise dos 911pb de cada exemplar, verificou-se a ocorrência de 56 mutações (substituições), sendo 50 transições e 6 transversões. Observou-se que as substituições ocorrem em sítios diferentes, variando de um indivíduo para outro. Em geral, a taxa de transição é maior que a taxa de transversão (MEYER, 1993).

4.4 Análise e distribuição dos Haplótipos

Entre os 54 indivíduos sequenciados (tabela 3), foi observada a ocorrência de 44 haplótipos (H) nas localidades dos rios Anauá e Branco. Destes, 43 são haplótipos únicos (HU ou *singletons*). Esses resultados indicam alta variabilidade genética, já que 79,62% dos indivíduos analisados possuem seqüências de pares de bases únicas. Quando se analisa isoladamente os dados do rio Anauá, verifica-se que dos 16 indivíduos amostrados, três possuem o mesmo haplótipo (4191A, 4193A e 4196A) e 13 são *singletons*, totalizando 14 haplótipos diferentes, o que corresponde a 87,5% dos indivíduos analisados. Dos 38

indivíduos pesquisados provenientes do baixo rio Branco, oito correspondem ao mesmo haplótipo (4223B, 4211B, 4226B, 4228B, 3845B, 3853B, 3858B e 4210B) e 30 indivíduos apresentaram-se como haplótipos únicos, representando 78,94 % de seqüências únicas.

Dos 43 *singletons* amostrados, 30 são do baixo rio Branco ($N = 38$ e $HD = 0,98$) e 13 são do rio Anauá ($N=16$ e $HD = 0,97$).

4.5 Análises populacionais

No baixo rio Branco foram encontrados os maiores índices de diversidade haplotípica ($HD = 0,98$), mencionada anteriormente, maior número de sítios polimórficos ($S = 48$) e, em conseqüência, maior número de mutações ($ETA = 50$), e ainda maior diversidade nucleotídica ($Pi = 0,0087$) e maior média de diferenças nucleotídicas par a par ($K = 7,987$) (tabela 03). Embora haja diferenças nos níveis de variabilidade genética entre os indivíduos das duas localidades de dourada estudadas, em termos de variabilidade genética, elas não estão fixadas, indicando que estes indivíduos não estão isolados geneticamente. Batista (2001) também encontrou resultados similares quando avaliou indivíduos de dourada provenientes de 03 localidades (Belém, Manaus e Tabatinga/Letícia), verificando maior variabilidade genética em Belém e que a variabilidade parece diminuir no sentido Estuário Amazônico - Alto Solimões (Belém – Tabatinga/Letícia).

Tabela 3. Resultados da análise de polimorfismo de DNA mitocondrial, obtido através das seqüências nucleotídicas da região controle, considerando as duas localidades estudadas separadamente e conjuntamente.

| Localidade | N | H | HU | Pb | S | ETA | HD | Pi | K |
|------------|----|----|----|-----|----|-----|-------------------|------------------|-----------------|
| Rio Anauá | 16 | 14 | 13 | 911 | 25 | 26 | 0.975+/- 0.034 | 0.0064+/- 0.0036 | 5.900 +/- 2.973 |
| Rio Branco | 38 | 33 | 30 | 911 | 48 | 50 | 0.988+/- 0.010 | 0.0087+/- 0.0046 | 7.987 +/-3.794 |

| | |
|------------|-------------------------------|
| N | Número de indivíduos |
| H | Haplótipos |
| HU | Haplótipos únicos |
| Pb | Pares de bases |
| S | Sítios polimórficos |
| ETA | Mutações |
| HD | Diversidade haplotípica |
| Pi | Diversidade nucleotídica |
| K | Média das diferenças para par |

De acordo com Kimura (1971), as populações podem ser diferenciadas geneticamente quando o estimador de fluxo gênico Nm (N , número de migrantes por geração e m , taxa de mutação/sítio por geração) assumir valores menores que 1, e serem consideradas como uma população panmítica quando Nm for superior a 4. Se comparamos as estimativas dos valores das taxas de fluxo gênico, Nm , entre as populações do rio Anauá e baixo rio Branco, e incluirmos as estimativas encontradas por Batista (2001), para as douradas de Belém e Tabatinga, e Vogt (2004) para douradas provenientes do rio Madeira, constatamos que ocorre um alto fluxo gênico pois as taxas encontradas tendem ao infinito, indicando que ocorre alta frequência de migração (tabela 4).

Tabela 4. Estimativas dos valores das taxas de Nm , entre as populações do rio Anauá, Branco, Belém, rio Madeira e tabatinga.

| População | Anauá | Branco | Belém | Madeira |
|------------------|----------|----------|----------|---------|
| Anauá | | | | |
| Branco | 118.842 | | | |
| Belém | infinito | Infinito | | |
| Madeira | 16.108 | 20.117 | infinito | |
| Tabatinga | 39.460 | 10.125 | infinito | 70.609 |

É possível verificar na árvore de haplótipos obtida que os indivíduos pesquisados não estão segregando (figura 11). Houve o compartilhamento de haplótipos entre os indivíduos coletados no baixo rio Branco e no rio Anauá. Este padrão também se repete dentre os haplótipos supostamente mais ancestrais das duas localidades, contidos no retângulo inicial (4184a, 4223b, 4211b, 4226b, 4228b), onde encontram-se quatro indivíduos do baixo rio Branco e um do rio Anauá. Comportamento similar foi encontrado por Batista (2001) estudando a mesma espécie, oriunda de Belém, Manaus e Tabatinga/Letícia, utilizando o método da máxima parcimônia, máxima verossimilhança e método da distância genética.

Os haplótipos agrupados nas elipses maiores são derivados e também pertencem às duas localidades (4191a, 4193a, 4196a, 3845 b e 3853b), três do rio Anauá e dois do rio Branco, respectivamente.

Duas elipses menores constituídas por dois indivíduos foram observadas (4201a e 4217b) e (3858b e 4210b), provenientes dos rios Anauá (A) e rio Branco (B), respectivamente. Os demais haplótipos amostrados são únicos (singletons). É importante salientar que em toda a topologia da árvore construída existem vários nós (elipses vazias) representando haplótipos hipotéticos ou que não foram amostrados neste estudo. Se eles ainda

existem no ambiente, uma alternativa para identificá-los, seria aumentar o número de indivíduos amostrados.

Sivasundar et al. (2001) ao caracterizarem a estrutura populacional de 26 espécimens de *Prochilodus lineatus* de 12 localidades no sistema Paraná-Paraguai-Uruguai demonstraram que todos os indivíduos seqüenciados tiveram haplótipos únicos, com divergência nas seqüências (distância genética) variando de 0.3 a 3.6%.

Batista (2001) verificou que a distância genética entre os indivíduos de dourada estudados ao longo do eixo Amazonas/Solimões variou entre 0,0 e 3,5%.

Valores maiores que estes (0,0 a 4,9%) foram determinados por Formiga-Aquino (2003) para um outro siluriforme, a piramutaba (*Brachyplatystoma vaillantii*).

Resultados semelhantes foram encontrados nesse estudo. A distância genética observada (tabela 5) demonstrou que a divergência nas seqüências dos 44 háplótipos de dourada estudados variou entre 0.0 (quando os haplótipos eram comuns) e 4.08 %, entre os haplótipos 4231B e 4202B. Observa-se que os haplótipos com maior distância genética são provenientes do rio Branco.

4.6 Análise da variabilidade genética intraespecífica entre e dentro das localidades analisadas na bacia do Rio Branco

Foi realizada a Análise de Variância Molecular (AMOVA), buscando verificar se há diferenciação genética significativa entre as localidades amostradas. Com esta análise é possível também quantificar a variabilidade genética dentro e entre estas mesmas localidades. A manutenção da variabilidade genética de uma população representa um dos principais objetivos dos programas de manejo dos recursos pesqueiros na Amazônia, uma vez que uma maior variabilidade genética favorece a adaptabilidade das espécies ao ambiente.

Segundo Wright (1931), o nível de diversidade genética e diferenciação entre populações são influenciados por fatores como endogamia, deriva genética, fluxo gênico e sistema de acasalamento e desse modo, as estimativas da diversidade genética e sua distribuição entre e dentro das populações são fundamentais para estabelecer estratégias de conservação de espécies. Os resultados da variabilidade genética da dourada entre e dentro das localidades amostradas nos rios Anauá e baixo rio Branco, encontram-se na tabela de AMOVA (tabela 6).

Tabela 5. Matriz de distância entre os 44 haplótipos de dourada, coletados no Rio Anauá (A) e Baixo Rio Branco (B). Os valores acima da diagonal representam a distância genética; em azul a maior distância encontrada. Os números abaixo representam o número de substituições nucleotídicas.

| | 4183A | 4187A | 4184A | 4188A | 4189A | 4190A | 4191A | 4192A | 4194A | 4197A | 4198A | 4199A | 4200A | 4201A | 3850B | 4224B | 800B | 3846B |
|-------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
| 4183A | | 2.4414 | 2.4414 | 2.6356 | 2.4414 | 2.6356 | 1.9956 | 2.4414 | 2.2299 | 2.8160 | 1.9956 | 3.1449 | 2.2299 | 2.8160 | 1.4127 | 3.1449 | 2.6356 | 2.4414 |
| 4187A | 6.0000 | | 2.8160 | 2.9851 | 2.4414 | 2.2299 | 1.9956 | 2.4414 | 2.2299 | 1.9956 | 1.9956 | 3.1449 | 2.6356 | 2.8160 | 1.9956 | 2.4414 | 2.9851 | 2.4414 |
| 4184A | 6.0000 | 8.0000 | | 0.9995 | 2.8160 | 2.6356 | 2.4414 | 2.8160 | 2.6356 | 2.8160 | 2.4414 | 3.4412 | 0.9995 | 3.1449 | 1.9956 | 3.1449 | 0.9995 | 2.8160 |
| 4188A | 7.0000 | 9.0000 | 1.0000 | | 2.9851 | 2.8160 | 2.6356 | 2.9851 | 2.8160 | 2.9851 | 2.6356 | 3.5797 | 1.4127 | 3.2965 | 2.2299 | 3.2965 | 1.4127 | 2.9851 |
| 4189A | 6.0000 | 6.0000 | 8.0000 | 9.0000 | | 2.6356 | 1.9956 | 2.4414 | 0.9995 | 2.8160 | 1.9956 | 2.4414 | 2.6356 | 1.9956 | 1.9956 | 3.1449 | 2.9851 | 1.4127 |
| 4190A | 7.0000 | 5.0000 | 7.0000 | 8.0000 | 7.0000 | | 1.9956 | 2.4414 | 2.4414 | 2.6356 | 2.2299 | 3.2965 | 2.4414 | 2.9851 | 2.2299 | 3.2965 | 2.8160 | 2.6356 |
| 4191A | 4.0000 | 4.0000 | 6.0000 | 7.0000 | 4.0000 | 4.0000 | | 1.4127 | 1.7292 | 2.2299 | 1.4127 | 2.8160 | 2.2299 | 2.4414 | 1.4127 | 2.8160 | 2.6356 | 1.9956 |
| 4192A | 6.0000 | 6.0000 | 8.0000 | 9.0000 | 6.0000 | 6.0000 | 2.0000 | | 2.2299 | 2.6356 | 1.9956 | 3.1449 | 2.6356 | 2.8160 | 1.9956 | 3.1449 | 2.9851 | 2.4414 |
| 4194A | 5.0000 | 5.0000 | 7.0000 | 8.0000 | 1.0000 | 6.0000 | 3.0000 | 5.0000 | | 2.6356 | 1.7292 | 2.2299 | 2.4414 | 1.7292 | 1.7292 | 2.9851 | 2.8160 | 0.9995 |
| 4197A | 8.0000 | 4.0000 | 8.0000 | 9.0000 | 8.0000 | 7.0000 | 5.0000 | 7.0000 | 7.0000 | | 2.4414 | 3.4412 | 2.6356 | 3.1449 | 2.4414 | 2.4414 | 2.9851 | 2.8160 |
| 4198A | 4.0000 | 4.0000 | 6.0000 | 7.0000 | 4.0000 | 5.0000 | 2.0000 | 4.0000 | 3.0000 | 6.0000 | | 2.8160 | 2.2299 | 2.4414 | 1.4127 | 2.8160 | 2.6356 | 1.9956 |
| 4199A | 10.0000 | 10.0000 | 12.0000 | 13.0000 | 6.0000 | 11.0000 | 8.0000 | 10.0000 | 5.0000 | 12.0000 | 8.0000 | | 3.2965 | 1.4127 | 2.8160 | 3.7128 | 3.5797 | 1.9956 |
| 4200A | 5.0000 | 7.0000 | 1.0000 | 2.0000 | 7.0000 | 6.0000 | 5.0000 | 7.0000 | 6.0000 | 7.0000 | 5.0000 | 11.0000 | | 2.9851 | 1.7292 | 2.9851 | 1.4127 | 2.6356 |
| 4201A | 8.0000 | 8.0000 | 10.0000 | 11.0000 | 4.0000 | 9.0000 | 6.0000 | 8.0000 | 3.0000 | 10.0000 | 6.0000 | 2.0000 | 9.0000 | | 2.4414 | 3.4412 | 3.2965 | 1.4127 |
| 3850B | 2.0000 | 4.0000 | 4.0000 | 5.0000 | 4.0000 | 5.0000 | 2.0000 | 4.0000 | 3.0000 | 6.0000 | 2.0000 | 8.0000 | 3.0000 | 6.0000 | | 2.8160 | 2.2299 | 1.9956 |
| 4224B | 10.0000 | 6.0000 | 10.0000 | 11.0000 | 10.0000 | 11.0000 | 8.0000 | 10.0000 | 9.0000 | 6.0000 | 8.0000 | 14.0000 | 9.0000 | 12.0000 | 8.0000 | | 3.2965 | 3.1449 |
| 800B | 7.0000 | 9.0000 | 1.0000 | 2.0000 | 9.0000 | 8.0000 | 7.0000 | 9.0000 | 8.0000 | 9.0000 | 7.0000 | 13.0000 | 2.0000 | 11.0000 | 5.0000 | 11.0000 | | 2.9851 |
| 3846B | 6.0000 | 6.0000 | 8.0000 | 9.0000 | 2.0000 | 7.0000 | 4.0000 | 6.0000 | 1.0000 | 8.0000 | 4.0000 | 4.0000 | 7.0000 | 2.0000 | 4.0000 | 10.0000 | 9.0000 | |
| 3847B | 1.0000 | 5.0000 | 5.0000 | 6.0000 | 5.0000 | 6.0000 | 3.0000 | 5.0000 | 4.0000 | 7.0000 | 3.0000 | 9.0000 | 4.0000 | 7.0000 | 1.0000 | 9.0000 | 6.0000 | 5.0000 |
| 3851B | 7.0000 | 9.0000 | 1.0000 | 2.0000 | 9.0000 | 8.0000 | 7.0000 | 9.0000 | 8.0000 | 9.0000 | 7.0000 | 13.0000 | 2.0000 | 11.0000 | 5.0000 | 9.0000 | 2.0000 | 9.0000 |
| 3852B | 7.0000 | 7.0000 | 7.0000 | 6.0000 | 7.0000 | 4.0000 | 5.0000 | 7.0000 | 6.0000 | 9.0000 | 5.0000 | 11.0000 | 6.0000 | 9.0000 | 5.0000 | 11.0000 | 8.0000 | 7.0000 |
| 3854B | 5.0000 | 5.0000 | 7.0000 | 8.0000 | 5.0000 | 4.0000 | 3.0000 | 5.0000 | 4.0000 | 7.0000 | 3.0000 | 9.0000 | 6.0000 | 7.0000 | 3.0000 | 9.0000 | 8.0000 | 5.0000 |
| 3856B | 7.0000 | 3.0000 | 7.0000 | 8.0000 | 7.0000 | 6.0000 | 4.0000 | 6.0000 | 6.0000 | 1.0000 | 5.0000 | 11.0000 | 6.0000 | 9.0000 | 5.0000 | 5.0000 | 8.0000 | 7.0000 |
| 3857B | 7.0000 | 9.0000 | 1.0000 | 2.0000 | 9.0000 | 8.0000 | 7.0000 | 9.0000 | 8.0000 | 9.0000 | 7.0000 | 13.0000 | 2.0000 | 11.0000 | 5.0000 | 11.0000 | 2.0000 | 9.0000 |
| 3858B | 7.0000 | 7.0000 | 9.0000 | 10.0000 | 7.0000 | 6.0000 | 5.0000 | 7.0000 | 6.0000 | 9.0000 | 5.0000 | 11.0000 | 8.0000 | 9.0000 | 5.0000 | 9.0000 | 10.0000 | 7.0000 |
| 3859B | 5.0000 | 5.0000 | 7.0000 | 8.0000 | 5.0000 | 5.0000 | 1.0000 | 3.0000 | 4.0000 | 6.0000 | 3.0000 | 9.0000 | 6.0000 | 7.0000 | 3.0000 | 9.0000 | 8.0000 | 5.0000 |
| 3872B | 8.0000 | 4.0000 | 8.0000 | 9.0000 | 8.0000 | 7.0000 | 5.0000 | 7.0000 | 7.0000 | 2.0000 | 6.0000 | 12.0000 | 7.0000 | 10.0000 | 6.0000 | 6.0000 | 9.0000 | 8.0000 |
| 3873B | 11.0000 | 7.0000 | 11.0000 | 10.0000 | 11.0000 | 10.0000 | 8.0000 | 10.0000 | 10.0000 | 5.0000 | 9.0000 | 15.0000 | 10.0000 | 13.0000 | 9.0000 | 5.0000 | 12.0000 | 11.0000 |
| 4202B | 12.0000 | 12.0000 | 12.0000 | 13.0000 | 14.0000 | 13.0000 | 12.0000 | 14.0000 | 13.0000 | 14.0000 | 12.0000 | 16.0000 | 13.0000 | 14.0000 | 10.0000 | 14.0000 | 13.0000 | 12.0000 |
| 4206B | 4.0000 | 4.0000 | 6.0000 | 7.0000 | 4.0000 | 5.0000 | 2.0000 | 4.0000 | 3.0000 | 6.0000 | 2.0000 | 8.0000 | 5.0000 | 6.0000 | 2.0000 | 8.0000 | 7.0000 | 4.0000 |
| 4207B | 11.0000 | 7.0000 | 11.0000 | 12.0000 | 11.0000 | 12.0000 | 9.0000 | 11.0000 | 10.0000 | 9.0000 | 9.0000 | 13.0000 | 12.0000 | 13.0000 | 9.0000 | 7.0000 | 12.0000 | 11.0000 |
| 4208B | 4.0000 | 4.0000 | 6.0000 | 7.0000 | 4.0000 | 3.0000 | 2.0000 | 4.0000 | 3.0000 | 6.0000 | 2.0000 | 8.0000 | 5.0000 | 6.0000 | 2.0000 | 8.0000 | 7.0000 | 4.0000 |
| 4227B | 13.0000 | 9.0000 | 11.0000 | 12.0000 | 13.0000 | 12.0000 | 10.0000 | 12.0000 | 12.0000 | 7.0000 | 11.0000 | 15.0000 | 12.0000 | 15.0000 | 11.0000 | 7.0000 | 12.0000 | 13.0000 |
| 4212B | 9.0000 | 9.0000 | 11.0000 | 12.0000 | 5.0000 | 10.0000 | 7.0000 | 9.0000 | 4.0000 | 11.0000 | 7.0000 | 3.0000 | 10.0000 | 1.0000 | 7.0000 | 13.0000 | 12.0000 | 3.0000 |
| 4213B | 7.0000 | 7.0000 | 9.0000 | 8.0000 | 3.0000 | 8.0000 | 5.0000 | 7.0000 | 2.0000 | 9.0000 | 5.0000 | 5.0000 | 8.0000 | 3.0000 | 5.0000 | 11.0000 | 10.0000 | 3.0000 |
| 4214B | 10.0000 | 6.0000 | 10.0000 | 11.0000 | 10.0000 | 9.0000 | 7.0000 | 9.0000 | 9.0000 | 4.0000 | 8.0000 | 14.0000 | 9.0000 | 12.0000 | 8.0000 | 4.0000 | 11.0000 | 10.0000 |
| 4215B | 6.0000 | 6.0000 | 6.0000 | 7.0000 | 6.0000 | 5.0000 | 3.0000 | 3.0000 | 5.0000 | 4.0000 | 4.0000 | 10.0000 | 5.0000 | 8.0000 | 4.0000 | 8.0000 | 7.0000 | 6.0000 |
| 4218B | 7.0000 | 7.0000 | 9.0000 | 10.0000 | 3.0000 | 8.0000 | 5.0000 | 7.0000 | 2.0000 | 9.0000 | 5.0000 | 3.0000 | 8.0000 | 1.0000 | 5.0000 | 11.0000 | 10.0000 | 3.0000 |
| 4219B | 7.0000 | 7.0000 | 7.0000 | 8.0000 | 7.0000 | 4.0000 | 5.0000 | 7.0000 | 6.0000 | 9.0000 | 5.0000 | 11.0000 | 6.0000 | 9.0000 | 5.0000 | 11.0000 | 8.0000 | 7.0000 |
| 4220B | 9.0000 | 5.0000 | 9.0000 | 10.0000 | 9.0000 | 8.0000 | 6.0000 | 8.0000 | 8.0000 | 3.0000 | 7.0000 | 13.0000 | 8.0000 | 11.0000 | 7.0000 | 7.0000 | 10.0000 | 9.0000 |
| 4221B | 10.0000 | 9.0000 | 12.0000 | 13.0000 | 10.0000 | 8.0000 | 8.0000 | 10.0000 | 9.0000 | 12.0000 | 8.0000 | 12.0000 | 11.0000 | 10.0000 | 8.0000 | 12.0000 | 13.0000 | 8.0000 |
| 4229B | 10.0000 | 6.0000 | 10.0000 | 11.0000 | 10.0000 | 11.0000 | 8.0000 | 10.0000 | 9.0000 | 4.0000 | 8.0000 | 14.0000 | 9.0000 | 12.0000 | 8.0000 | 8.0000 | 11.0000 | 10.0000 |
| 4230B | 9.0000 | 9.0000 | 9.0000 | 10.0000 | 9.0000 | 8.0000 | 7.0000 | 9.0000 | 8.0000 | 9.0000 | 7.0000 | 11.0000 | 8.0000 | 9.0000 | 7.0000 | 9.0000 | 10.0000 | 7.0000 |
| 4231B | 11.0000 | 7.0000 | 9.0000 | 10.0000 | 11.0000 | 8.0000 | 8.0000 | 10.0000 | 10.0000 | 5.0000 | 9.0000 | 15.0000 | 8.0000 | 13.0000 | 9.0000 | 9.0000 | 10.0000 | 11.0000 |

Continuação ...

| 3847B | 3851B | 3852B | 3854B | 3856B | 3857B | 3858B | 3859B | 3872B | 3873B | 4202B | 4206B | 4207B | 4208B | 4227B | 4212B | 4213B | 4214B | 4215B |
|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
| 0.9995 | 2.6356 | 2.6356 | 2.2299 | 2.6356 | 2.6356 | 2.6356 | 2.2299 | 2.8160 | 3.2965 | 3.4412 | 1.9956 | 3.2965 | 1.9956 | 3.5797 | 2.9851 | 2.6356 | 3.1449 | 2.4414 |
| 2.2299 | 2.9851 | 2.6356 | 2.2299 | 1.7292 | 2.9851 | 2.6356 | 2.2299 | 1.9956 | 2.6356 | 3.4412 | 1.9956 | 2.6356 | 1.9956 | 2.9851 | 2.9851 | 2.6356 | 2.4414 | 2.4414 |
| 2.2299 | 0.9995 | 2.6356 | 2.6356 | 2.6356 | 0.9995 | 2.9851 | 2.6356 | 2.8160 | 3.2965 | 3.4412 | 2.4414 | 3.2965 | 2.4414 | 3.2965 | 3.2965 | 2.9851 | 3.1449 | 2.4414 |
| 2.4414 | 1.4127 | 2.4414 | 2.8160 | 2.8160 | 1.4127 | 3.1449 | 2.8160 | 2.9851 | 3.1449 | 3.5797 | 2.6356 | 3.4412 | 2.6356 | 3.4412 | 3.4412 | 2.8160 | 3.2965 | 2.6356 |
| 2.2299 | 2.9851 | 2.6356 | 2.2299 | 2.6356 | 2.9851 | 2.6356 | 2.2299 | 2.8160 | 3.2965 | 3.7128 | 1.9956 | 3.2965 | 1.9956 | 3.5797 | 2.2299 | 1.7292 | 3.1449 | 2.4414 |
| 2.4414 | 2.8160 | 1.9956 | 1.9956 | 2.4414 | 2.8160 | 2.4414 | 2.2299 | 2.6356 | 3.1449 | 3.5797 | 2.2299 | 3.4412 | 1.7292 | 3.4412 | 3.1449 | 2.8160 | 2.9851 | 2.2299 |
| 1.7292 | 2.6356 | 2.2299 | 1.7292 | 1.9956 | 2.6356 | 2.2299 | 0.9995 | 2.2299 | 2.8160 | 3.4412 | 1.4127 | 2.9851 | 1.4127 | 3.1449 | 2.6356 | 2.2299 | 2.6356 | 1.7292 |
| 2.2299 | 2.9851 | 2.6356 | 2.2299 | 2.4414 | 2.9851 | 2.6356 | 1.7292 | 2.6356 | 3.1449 | 3.7128 | 1.9956 | 3.2965 | 1.9956 | 3.4412 | 2.9851 | 2.6356 | 2.9851 | 1.7292 |
| 1.9956 | 2.8160 | 2.4414 | 1.9956 | 2.4414 | 2.8160 | 2.4414 | 1.9956 | 2.6356 | 3.1449 | 3.5797 | 1.7292 | 3.1449 | 1.7292 | 3.4412 | 1.9956 | 1.4127 | 2.9851 | 2.2299 |
| 2.6356 | 2.9851 | 2.9851 | 2.6356 | 0.9995 | 2.9851 | 2.9851 | 2.4414 | 1.4127 | 2.2299 | 3.7128 | 2.4414 | 2.9851 | 2.4414 | 2.6356 | 3.2965 | 2.9851 | 1.9956 | 1.9956 |
| 1.7292 | 2.6356 | 2.2299 | 1.7292 | 2.2299 | 2.6356 | 2.2299 | 1.7292 | 2.4414 | 3.4412 | 1.4127 | 2.9851 | 2.9851 | 1.4127 | 3.2965 | 2.6356 | 2.2299 | 2.8160 | 1.9956 |
| 2.9851 | 3.5797 | 3.2965 | 2.9851 | 3.2965 | 3.5797 | 3.2965 | 2.9851 | 3.4412 | 3.8410 | 3.9647 | 2.8160 | 3.5797 | 2.8160 | 3.8410 | 1.7292 | 2.2299 | 3.7128 | 3.1449 |
| 1.9956 | 1.4127 | 2.4414 | 2.4414 | 2.4414 | 1.4127 | 2.8160 | 2.4414 | 2.6356 | 3.1449 | 3.5797 | 2.2299 | 3.4412 | 2.2299 | 3.4412 | 3.1449 | 2.8160 | 2.9851 | 2.2299 |
| 2.6356 | 3.2965 | 2.9851 | 2.6356 | 2.9851 | 3.2965 | 2.9851 | 2.6356 | 3.1449 | 3.5797 | 3.7128 | 2.4414 | 3.5797 | 2.4414 | 3.8410 | 0.9995 | 1.7292 | 3.4412 | 2.8160 |
| 0.9995 | 2.2299 | 2.2299 | 1.7292 | 2.2299 | 2.2299 | 2.2299 | 1.7292 | 2.4414 | 2.9851 | 3.1449 | 1.4127 | 2.9851 | 1.4127 | 3.2965 | 2.6356 | 2.2299 | 2.8160 | 1.9956 |
| 2.9851 | 2.9851 | 3.2965 | 2.9851 | 2.2299 | 3.2965 | 2.9851 | 2.9851 | 2.4414 | 2.2299 | 3.7128 | 2.8160 | 2.6356 | 2.8160 | 2.6356 | 3.5797 | 3.2965 | 1.9956 | 2.8160 |
| 2.4414 | 1.4127 | 2.8160 | 2.8160 | 2.8160 | 1.4127 | 3.1449 | 2.8160 | 2.9851 | 3.4412 | 3.5797 | 2.6356 | 3.4412 | 2.6356 | 3.4412 | 3.4412 | 3.1449 | 3.2965 | 2.6356 |
| 2.2299 | 2.9851 | 2.6356 | 2.2299 | 2.6356 | 2.9851 | 2.6356 | 2.2299 | 2.8160 | 3.2965 | 3.4412 | 1.9956 | 3.2965 | 1.9956 | 3.5797 | 1.7292 | 1.7292 | 3.1449 | 2.4414 |
| | 2.4414 | 2.4414 | 1.9956 | 2.4414 | 2.4414 | 2.4414 | 1.9956 | 2.6356 | 3.1449 | 3.2965 | 1.7292 | 3.1449 | 1.7292 | 3.4412 | 2.8160 | 2.4414 | 2.9851 | 2.2299 |
| 6.0000 | | 2.8160 | 2.8160 | 2.8160 | 1.4127 | 2.8160 | 2.8160 | 2.9851 | 3.4412 | 3.5797 | 2.6356 | 3.4412 | 2.6356 | 3.4412 | 3.4412 | 3.1449 | 3.2965 | 2.6356 |
| 6.0000 | 8.0000 | | 1.9956 | 2.8160 | 2.8160 | 1.9956 | 2.4414 | 2.9851 | 3.1449 | 3.5797 | 2.2299 | 3.4412 | 1.7292 | 3.7128 | 3.1449 | 2.4414 | 3.2965 | 2.6356 |
| 4.0000 | 8.0000 | 4.0000 | | 2.4414 | 2.8160 | 1.9956 | 1.9956 | 2.6356 | 3.1449 | 3.2965 | 1.7292 | 3.1449 | 0.9995 | 3.4412 | 2.8160 | 2.4414 | 2.9851 | 2.2299 |
| 6.0000 | 8.0000 | 8.0000 | 6.0000 | | 2.8160 | 2.8160 | 2.2299 | 0.9995 | 1.9956 | 3.5797 | 2.2299 | 2.8160 | 2.2299 | 2.4414 | 3.1449 | 2.8160 | 1.7292 | 1.7292 |
| 6.0000 | 2.0000 | 8.0000 | 8.0000 | 8.0000 | | 3.1449 | 2.8160 | 2.9851 | 3.4412 | 3.5797 | 2.6356 | 3.4412 | 2.6356 | 3.4412 | 3.4412 | 3.1449 | 3.2965 | 2.6356 |
| 6.0000 | 8.0000 | 4.0000 | 4.0000 | 8.0000 | 10.0000 | | 2.4414 | 2.6356 | 3.4412 | 3.2965 | 2.2299 | 3.4412 | 1.7292 | 3.7128 | 3.1449 | 2.8160 | 3.2965 | 2.6356 |
| 4.0000 | 8.0000 | 6.0000 | 4.0000 | 5.0000 | 8.0000 | 6.0000 | | 2.4414 | 2.9851 | 3.5797 | 1.7292 | 3.1449 | 1.7292 | 3.2965 | 2.8160 | 2.4414 | 2.8160 | 1.9956 |
| 7.0000 | 9.0000 | 9.0000 | 7.0000 | 1.0000 | 9.0000 | 7.0000 | 6.0000 | | 2.2299 | 3.4412 | 2.4414 | 2.9851 | 2.4414 | 2.6356 | 3.2965 | 2.9851 | 1.9956 | 1.9956 |
| 10.0000 | 12.0000 | 10.0000 | 10.0000 | 4.0000 | 12.0000 | 12.0000 | 9.0000 | 5.0000 | | 3.8410 | 2.9851 | 2.4414 | 2.9851 | 1.9956 | 3.7128 | 3.1449 | 0.9995 | 2.6356 |
| 11.0000 | 13.0000 | 13.0000 | 11.0000 | 13.0000 | 13.0000 | 11.0000 | 13.0000 | 12.0000 | 15.0000 | | 3.4412 | 3.5797 | 3.1449 | 3.8410 | 3.8410 | 3.8410 | 3.7128 | 3.7128 |
| 3.0000 | 7.0000 | 5.0000 | 3.0000 | 5.0000 | 7.0000 | 5.0000 | 3.0000 | 6.0000 | 9.0000 | 12.0000 | | 2.9851 | 1.4127 | 3.2965 | 2.6356 | 2.2299 | 2.8160 | 1.9956 |
| 10.0000 | 12.0000 | 12.0000 | 10.0000 | 8.0000 | 12.0000 | 12.0000 | 10.0000 | 9.0000 | 6.0000 | 13.0000 | 9.0000 | | 2.9851 | 1.4127 | 3.7128 | 3.4412 | 2.2299 | 3.2965 |
| 3.0000 | 7.0000 | 3.0000 | 1.0000 | 5.0000 | 7.0000 | 3.0000 | 3.0000 | 6.0000 | 9.0000 | 10.0000 | 2.0000 | 9.0000 | | 3.2965 | 2.6356 | 2.2299 | 2.8160 | 1.9956 |
| 12.0000 | 12.0000 | 14.0000 | 12.0000 | 6.0000 | 12.0000 | 14.0000 | 11.0000 | 7.0000 | 4.0000 | 15.0000 | 11.0000 | 2.0000 | 11.0000 | | 3.9647 | 3.7128 | 1.7292 | 2.9851 |
| 8.0000 | 12.0000 | 10.0000 | 8.0000 | 10.0000 | 12.0000 | 10.0000 | 8.0000 | 11.0000 | 14.0000 | 15.0000 | 7.0000 | 14.0000 | 7.0000 | 16.0000 | | 1.9956 | 3.5797 | 2.9851 |
| 6.0000 | 10.0000 | 6.0000 | 6.0000 | 8.0000 | 10.0000 | 8.0000 | 6.0000 | 9.0000 | 10.0000 | 15.0000 | 5.0000 | 12.0000 | 5.0000 | 14.0000 | 4.0000 | | 3.2965 | 2.6356 |
| 9.0000 | 11.0000 | 11.0000 | 9.0000 | 3.0000 | 11.0000 | 11.0000 | 8.0000 | 4.0000 | 1.0000 | 14.0000 | 8.0000 | 5.0000 | 8.0000 | 3.0000 | 13.0000 | 11.0000 | | 2.4414 |
| 5.0000 | 7.0000 | 7.0000 | 5.0000 | 3.0000 | 7.0000 | 7.0000 | 4.0000 | 4.0000 | 7.0000 | 14.0000 | 4.0000 | 11.0000 | 4.0000 | 9.0000 | 9.0000 | 7.0000 | 6.0000 | |
| 6.0000 | 10.0000 | 8.0000 | 6.0000 | 8.0000 | 10.0000 | 8.0000 | 6.0000 | 9.0000 | 12.0000 | 15.0000 | 5.0000 | 12.0000 | 5.0000 | 14.0000 | 2.0000 | 2.0000 | 11.0000 | 7.0000 |
| 6.0000 | 8.0000 | 2.0000 | 4.0000 | 8.0000 | 8.0000 | 4.0000 | 6.0000 | 9.0000 | 12.0000 | 13.0000 | 5.0000 | 12.0000 | 3.0000 | 14.0000 | 10.0000 | 8.0000 | 11.0000 | 7.0000 |
| 8.0000 | 10.0000 | 10.0000 | 8.0000 | 2.0000 | 8.0000 | 10.0000 | 7.0000 | 3.0000 | 6.0000 | 15.0000 | 7.0000 | 10.0000 | 7.0000 | 8.0000 | 12.0000 | 10.0000 | 5.0000 | 5.0000 |
| 9.0000 | 13.0000 | 9.0000 | 7.0000 | 11.0000 | 13.0000 | 9.0000 | 9.0000 | 12.0000 | 13.0000 | 12.0000 | 8.0000 | 13.0000 | 6.0000 | 15.0000 | 11.0000 | 11.0000 | 12.0000 | 10.0000 |
| 9.0000 | 11.0000 | 11.0000 | 9.0000 | 5.0000 | 11.0000 | 11.0000 | 9.0000 | 6.0000 | 9.0000 | 16.0000 | 8.0000 | 11.0000 | 8.0000 | 11.0000 | 13.0000 | 11.0000 | 8.0000 | 8.0000 |
| 8.0000 | 10.0000 | 8.0000 | 6.0000 | 8.0000 | 10.0000 | 8.0000 | 8.0000 | 9.0000 | 12.0000 | 13.0000 | 7.0000 | 14.0000 | 5.0000 | 14.0000 | 10.0000 | 10.0000 | 11.0000 | 7.0000 |
| 10.0000 | 10.0000 | 10.0000 | 10.0000 | 4.0000 | 10.0000 | 12.0000 | 9.0000 | 5.0000 | 8.0000 | 17.0000 | 9.0000 | 12.0000 | 9.0000 | 10.0000 | 14.0000 | 12.0000 | 7.0000 | 7.0000 |

Continuação ...

| 4218B | 4219B | 4220B | 4221B | 4229B | 4230B | 4231B |
|---------|---------|---------|---------|---------|---------|--------|
| 2.6356 | 2.6356 | 2.9851 | 3.1449 | 3.1449 | 2.9851 | 3.2965 |
| 2.6356 | 2.6356 | 2.2299 | 2.9851 | 2.4414 | 2.9851 | 2.6356 |
| 2.9851 | 2.6356 | 2.9851 | 3.4412 | 3.1449 | 2.9851 | 2.9851 |
| 3.1449 | 2.8160 | 3.1449 | 3.5797 | 3.2965 | 3.1449 | 3.1449 |
| 1.7292 | 2.6356 | 2.9851 | 3.1449 | 3.1449 | 2.9851 | 3.2965 |
| 2.8160 | 1.9956 | 2.8160 | 2.8160 | 3.2965 | 2.8160 | 2.8160 |
| 2.2299 | 2.2299 | 2.4414 | 2.8160 | 2.8160 | 2.6356 | 2.8160 |
| 2.6356 | 2.6356 | 2.8160 | 3.1449 | 3.1449 | 2.9851 | 3.1449 |
| 1.4127 | 2.4414 | 2.8160 | 2.9851 | 2.9851 | 2.8160 | 3.1449 |
| 2.9851 | 2.9851 | 1.7292 | 3.4412 | 1.9956 | 2.9851 | 2.2299 |
| 2.2299 | 2.2299 | 2.6356 | 2.8160 | 2.8160 | 2.6356 | 2.9851 |
| 1.7292 | 3.2965 | 3.5797 | 3.4412 | 3.7128 | 3.2965 | 3.8410 |
| 2.8160 | 2.4414 | 2.8160 | 3.2965 | 2.9851 | 2.8160 | 2.8160 |
| 0.9995 | 2.9851 | 3.2965 | 3.1449 | 3.4412 | 2.9851 | 3.5797 |
| 2.2299 | 2.2299 | 2.6356 | 2.8160 | 2.8160 | 2.6356 | 2.9851 |
| 3.2965 | 3.2965 | 2.6356 | 3.4412 | 2.8160 | 2.9851 | 2.9851 |
| 3.1449 | 2.8160 | 3.1449 | 3.5797 | 3.2965 | 3.1449 | 3.1449 |
| 1.7292 | 2.6356 | 2.9851 | 2.8160 | 3.1449 | 2.6356 | 3.2965 |
| 2.4414 | 2.4414 | 2.8160 | 2.9851 | 2.9851 | 2.8160 | 3.1449 |
| 3.1449 | 2.8160 | 3.1449 | 3.5797 | 3.2965 | 3.1449 | 3.1449 |
| 2.8160 | 1.4127 | 3.1449 | 2.9851 | 3.2965 | 2.8160 | 3.1449 |
| 2.4414 | 1.9956 | 2.8160 | 2.6356 | 2.9851 | 2.4414 | 3.1449 |
| 2.8160 | 2.8160 | 1.4127 | 3.2965 | 2.2299 | 2.8160 | 1.9956 |
| 3.1449 | 2.8160 | 2.8160 | 3.5797 | 3.2965 | 3.1449 | 3.1449 |
| 2.8160 | 1.9956 | 3.1449 | 2.9851 | 3.2965 | 2.8160 | 3.4412 |
| 2.4414 | 2.4414 | 2.6356 | 2.9851 | 2.9851 | 2.8160 | 2.9851 |
| 2.9851 | 2.9851 | 1.7292 | 3.4412 | 2.4414 | 2.9851 | 2.2299 |
| 3.4412 | 3.4412 | 2.4414 | 3.5797 | 2.9851 | 3.4412 | 2.8160 |
| 3.8410 | 3.5797 | 3.8410 | 3.4412 | 3.9647 | 3.5797 | 4.0845 |
| 2.2299 | 2.2299 | 2.6356 | 2.8160 | 2.8160 | 2.6356 | 2.9851 |
| 3.4412 | 3.4412 | 3.1449 | 3.5797 | 3.2965 | 3.7128 | 3.4412 |
| 2.2299 | 1.7292 | 2.6356 | 2.4414 | 2.8160 | 2.2299 | 2.9851 |
| 3.7128 | 3.7128 | 2.8160 | 3.8410 | 3.2965 | 3.7128 | 3.1449 |
| 1.4127 | 3.1449 | 3.4412 | 3.2965 | 3.5797 | 3.1449 | 3.7128 |
| 1.4127 | 2.8160 | 3.1449 | 3.2965 | 3.2965 | 3.1449 | 3.4412 |
| 3.2965 | 3.2965 | 2.2299 | 3.4412 | 2.8160 | 3.2965 | 2.6356 |
| 2.6356 | 2.6356 | 2.2299 | 3.1449 | 2.8160 | 2.6356 | 2.6356 |
| | 2.8160 | 3.1449 | 3.2965 | 3.2965 | 3.1449 | 3.4412 |
| 8.0000 | | 3.1449 | 2.9851 | 2.9851 | 2.8160 | 3.1449 |
| 10.0000 | 10.0000 | | 3.5797 | 2.6356 | 3.1449 | 1.9956 |
| 11.0000 | 9.0000 | 13.0000 | | 3.5797 | 2.9851 | 3.8410 |
| 11.0000 | 9.0000 | | 13.0000 | | 3.2965 | 2.9851 |
| 10.0000 | 8.0000 | 10.0000 | 9.0000 | 11.0000 | | 3.4412 |
| 12.0000 | 10.0000 | 4.0000 | 15.0000 | 9.0000 | 12.0000 | |

A partir dos dados desta tabela pode-se concluir que a variabilidade genética entre as populações estudadas é muito baixa (0,42%). Por outro lado, quando avaliamos a diversidade genética dentro das localidades isoladamente, verifica-se que ela é extremamente alta (99,58%). De certa forma, esses resultados corroboram aqueles obtidos nas análises de polimorfismo de DNA e distribuição de haplótipos, discutidos anteriormente, e que a alta variabilidade genética encontrada dentro de cada localidade seja possivelmente atribuída ao grande fluxo gênico determinado pela panmixia.

O grau de diferenciação genética entre as subpopulações, pode ser mensurado utilizando o índice de fixação ou endogamia (F_{ST}) de Wright, (1931), que varia de 0 a 1, e foi definido como sendo a redução do número de heterozigotos esperados em cruzamentos ao acaso entre os indivíduos. Assim, valores de F_{ST} entre 0 e 0,05 indicam baixa diferenciação genética, entre 0,05 e 0,15 é diferenciação moderada, entre 0,15 e 0,25 existe grande diferenciação, e acima de 0,25 a diferenciação é muito alta (WRIGHT, 1931).

Neste estudo, os resultados mostram que não há diferenciação genética significativa entre as populações estudadas, provenientes do baixo rio Branco e do rio Anauá (F_{ST} **0,00419**) (tabela 6).

Resultados também relativamente baixos de F_{ST} foram encontrados em estudos realizados por Batista (2001) em 03 localidades, constituídas de 15 indivíduos cada, com douradas provenientes das cidades de Belém, Manaus e Tabatinga/Letícia. Foi verificado neste estudo que os índices estimados de F_{ST} foram, respectivamente, 0,10 e 0,09, quando comparou-se as populações Belém-Manaus e Belém-Letícia, indicando que essas populações tem grau de diferenciação moderada (Batista, 2001).

Quando se analisam as localidades estudadas em Roraima isoladamente, verifica-se que o valor de F_{ST} é alto na população do rio Anauá (0,02115) e muito baixo na população do baixo rio Branco (0,00431) (figura 12).

Este índice relativamente alto quando comparado com a população estudada do rio Branco (38 indivíduos), possivelmente se deve ao pequeno número de indivíduos amostrados no Anauá (16 indivíduos).

Tabela 6. Análise molecular de variância genética entre e dentro das populações do baixo rio Branco e Anauá.

| Fonte de variação | Grau de liberdade | Soma dos quadrados | Coefficiente de Variação | Porcentagem de variação |
|---|-------------------|--------------------|--------------------------|-------------------------|
| Entre populações | 1 | 4,042 | 0,01554 | 0,42 |
| Dentro da população | 52 | 192,013 | 3,69256 | 99,58 |
| Total | 53 | 196,056 | 3,70810 | |
| Índice de fixação (F_{ST}): 0,00419 | | | | |

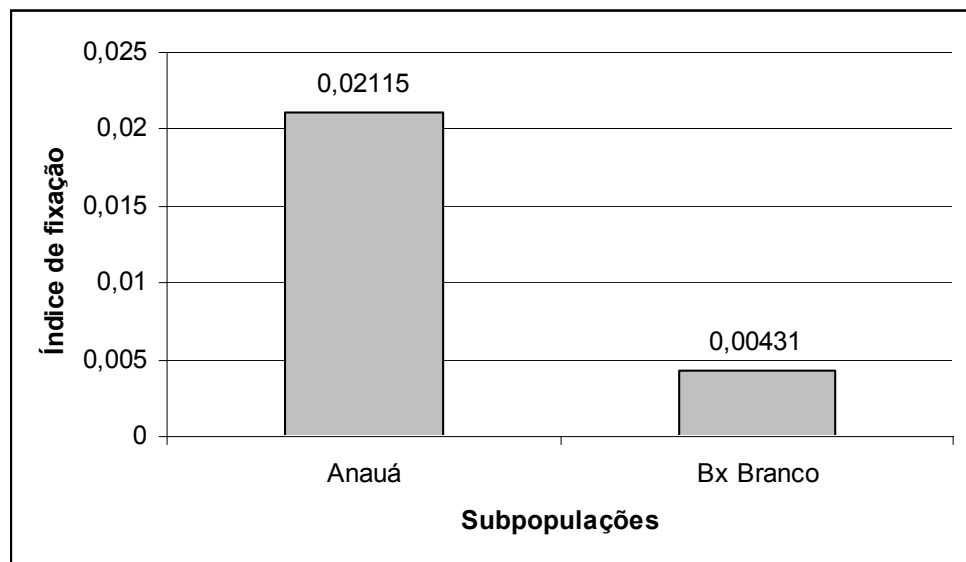


Figura 12. Índice de fixação (F_{ST}) encontrado nas populações estudadas na bacia do rio Branco.

4.7 Comparação da variabilidade genética das douradas da bacia do rio Branco, rio Madeira e da calha do Solimões/Amazonas.

A comparação da variabilidade genética entre as douradas coletadas na bacia do rio Branco (RR), Belém (PA), Rio Madeira (RO) e Tabatinga (AM) encontram-se na tabela 7. Os resultados são semelhantes àqueles discutidos para as populações dos rios Anauá e Branco. Aqui a porcentagem de variabilidade genética entre as populações também é baixa (1,02%) e a variabilidade genética dentro das populações é alta (98,98%), ou seja, praticamente não existe diferenciação entre as localidades comparadas. Esses dados também são corroborados pelo baixo índice de fixação encontrado ($F_{ST} = 0,01025$) o que indica que a dourada oriunda

das localidades amostradas fazem parte de um mesmo estoque, corroborando Batista (2001), para as douradas de Belém e Tabatinga, e Vogt (2004) para douradas provenientes do rio Madeira, que haviam sugerido que esses indivíduos constituem uma mesma população, distribuída em toda a bacia Amazônica.

Assim como os resultados encontrados na bacia do rio Branco, os índices de fixação encontrados por esses autores para a dourada naquelas localidades também foram baixos (Belém $F_{st} = 0,0099$, Tabatinga $F_{st} = 0,0169$) e rio Madeira $F_{st} = 0,00710$). Indicando que não há diferenciação genética entre os indivíduos, e que estes provavelmente pertencem a uma mesma população ou a um mesmo “pool” gênico (figura 13).

Tabela 7. Análise molecular de variância entre as populações da Bacia do rio Branco, Belém, Tabatinga e Rio Madeira.

| Fonte de variação | Grau de liberdade | Soma dos quadrados | Coefficiente de variação | Porcentagem de variação |
|---|-------------------|--------------------|--------------------------|-------------------------|
| Entre populações | 3 | 13,551 | 0,03845 | 1,02 |
| Dentro da população | 95 | 352,722 | 3,71287 | 98,98 |
| Total | 98 | 366,273 | 3,75132 | |
| Índice de fixação (F_{ST}): 0,01025 | | | | |

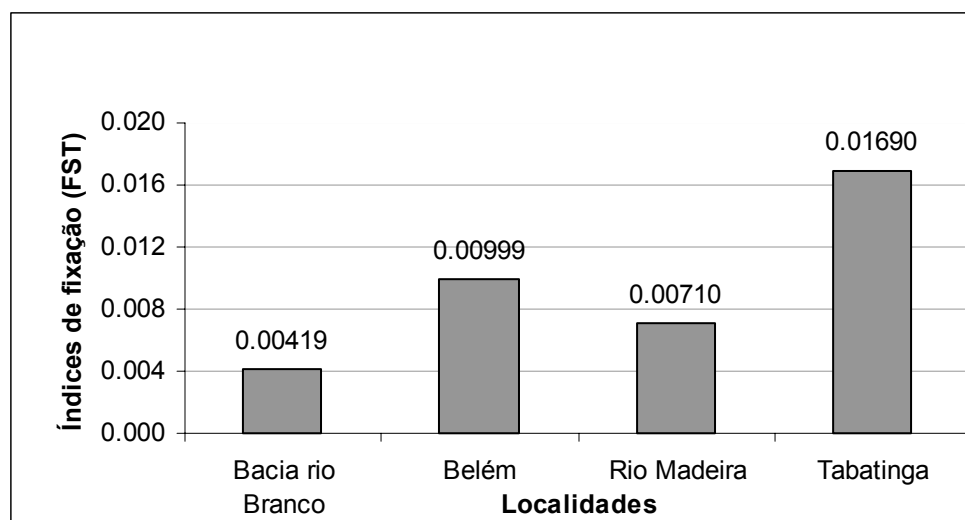


Figura 13. Comparação dos índices de fixação (F_{ST}) encontrados na bacia do rio Branco, com os índices encontrados por Batista (2001) para as localidades de Tabatinga e Belém e o resultado encontrado por Vogt (2004) para dourada do rio Madeira.

5 CONCLUSÕES

A partir das análises realizadas, podemos concluir que:

- Não há diferenciação genética significativa entre os indivíduos de dourada provenientes do rio Branco e do rio Anauá;
- Existe um grande fluxo gênico entre as localidades amostradas;
- Não há diferenciação genética significativa entre os indivíduos estudados na bacia do rio Branco e os indivíduos estudados em Belém, Tabatinga e no rio Madeira indicando que a dourada possa compor uma única população panmítica distribuída nos grandes tributários e no eixo Amazonas/Solimões incluindo a bacia do rio Branco.

REFERÊNCIAS

ALBERTS, B.; BRAY, D.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. **Fundamentos de Biologia celular: uma introdução à biologia molecular da célula**. Porto Alegre: Artmed, 1999.

ALLENDORF, F. W.; RYMAN, N.; UTTER, F. M. Genetics and Fishery Management: Past, Present and Future. In: Ryman, N.; Utter, F. (Org.), **Population, Genetics & Fishery Management**. Seattle: University of Washington Press, 1987.p. 89-107.

ALONSO, J. C. **Padrão espaço temporal da estrutura populacional e estado atual da exploração pesqueira da dourada *Brachyplatystoma flavicans*,Castelnau,1855 (Siluriformes, Pimelodidae) no sistema estuário- Amazonas-Solimões**. Manaus, 2002. 216 p. Tese (Doutorado em Biologia de água doce e pesca interior)- Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia/Universidade Federal do Amazonas.

ALVES-GOMES, J. A.; ORTÍ, G.; HAYGOOD, M.; HEILIGENBERG, W.; MEYER, A. Phylogenetic analysis of the South American electric fishes (Order Gymnotiformes) and the evolution of their electrogenic system: a synthesis based on morphology, electrophysiology, and mitochondrial sequence data. **Mol. Biol. Evol.** n.2, p.298-318, 1995.

ALVES-GOMES, J. A. Informações preliminares sobre a bio-ecologia de peixes elétricos (Ordem Gymnotiformes) em Roraima In: BARBOSA, R. I.; FERREIRA. E. J. G.; CASTELLÓN, E. (Org). **Homem, Ambiente e Ecologia no Estado de Roraima**. Manaus: INPA, 1997. p.509-553.

AVISE, J. C.; ARNOLD, J.; BALL, R. M. Jr.; BERMINGHAM, E.; LAMB,T.; NEIGEL, J. E.; REEB, C.; SAUNDERS, N. C. Intraespecific phylogeography: The mitochondrial DNA bridge between population genetics and sistematics. **Ecol Syst.** n.18, p. 489-522. 1984.

AVISE, J. C.; NEIGEL, J. E.; ARNOLD, J. Demographic influences on mitochondrial DNA lineage survivorship in animal populations. **J. Mol.** v. 20, p. 99 -105. 1984.

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

BARBOSA, R. I. Distribuição das chuvas em Roraima. In: BARBOSA, R. I.; FERREIRA, E. J. G.; CASTELLÓN, E. (Org.), **Homem, Ambiente e Ecologia no Estado de Roraima**. Manaus: INPA, 1997. p. 325-334.

BARBOSA R.I.; XAUD, H.A. M.; COSTA E SOUZA, J.M. Savanas de Roraima: Referencial geográfico e histórico. In: BARBOSA, R. I.; XAUD, H. A. M.; COSTA E SOUZA, J. M. (Org.), **Savanas de Roraima-Etnoecologia, Biodiversidade e Potencialidades Agrossilvipastoris**. Boa Vista: FEMACT, 2005. p.11-19.

BARTHEM, R. B.; GOULDING, M. **Os bagres balizadores: ecologia, migração e conservação de peixes amazônicos**. Brasília: Sociedade civil Mamirauá, CNPq, 1997.

BARTHEM, R. B. O desembarque na região de Belém e a pesca na foz amazônica. In: Ruffino, M. L. (Ed.). **A pesca e os recursos pesqueiros na Amazônia Brasileira**. Manaus: IBAMA/ProVárzea, 2004.

BATISTA, J. S. **Estimativa da variabilidade intraespecífica da dourada (*Brachyplatystoma flavicans*) (Castelnu,1855) no eixo estuário-Amazonas-Solimões**. Manaus, 2001. 116 f. Dissertação (Mestrado em Biologia de Água Doce e Pesca Interior)-Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia/Universidade Federal do Amazonas.

BEAUMONT, A. R.; HOARE, K. Biotechnology and Genetics. **Fisheries and Aquaculture**. Oxford: lackwell Science, 2003.

BROWN, W. M.; GEORGE, M. Jr. Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. **Proc. Natl. acad. Sci.** n.76, p. 1967-1971. 1979.

BROWN, W. M.; GADALEDA, G.; PEPE G.; SACCONI, C. ; SBIZA, E. Structural conservation and variation in the D-loop containing region of vertebrate mitochondrial DNA. **J. Molecular Biol.**, n. 192, p.503-511. 1986.

BROWN, J. R.; BECKENBACK, A. T.; SMITH, M. J. Intraespecific DNA sequence variation of the mitochondrial control region of White Sturgeon (*Acipenser transmontanus*). **Mol. Biol. Evol.** n 10, p. 326 -341. 1993.

CACEX- Carteira de Comércio Exterior . **Principais produtos exportados pelo Estado do Pará.** Belém: SEFAZ, 1980.

CLEMENT M.; POSADA, D.; CRANDALL K. TCS: a computer program to estimate gene genealogies. **Molecular Ecology.** n.10, p.1657-1660, 2000.

CHAO, N. L. Fisheries, Diversity and Conservation of ornamental fish of Rio Negro basin, Brazil - A review of project Piaba (1989-1999). In: Chao, N. L.; Petry, P.; Prang, G.; Sonneschien, L.; Tlusty, M.(Org.),**Conservation and Management of Ornamental Fish resources of the Rio Negro Basin, Amazônia.** Manaus: UFAM, 2001.p. 161-204.

COOPER, G. M. **A Célula: uma abordagem molecular.** São Paulo: Artmed, 2001.

DERGAM, J. A.; PAIVA, S.R.; SCHAEFFER, C. E.; GODINHO, A. L. e VIEIRA, F. Phylogeography and RAPD variation in *Hoplias malabaricus* (Bloch, 1794) (Pisces,Teleostei) in southeastern Brazil. **Genet. Mol. Biol.** n 25, p.379-387. 2002.

FABRÉ, N. N.; DONATO, J. C.; ALONSO, J. C. **Bagres de la Amazonia Colombiana: Um Recurso sin Fronteiras.** Bogotá: Instituto Amazónico de Investigaciones Científicas. 2000.

FERREIRA, E. J. G.; SANTOS, G. M.; JEGU, M. Aspectos ecológicos da ictiofauna do rio Mucajá, na área do Paredão, Roraima, Brasil. **Amazoniana**, n.3 p. 339-352. 1988.

FORMIGA-AQUINO, K. **Variabilidade genética da Piramutaba-*Brachyplatystoma vaillantii* (Valenciennes,1840) (Siluriformes: Pimelodidae) no sistema estuário-Amazonas-Solimões.** Manaus, 2003. 75f. Dissertação (Mestrado em Biologia de água doce e pesca interior)- Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia/Universidade Federal do Amazonas.

FREITAS, L. A. S. **Geografia e História de Roraima.** Manaus: Grafima, 1996.

GARCIA, M. **Aspectos ecológicos dos peixes das águas abertas de um lago no Arquipélago das anavilhanas, Rio Negro, AM.** Manaus, 1995. 102f. Dissertação (Mestrado em Biologia de água doce e pesca interior)-Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia/Universidade Federal do Amazonas.

GAULDIE, R. W. Taking stock of genetic concepts in fisheries management. **Fish Aquat. Sci.** n.48, p.722-731.1991.

GLEESON, D. M.; HOWITT, R. L. J.; LING, N. Genetic variation, population structure and cryptic species within the black mudfish (*neochanna diversus*) an endemic galaxiid from New Zealand. **Molecular Ecology.** n. 8, p 47-57. 1999.

GOULDING, M.; BARTHEM, R. B.; FERREIRA, E. J. G. **The Smithsonian Atlas of the Amazon.** Hong Kong: Princeton Editorial Associates, 2003.

HEMMING, J; RATTER, J. **Maracá.** London: McMillan, 1993.

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. **Estatística pesqueira oficial.** Disponível em <<http://www.mma.gov.br>> acesso em: 23 jun. 2006.

KIMURA, M.; MARUYAMA, T. Pattern of neutral polymorphism in a geographically structured population. **Genet. Res.** n. 1, p. 123-131.1971.

LEITE, R. A. N. **Efeitos da usina hidrelétrica de Tucuruí sobre a composição da ictiofauna das pescarias experimentais com malhadeiras realizadas no baixo rio Tocantins (Pará)**. Manaus, 1993.101f. Dissertação (Mestrado em Biologia de Água Doce e Pesca Interior)- Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia/Universidade Federal do Amazonas.

LEMOS, C. E. F.; SOUZA, R. M. S.; SCARTAZZINI, L. S. Caracterização da bacia do rio Cauamé, Estado de Roraima-Brasil. In: ABRH. Manaus: ABRH, 2003. 1 CD-ROM.

LOWE-McCONNELL, R. H. The fishes of the Rupununi Savanna district of British Guiana, South America. Part 1. Ecological groupings of fish species and effects of the seasonal cycle on the fish. *J. Linn. Soc. (Zool.)*, n. 304, p 103-142, 1963.

LOWE-McCONNELL, R. H. **Estudos ecológicos de comunidades de peixes tropicais**. São Paulo: Edusp, 1999.

LUNDBERG, J.; LITTMANN, M. W. Family Pimelodidae: Long-Whiskered catfishes. In: Reis; Kulander; Ferraris, C.J. (orgs). **Check list of the freshwater fishes oh south and central America**. Porto Alegre: Edipucrs, 2003.

LUNDBERG, J. G., AKAMA, A. Uma nova espécie de *Brachyplatystoma* e uma reclassificação das espécies do gênero. In: ENCONTRO BRASILEIRO DE ICTIOLOGIA 16, 2005, João Pessoa. **Anais do Encontro Brasileiro de Ictiologia**. João Pessoa:UFPB, 2005.640p. p.165-166.

MARTINS, C., WASKO, A. P., OLIVEIRA, C.; FORESTI, F. Mitochondrial DNA variation in wild populations of *Leporinus elongatus* from the Paraná River basin. **Genetics and Molecular Biology**. n.26, p. 33–38. 2003.

MELLO-COUTINHO, A. F. **O mercado de pescado na cidade de Boa Vista, Estado de Roraima, no período de junho a agosto de 1997**. Boa Vista, 1997. 72f. Monografia de graduação (Bacharelado em Ciências Biológicas)- Universidade Federal de Roraima.

MEYER, A.; KOCHER, T. D.; BASASIBWAKI, P.; WILSON, A. C. Monophyletic origin of lake Victoria cichlid fishes suggested by mitochondrial DNA sequences. **Nature**. n.347, p.550-553. 1990.

MEYER, A. DNA technology and phylogeny of fish: molecular phylogenetics studies of fish. **Genetic and evolution of aquatic organisms**. London: Chapman & Hall, 1993.

MEYER, D.; DORNELAS, M. C.; VIEIRA, M. L. Série monográfica nº 3. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética. **Revista Brasileira de Genética**. n. 23, p.210-212. 1996.

NORMAN, J. A.; MORITZ, C.; LIMPUS, C. J. Mitochondrial DNA control region polymorphisms: genetic markers for ecological studies of marine turtles. **Molecular Ecology**.n.12, p. 363-373. 1994

PORTO J. I. R.; **Análises cariotípicas e seqüenciamento de mtDNA de populações de *Mylesinus paraschomburgkii* (Characiformes, Serrasalminidae) da bacia Amazônica**. Manaus, 1999. 120f. Tese (Doutorado em Biologia de água doce e pesca interior)- Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia/Universidade Federal do Amazonas.

PROVÁRZEA. **A vida da piramutaba e da dourada**. Brasília: IBAMA, 2005.

ROZAS, J.; ROZAS, R. DnaSp version 3: an integrated program for molecular population genetics and molecular evolution analysis. **Bioinformatics**. n.15, p.175-178. 1999.

RUFFINO, M. L.; BARTHEM, R. B. Perspectivas do manejo dos bagres migradores na Amazônia. **Recursos pesqueiros do médio Amazonas. Biologia e estatísticas pesqueiras**. Brasília: IBAMA, 2000.

RUFFINO, M. L. (Coord.) **A pesca e os recursos pesqueiros na Amazônia brasileira**. Manaus: IBAMA/Provárzea. 2004.

SATO, S.; ANDO, J.; ANDO, H.; URAWA, S.; URANO, A.; ABE, S. Genetic Variation among Japanese Populations of Chum Salmon Inferred from the Nucleotide Sequences of the Mitochondrial DNA Control Region. **Zoological Science**. n.18, p. 99 – 106. 2001.

SANTOS, M. C. F. **Estimativa da variabilidade genética intra e interpopulacional de tambaqui (*Colossoma macropomum*, Cuvier,1818) da bacia Amazônica**. São Paulo, 2004. 65f. Dissertação (Mestrado em Biologia de Água Doce)- Universidade Federal de São Carlos.

SCHNEIDER, S.; ROESSLI, D.; EXCOFFIER, L. Arlequin Version 2005: A software for population genetic data analysis. **Genetics and biometry**. Geneve, 2005.

SEBRAE. **Estudo de mercado: Peixe**. Boa Vista: SEBRAE (RR), 1996.

SEBRAE. **Diagnóstico, estudo e pesquisa de mercado sobre o setor piscícola em Rorainópolis**. Boa Vista: SEBRAE (RR), 2002.

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

SUPERINTENDÊNCIA PARA O DESENVOLVIMENTO DA PESCA. **Relatório da segunda reunião do grupo de trabalho e treinamento (GTT) sobre avaliação de estoques**. Tamandaré- PE: SUDEPE. 439 p. 1985.

SWOFFORD, D. L. **PAUP: Phylogenetic Analysis using parsimony, version 4.0**. Sunderland: Sinauer Associates, 2002.

TZENG, C. S.; HUI, C. F.; SHEN, S. C.; HUANG, P. C. The complete nucleotide sequence of *crossostoma lacustre* mitochondrial genome: Conservation and variation among vertebrates. **Nucleic acids research**. n. 20, p. 4853-4858. 1992.

VOGT, N. A. B. **Estimativa da variabilidade intraespecífica da dourada (*Brachyplatystoma rousseauxii*) Pimelodidae-Siluriformes, no rio madeira-Ro.** Manaus, 2004, 22f. Relatório. (Programa de Iniciação Científica)- Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia/CNPq.

WHITLOCK, M. C.; MACCAULEY, D. E. Indirect measures of gene flow and migration. **Heredity**. n. 82, p.117-125. 1999.

WINNEMILLER, K. O. Patterns of variation in life history among South American fishes in seasonal environments. **Oecologia**. n. 81, p. 225-241. 1989.

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

WRIGHT, S. Evolution in Mendelian populations. **Genetics**. n.16, p.97-159. 1931.

ZUANON, J. A. **Aspectos da biologia, ecologia e pesca de grandes bagres (Pisces, Siluriformes, Siluroidei) na área da Ilha da Marchantaria – Rio Solimões, AM.** Manaus, 1990. 186f. Dissertação. (Mestrado em Biologia de Água Doce e Pesca Interior)- Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia/Universidade Federal do Amazonas.

