

INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA, CONSERVAÇÃO E BIOLOGIA
EVOLUTIVA

ESTRUTURAÇÃO E DINÂMICA POPULACIONAL DE *Pellona castelnaeana*,
VALENCIENNES, 1847, E EVIDÊNCIAS DE UNIDADES EVOLUTIVAS EM *Pellona*
flavipinnis (VALENCIENNES, 1837) NA BACIA AMAZÔNICA

ALINE MOURÃO XIMENES

Manaus, Amazonas
Novembro de 2014

ALINE MOURÃO XIMENES

ESTRUTURAÇÃO E DINÂMICA POPULACIONAL DE *Pellona castelnaeana*,
VALENCIENNES, 1847, E EVIDÊNCIAS DE UNIDADES EVOLUTIVAS EM *Pellona*
flavipinnis (VALENCIENNES, 1837) NA BACIA AMAZÔNICA

ORIENTADORA: DRA. IZENI PIRES FARIAS

CO-ORIENTADOR: DR. EMIL JOSÉ HERNÁNDEZ RUZ

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

Manaus, Amazonas
Novembro de 2014

FICHA CATALOGRÁFICA

CDD 597.092

X4 Ximenes, Aline Mourão

Estruturação e dinâmica populacional de *Pellona castelnaeana*, valenciennes, 1847, e evidências de unidades evolutivas em *Pellona* / Aline Mourão Ximenes. --- Manaus: [s.n.], 2014.

xii, 86 f. : il. color.

Dissertação (Mestrado) --- INPA/UFAM, Manaus, 2014.

Orientador : Izeni Pires Farias.

Coorientador : Emil José Hernández Ruz.

Área de concentração : Genética, Conservação e Biologia Evolutiva.

Sinopse:

Foram caracterizados locos de microssatélites para estudo de genética de população em *Pellona*. Utilizou-se esses microssatélites e região *D-loop* para o estudo de dinâmica populacional e estrutura genética de *Pellona castelnaeana*, os resultados a partir da região *D-loop* indicaram que esta forma uma população panmítica na bacia Amazônica e os resultados a partir dos microssatélites mostraram um padrão de estruturação em megaregiões, ambos microssatélites e região *D-loop* foram concordantes em indicar que as corredeiras do alto rio Madeira atuaram restringindo o fluxo gênico em *P. castelnaeana*. Investigação genética a partir das sequências do DNAm das regiões COI e *D-loop* e os marcadores microssatélites indicaram que a espécie *Pellona flavipinnis* formam unidades reprodutivas geneticamente diferenciadas sugerindo um modelo de sub-estruturação populacional.

Palavras chaves: DNA mitocondrial, Microssatélites, Fluxo gênico, estruturação.

Dedico à minha mãe e meus irmãos que me apoiaram, incentivaram e me ajudaram em todos os momentos.

Com o tempo você aprende que
pode ir muito mais longe depois
de pensar que não se pode mais...

William Shakespeare

AGRADECIMENTOS

À Deus pai e meu protetor...pela força, coragem, sabedoria e perseverança. Ajudando-me a realizar mais este sonho e por estar ao meu lado durante toda minha vida.

Aos meus familiares, meus pilares...

À minha mãe por ter sempre acreditado em mim, me ajudando em tudo que eu precisei tanto com palavras de incentivo, força e financeiramente. Pela compreensão entendendo todas as dificuldades durante o mestrado, a minha ausência, aceitando e apoiando minha decisão de estudar longe de casa...

As minhas irmãs Jaiane e Tatiane que foram mães pra mim durante esses quase dois anos e meios, pelo acolhimento, preocupação, carinho, incentivo..Os quebra galho de chegar em casa e muitas vezes a comida já está separada no prato, roupas lavadas...Aos meus sobrinhos Eduardo e Sophia por me proporcionar momentos de alegria ao meio do stress do mestrado.

Aos meus irmãos Jaqueline, Raí e cunhado Rangel que mesmo longe torceram e se preocuparam comigo.

A eles com quem eu passei grande parte desse tempo...

À minha orientadora um exemplo de pessoa e pesquisadora prof Dra. Izeni Pires Farias pela dedicação, ensinamento, paciência e confiança deposita em mim.

Ao meu co-orientador prof Dr. Emil José Hernández Ruz pelo ensinamento que já vão quase quatro anos, mesmo longe se fez presente com cobranças, email e ligações.

À MSc, engenheira, amiga, irmã, Valéria Nogueira pelos ensinamentos, orientações, tempo dedicado, ajuda no laboratório, correção na escrita, companhia durante disciplinas e paciência em me aturar nesta jornada. Em muitos momentos foi como uma mãe e uma orientadora através de ensinamentos, conselhos, puxões de orelha... Fica meu muito obrigado pelas caronas e companhia durante os inúmeros fins de semana no laboratório.

Ao prof Dr Tomas Hrbek pelo auxílio com alguns programas e ajuda e paciência com os bancos de dados.

Ao MSc Mário Nunes pelo tempo dedicado, paciência e auxílio com os programas. Esteve disposto em todos os momentos que precisei de seu auxílio. Sua ajuda foi imprescindível nesta etapa.

Á Dra Walesca Gravena pelos ensinamentos, palavras de confiança, auxílio com os programas e preocupação.

Aos meus colegas do LEGAL Roberta Canton, Val, Wal, Mário, Júlia, Fabinho, Jennifer, Concy, Nicole, Maria Doris, Sandra, Ingrid, Ana Paula Melo, Gabriela, Juliana, Adriano, Renan, Guilherme, Emanuel, Sarah, Jéssica, Israela, Deyla, Wancley e Ana Paula Costa, em especial José instigador de perguntas e companheiro de fim de semana; Joice pela companhia durante os corujões, fim de semanas, correção da escrita e ajuda imprescindível com a formatação, Priscila ombro amigo durante os momentos mais difíceis, Zamora ajuda com análise de dados morfométricos, meu conterrâneo Elciomar ajuda com os mapas e minha irmã amiga companheira dês do pibic Erika Milena.

Aos MSc Natasha e Olavo pela colaboração com amostra de Coari.

Aos importantes contribuintes...

Dra Daniele Matoso, Dr. José Gomes e Dr. Carlos Edwar pelas contribuições com o plano durante a aula de qualificação.

Á Gilcilaine Ritter com ajuda na obtenção de algumas amostras.

Aos membros da banca de defesa Dr Carlos Scheneider, Dra Lúcia Py-Daniel e Dra M^a Conceição Santos pelas valiosas contribuições.

Aos professores, secretários e colegas de turma GCBEv 2012. Em especial a prof Dra Eliana Feldberg pelo incentivo em cursar o mestrado aqui, hoje eu sei que fiz a escolha certa.

Aos órgãos de fomento...

FINEP pelo financiamento do Projeto de Pesquisa

Capex Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, pela concessão de bolsa de estudo durante o mestrado.

FAPESPA pelo financiamento no desenvolvimento e caracterização dos marcadores microssatélites.

Ao Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Universidade Federal do Amazonas, Universidade Federal de Rondônia, Universidade Federal do Oeste do Pará e a Universidade Federal do Pará/Campus Altamira.

Ao IBAMA pela autorização para coleta e transporte do material biológico.

Á todos que de alguma forma contribuíram para a realização desse trabalho.

Á todas essas pessoas fica a minha eterna gratidão

RESUMO

A bacia Amazônica, um dos ecossistemas com maior diversidade do mundo, apresenta uma das mais diversas faunas de peixes. Dentro dessa grande diversidade ictiofaunística, os peixes do gênero *Pellona*, conhecidos comumente como “apapás, sardas ou sardinhões”, estão entre as poucas espécies da Ordem Clupeiformes com valor econômico reconhecido. Na bacia Amazônica *Pellona* está representado por duas espécies, *P. castelnaeana* Valenciennes, 1847 e *P. flavipinnis* (Valenciennes, 1837). Este trabalho teve como objetivos: (i) caracterizar locos de microssatélites para *Pellona castelnaeana*, e sua transferibilidade para *P. flavipinnis* (ii) estimar a variabilidade genética, estrutura e dinâmica populacional em *P. castelnaeana* e (iii) entender a distribuição da diversidade genética e investigar prováveis nova espécie em *P. flavipinnis*. Para atender ao objetivo (i) foram isolados e caracterizados 8 locos de microssatélites. A caracterização foi realizada com 9 a 19 indivíduos de *P. castelnaeana* provenientes de Santarém e 27 a 31 indivíduos de *P. flavipinnis* da cidade de Manaus. Para atender ao objetivo (ii) foram sequenciados 175 indivíduos para região controle e genotipados 119 indivíduos para 7 locos de microssatélites, provenientes de cinco localidades na calha do rio Amazonas, seis tributário e, uma localidade no rio Guaporé (sub-bacia Boliviana). Os resultados de *D-loop* para *P. castelnaeana* mostraram uma homogeneização ao longo da bacia Amazônica com uma subestruturação na sub-bacia Boliviana ($F_{st}=0,3172$). Os índices de diversidade mostraram-se altos, com diversidade gênica média de ($\hat{H}=0,8646$) e nucleotídica ($\pi=0,044236$). Os resultados da análise bayesiana a partir dos locos de microssatélites mostraram uma estruturação populacional, indicando que a área amostrada neste estudo pode ser dividida em quatro macroregiões, sendo três na bacia Amazônica e uma na sub-bacia Boliviana. Os valores de heterozigosidade esperada (H_E) e observada (H_O) variaram entre 0,42211 a 0,79681 e 0,23564 a 0,63561, respectivamente. Em ambos marcadores uni e biparentais os resultados indicaram que as corredeiras e cachoeiras do alto rio Madeira atuaram restringindo o fluxo gênico entre a bacia Amazônica e sub-bacia Boliviana. Para atender ao objetivo (iii) foram sequenciados 99 indivíduos para o gene COI, 114 indivíduos para região controle e genotipados 73 indivíduos para 7 locos de microssatélites. *P. flavipinnis* foi coletada em quatro localidades na calha, duas localidades a jusante e montante das corredeiras do alto rio Madeira e em cinco outros tributários do rio Amazonas. Os resultados para a espécie *P. flavipinnis* sugerem a existência de dois grupos co-ocorrendo (linhagens A e B) nas localidades de Tabatinga, baixo rio Madeira e Santarém, com uma maior diversidade dentro da linhagem B. A distância genética obtida a partir de sequências de COI entre essas duas linhagens foi de 2,3 %. A presença de duas linhagens foi confirmada pelas análises com os locos microssatélites que também sugerem a existência de dois grupos biológicos dentro desta espécie na bacia Amazônica. No entanto, a análise bayesiana a partir de sequências de *D-loop* mostrou a existência de três grupos biológicos dentro de *P. flavipinnis* evidenciando a linhagem A e os outros grupos sugeridos pela alta diversidade genética na linhagem B. Esses resultados mostram informações novas sobre a estrutura populacional dos apapás na bacia Amazônica e, podem contribuir para planos de manejo e conservação dessas espécies.

Palavras chaves: DNA mitocondrial, Microssatélites, Genética de populações, Fluxo gênico, Estruturação.

ABSTRACT

The Amazon basin has one of the largest and most complex ecosystems in the world, and harbors the highest diversity of freshwater fishes. Within this ichthyofauna, the fishes of the genus *Pellona*, commonly known as the “Amazon pellona”, are among the few clupeiform species with a recognized economic value. The genus has two representatives in the Amazon basin: *P. castelnaeana* Valenciennes, 1847 and *P. flavipinnis* (Valenciennes, 1837). The aims of this study were: (i) to characterize microsatellite loci of *Pellona castelnaeana*, and their transferability to *P. flavipinnis*; (ii) to evaluate the genetic variability and population structure in *P. castelnaeana* and (iii) to understand the distribution of the genetic diversity in *P. flavipinnis*. To reach aim (i), we isolated and characterized 8 microsatellite loci. The characterization was realized with 9 to 19 individuals of *P. castelnaeana* from Santarém, and 27 to 31 individuals of *P. flavipinnis* from Manaus. To achieve aim (ii), we sequenced 175 individuals for the mitochondrial DNA control region and genotyped 119 individuals for 7 microsatellite loci. Individuals were sampled from five localities in the mainstream of the Amazon River, six tributaries of the Amazon river and one locality in the Guapore river (Bolivian subbasin). The control region results for *P. castelnaeana* showed lack for population structuring within the Amazon basin, but a signal of substructure when compared with the Bolivian subbasin ($F_{st}=0.3172$). The diversity index was high, with mean gene and nucleotide diversity of ($\hat{H}=0.8646$) and ($\pi=0.044236$), respectively. Analyses of the microsatellite data in the program Structure showed a population structure, indicating that the sampling area in this study could be divided in four macro regions: three in the Amazon basin and one in the Bolivian subbasin. The expected (H_E) and observed (H_O) heterozygosity value ranged among 0.42211 to 0.79681 and 0.23564 to 0.63561, respectively. Markers in both single and two parent results indicated that the rapids and waterfalls of the upper Rio Madeira acted restringendo gene flow between the Amazon basin and sub-basin Boliviana. To achieve aim (iii), the COI gene was sequenced in 99 individuals, the control region was sequenced in 114 individuals and 7 microsatellite loci were genotyped in 73 individuals of *P. flavipinnis*. *Pellona flavipinnis* was collected in four localities in the mainstream of the Amazon basin, in two localities downstream and upstream of the Madeira river rapids and in five other tributaries of the Amazon river. The results suggested the existence of two co-occurring groups (lineages A and B) in the localities of Tabatinga, lower Madeira river and Santarem. The genetic distance obtained from the COI sequences between these two lineages was 2.3%, and lineage B showed larger diversity. The presence of two lineages was confirmed by the analysis with the microsatellite loci, that also suggest the existence of two biological groups in this species. A BAPS analysis of control region sequences showed the existence of three biological groups of *P. flavipinnis*, one confirming the A lineage and two within the B lineage. This study presents new data on the population structure of the Amazon pellona in the Amazon basin, and can contribute to management and conservation planning.

Keywords: DNA mitochondrial, microsatellite loci, population genetics, gene flow, structure.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	xii
LISTA DE TABELAS	xiv
1. INTRODUÇÃO GERAL	15
1.1 Bacia Amazônica	15
1.2 Aspectos gerais dos Clupeiformes	16
1.3 <i>Pellona castelnaeana</i> Valenciennes, 1847	17
1.4 <i>Pellona flavipinis</i> (Valenciennes 1837)	19
1.5 DNA mitocondrial	21
1.5.1 Região controle do DNAm.....	22
1.5.2 Gene Citocromo Oxidase I- COI.....	22
1.6 Marcadores Microsatélites	24
1.7 Padrões populacionais encontrados em Peixes	25
Capítulo I	26
Caracterização de marcadores microsatélites para apapá amarelo <i>Pellona castelnaeana</i> (Clupeiformes: Pristigasteridae)	26
ABSTRACT	27
RESUMO	27
1. INTRODUÇÃO	27
2. MATERIAL E MÉTODOS	28
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	29
Capítulo II	32
Estrutura genética e dinâmica populacional do apapá amarelo (<i>Pellona castelnaeana</i>, Pristigasteridae) na bacia Amazônica	32
RESUMO	32
1. INTRODUÇÃO	33
2.1 Amostras populacionais e suas localidades	34
2.2 Extração de DNA	35
2.3 Amplificação e purificação da região controle do DNA mitocondrial	35
2.4 Sequenciamento da região controle do DNA mitocondrial	36
3.5 Alinhamento e edição das sequências.....	36
2.6 Reação de genotipagem	36

2.7 Análises populacionais	37
2.7.1 Região Controle do DNA mitocondrial	37
2.7.2 Marcadores Microsatélites	38
3. RESULTADOS	38
3.1 Região controle do DNA mitocondrial	38
3.2 Marcadores Microsatélites	44
4. DISCUSSÃO	49
4.1 Diversidade Genética	49
4.2 Estrutura populacional	52
5. CONCLUSÃO	55
Capítulo III	56
Evidências de duas Unidades Significantes Evolutivas em apapá branco (<i>Pellona flavipinnis</i>; Pristigasteridae) na bacia Amazônica	56
RESUMO	56
1. INTRODUÇÃO	57
2. MATERIAL E MÉTODOS	59
2.1 Amostras populacionais e suas localidades	59
2.2 Extração de DNA	60
2.3 Amplificação e purificação da região controle e gene COI do DNA mitocondrial	60
2.4 Sequenciamento da região controle e do gene COI do DNA mitocondrial	61
2.5 Alinhamento e edição das sequências.....	62
2.6 Reação de genotipagem	62
2.7 Análises Genéticas	62
2.7.1 Região Controle e gene COI do DNA mitocondrial	62
2.7.2 Marcadores Microsatélites	63
2.8 Análise morfométrica: <i>P. flavipinnis</i> de Santarém como estudo de caso	64
3. RESULTADOS	64
3.1 Região controle e gene COI do DNA mitocondrial	64
3.2 Marcadores Microsatélites	70
Análise morfométrica: <i>P. flavipinnis</i> de Santarém como estudo de caso	71
4. DISCUSSÃO	72
5. CONCLUSÃO	75
6. REFERÊNCIAS GERAIS	76

LISTA DE FIGURAS

INTRODUÇÃO GERAL

Figura 1: Vista Lateral de <i>Pellona castelnaeana</i>	18
Figura 2: Caracteres merísticos do gênero <i>Pellona</i> , serras pós-ventrais (A) e rastros do arco branquial (B)	18
Figura 3: Distribuição geográfica de <i>Pellona castelnaeana</i>	19
Figura 4: Vista Lateral de <i>Pellona flavipinnis</i>	19
Figura 5: Distribuição geográfica de <i>Pellona flavipinnis</i>	20
Figura 6: Esquema do <i>Barcoding gap</i> , variação intra e interespecífica em vermelho e amarelo respectivamente. DNA barcoding gap (A). Sem gap com sobreposição da variação (B).	23

Capítulo II

Figura 1: Mapa geográfico com as localidades amostradas.	34
Figura 2: Estruturação populacional em <i>P. castelnaeana</i> a partir dos dados de DNAm, mostrando subestruturação no alto rio Madeira e homogeneidade nas demais localidades amostradas. As cores dispostas verticalmente, representam cada um dos 4 clusters. Cluster 1-verde, Cluster 2-amarelo, Cluster 3-azul, Cluster 4-vermelho.	42
Figura 3: Rede haplótipica mostrando compartilhamento de haplótipos entre os indivíduos da bacia Amazônica e uma subestruturação no alto rio Madeira.	42
Figura 4: Resultado do <i>structure</i> , indicando k=4, como a melhor probabilidade para explicar os dados. A vertical mostra a média da estimativa da distribuição das probabilidades dos dados e a horizontal número de clusters testados (k) e o desvio padrão (SD) da probabilidade média.	48
Figura 5: Estrutura populacional baseada em 7 locos de microssatélites de <i>Pellona castelnaeana</i> estimado pela análise bayesiana realizada pelo programa <i>Structure</i> . Onde cada indivíduo é representado por uma linha vertical e cada uma das cores indica um cluster baseado em semelhanças genotípicas. Os números de 1 a 7 representam as localidades de coleta: 1 Tabatinga, 2 Tefé, 3 Coari, 4 Baixo Madeira, 5 Alto Madeira, 6 Santarém e 7 Tucuruí.	48

Capítulo III

Figura 1: Mapa geográfico com as localidades amostradas.....	59
---	----

- Figura 2:** Árvore Neighbour-Joining da divergência nucleotídica das sequências de COI indicando a existência de duas linhagens distintas dentro de *P. flavipinnis*, usando o método Kimura-2-parâmetros com análise de *bootstrap* com 1000 réplicas. 65
- Figura 3:** Árvore Neighbour-joining da divergência nucleotídica das sequências de COI do gênero *Pellona*, usando o método Kimura-2-parâmetros com análise de *bootstrap* com 1000 réplicas. 66
- Figura 4:** Árvore máxima verossimilhança gerada a partir das sequências concatenadas (COI e DLOOP) mostrando a existência de duas linhagens e sub-estruturação entre uma delas dentro da espécie *P. flavipinnis*. 67
- Figura 5:** Análise bayesiana indicando a presença de três agrupamentos biológicos. As cores dispostas verticalmente representam cada um dos três agrupamentos. Linhagem A (Grupo 1 vermelho) e linhagem B (Grupo 2 verde e Grupo 3 azul). 68
- Figura 6:** Mostrando a existência de dois grupos biológicos baseados em 7 locos de microssatélites de *Pellona flavipinnis* estimado pela análise bayesiana realizada pelo programa *Structure*. Cada indivíduo é representado por uma linha vertical e cada uma das cores indica um *cluster* baseado em semelhanças genotípicas. 70
- Figura 7:** Resultado do *Structure*, indicando $k=2$, como a melhor probabilidade para explicar os dados. A vertical mostra a média da estimativa da distribuição das probabilidades dos dados e a horizontal número de clusters testados (k) e o desvio padrão (SD) da probabilidade média. 70
- Figura 8:** PC1 vs PC2 com resíduos (tamanho retirado)-grupos sobrepõem. 71
- Figura 9:** PC1 vs PC2 com tamanho incluído-dois grupos que não se sobrepõem. 71

LISTA DE TABELAS

Capítulo I

Tabela 1: Caracterização de oito <i>loci</i> de microsatélites em 9-19 indivíduos de <i>Pellona castelnaeana</i> do Município de Santarém.	30
Tabela 2: Amplificação heteróloga em <i>P. flavipinnis</i> de sete microsatélites desenvolvidos para <i>P. castelnaeana</i>	31

Capítulo II

Tabela 01: Localidades, rios e números de indivíduos coletados	35
Tabela 02: Parâmetros genéticos para <i>Pellona castelnaeana</i> (<i>D-loop</i>).	40
Tabela 03: Valores de Nm (diagonal acima) e Φ_{ST} (diagonal abaixo) obtidos com a região controle do DNAm.	43
Tabela 04: Valores médios dos índices de Heterozigosidade observada (H_O), Heterozigosidade esperada (H_E) e os Números de alelos.	45
Tabela 05: Índices de diversidade genética resultantes dos 7 locos microsatélites analisados para <i>Pellona castelnaeana</i> considerando, separadamente, os grupos de indivíduos por localidade de coleta.	45
Tabela 06: Índices de diversidade genética resultantes dos 7 locos microsatélites analisados para <i>Pellona castelnaeana</i> considerando as localidades de coletas..	47
Tabela 07: Valores de Nm (diagonal acima) e F_{ST} (diagonal abaixo) obtidos com Marcadores Microsatélites.	47
Tabela 08: Comparações de índices de variabilidade genética obtidos com uso de DNAm (<i>D-loop</i>) para a espécie em estudo e outros peixes amazônicos.....	50
Tabela 09: Comparações de índices de variabilidade genética obtidos com uso de Marcadores Microsatélites para a espécie em estudo e outros peixes amazônicos	51

Capítulo III

Tabela 01: Localidades, rios e números de indivíduos coletados.	60
Tabela 02: Distância genética média interespecífica e intraespecífica das espécies do gênero <i>Pellona</i>	65
Tabela 03: Parâmetros de diversidade genéticos para as linhagens de <i>Pellona flavipinnis</i> (<i>D-loop</i>).	69
Tabela 04: Parâmetros de diversidade genéticos para as linhagens de <i>Pellona flavipinnis</i> (COI).	69

1. INTRODUÇÃO GERAL

1.1 Bacia Amazônica

A diversidade de peixes neotropicais tem uma longa história temporal, alguns clados endêmicos se reportam ao cretáceo e outros ao fim do Mioceno. A formação andina forneceu novos habitats de planaltos e habitats lacustres, essa emergência promoveu a extensão da biota aquática neotropical (Lundberg *et al.*, 1998). O isolamento físico nestes habitats fluviais contribui para diferenciação das populações de peixes de água doce (Iervolino *et al.*, 2009) e provavelmente influenciou os processos de especiação da ictiofauna de água-doce, o que tem sido visto como um processo bastante complexo explicado por várias hipóteses (Hubert e Renno, 2006). O processo de formação da bacia Amazônica é complexo e data de cerca de 15 milhões de anos atrás com a elevação da Cordilheira dos Andes (Lundberg *et al.*, 1998) e, segundo Joly *et al.* (2011) essa elevação se iniciou há cerca de 23 milhões de anos. A formação gradual dos Andes criou grandes lagos, até que a nova drenagem, agora direcionada para o Atlântico, se configurou e gradativamente a bacia Amazônica tomou as feições atuais. A bacia Amazônica ou planície sedimentar situada na porção central é delimitada à Oeste pela Cordilheira dos Andes, à Norte pelos Escudos Cristalinos da Guiana, ao Sul pelos Escudos Cristalinos do Brasil Central e a leste desembocar suas águas no oceano Atlântico (Sioli, 1985; Goulding *et al.*, 2003a).

O número de espécies de peixes da bacia Amazônica ainda é incerto, sendo comum a descrição de novas espécies, mesmo sendo algumas delas já exploradas pela pesca comercial, e diversos grupos ainda carecem de uma revisão mais atualizada (Barthem e Fabré, 2004). Segundo Lundberg *et al.* (2000) aproximadamente 40% da fauna de peixes de água doce da bacia Amazônica é conhecida, e novas espécies estão sendo descritas constantemente. Estimativas mais recentes contabilizam em 13.000 o número de espécies de peixe de água doce (Eschmeyer, 2014). A bacia Amazônica é um dos ecossistemas com maior diversidade do mundo, abrangendo um terço da América do Sul (Goulding, 2003b).

A região amazônica é uma das quatro sub-regiões nas quais esta dividida a região Neotropical. A sub-região Amazônica se estende pelo Brasil, Guianas, Venezuela, Colômbia, Equador, Peru, Bolívia (Morrone, 2004). Análises biogeográficas têm revelado que as áreas de endemismo para peixes nas ecorregiões amazônicas não coincidem com os limites das grandes bacias, existindo significativa diferenciação entre as sub-bacias (Buckup, 2010).

A diversidade ictica da Amazônia é grande, e ainda apresenta vários grupos pouco estudados, entre eles estão às espécies da ordem Clupeiformes.

1.2 Aspectos gerais dos Clupeiformes

A ordem Clupeiformes é dividida em cinco famílias: Denticipitidae, Pristigasteridae, Engraulidae, Clupeidae e Chirocentridae (Li e Ortí, 2007, Lavoué *et al.*, 2010), possuindo 84 gêneros e 363 espécies, sendo este um grupo de importância no comércio mundial (Nelson, 2006). Essa ordem é caracterizada por possuir: boca voltada para cima, uma fileira de espinhos na região mediana do ventre e ausência de nadadeira adiposa (Santos *et al.*, 2006). Além desses caracteres, os peixes que compõem esta ordem possuem: raios moles, nadadeiras pélvicas abdominais, escamas ciclóides, bexiga natatória estendida para frente em dois ramos, escamas prateadas decíduas, com ventre comprimido em forma de quilha, geralmente com escamas especializadas, direcionadas para trás, chamadas escudos, serras ou carenas (Ferreira *et al.*, 1998). De acordo com Whitehead (1985), a diversidade em águas tropicais é elevada, entretanto a taxonomia é pouco estudada, o que pode tornar difícil sua identificação.

De acordo com Li e Ortí (2007), a família Pristigasteridae é monofilética e está relacionada com as famílias Clupeidae e Engraulidae. Para Di Dario (2002) a cartilagem gongilóide é uma evidência morfológica de que a família Pristigasteridae é relacionada com Engraulidae e formam um grupo irmão. Com base em genes mitocondriais 12S, 16S e Citocromo *b* Wilson *et al.* (2008) sugeriram monofiletismo para a superfamília Pristigasteroidea.

Pristigasteridae inclui sardinhas marinhas distribuídas nos oceanos tropicais e nas águas doces da América do Sul e sudeste da Ásia (Di Dario, 2002, Santos *et al.*, 2006), Atlântico, Índico e Pacífico (Nelson, 2006). As sardinhas da família Pristigasteridae distinguem-se externamente de outras sardinhas (Clupeidae), por possuir nadadeira anal longa, com pelo menos 30 raios (Santos *et al.*, 2006), nadadeira adiposa e linha lateral ausentes. A família inclui nove gêneros e 35 espécies marinhas e de águas salobras, a maioria em regiões costeiras de mares tropicais. Na Amazônia ocorrem três gêneros (*Ilisha*, *Pristigaster* e *Pellona*) e cinco espécies, todas de água doce e popularmente denominadas de sardinhas, sardinhões ou apapás (Santos *et al.*, 2004; Santos *et al.*, 2006). As cinco espécies de água doce são: *Ilisha amazonica* (Miranda Ribeiro 1920), *Pellona castelnaeana* Valenciennes 1847, *Pellona flavipinnis* (Valenciennes 1837), *Pristigaster cayana* Cuvier 1829 e *Pristigaster whitehead* Menezes e De Pinna 2000 (Whitehead, 1985; Severi e Verani, 2006). Para De Pinna e Di Dario (2003) o *status* taxonômico dos representantes desta família que ocorrem na América do Sul, tem sido objeto de pouco estudo e precisa ser reavaliado, para eles existem outras espécies não descritas de *Pellona* e, possivelmente em *Ilisha* na região neotropical.

O gênero *Pellona* Valenciennes, 1837 está incluso na subfamília Pelloninae (Nelson 2006). Este gênero caracteriza-se por apresentar corpo comprimido, quilhas ao longo do ventre, olhos razoavelmente grandes, mandíbula inferior projetada, boca direcionada para cima, mandíbula superior alcançando no máximo o centro do olho, dentes da mandíbula pequenos, arcos branquiais curtos e densos, nadadeira dorsal inserida no centro do corpo, presença de nadadeira pélvica pequena com seis ou sete raios, um pouco ou bem a frente da origem da nadadeira dorsal, nadadeira anal moderadamente longa com 34 a 43 raios. Estão distribuídos na América do sul na Argentina, Uruguai, Brasil, Venezuela, Guianas, Colômbia, Peru e Equador. O gênero inclui as espécies *Pellona castelnaeana* Valenciennes 1847, *Pellona flavipinnis* (Valenciennes 1837), *Pellona harroweri*, (Fowler 1917), *Pellona dayi* Wongratana 1983, e *Pellona ditchela* Valenciennes 1847 (Whitehead 1985).

Este trabalho focou nas duas espécies do gênero que ocorrem na Amazônia *Pellona castelnaeana* e *Pellona flavipinnis*, popularmente conhecidos como apapá amarelo e apapá branco, respectivamente. De acordo com Ikeziri *et al.* (2008), o apapá amarelo é uma das poucas espécies de Pristigasteridae com reconhecido valor comercial registrado nos mercados pesqueiros da Amazônia. Santos *et al.* (2006) sugeriram que a importância econômica do apapá amarelo gira em torno de 20% e do apapá branco varia de 5 a 20% dependendo da época, esses números correspondem ao comercializado em Manaus. Almeida (2006) citou que o apapá amarelo está entre as 30 espécies novas de peixes que foram introduzidas para comercialização pelos frigoríficos. Esses dados evidenciam que tais espécies fazem parte dos recursos pesqueiros da bacia Amazônica, e como tal necessitam ser estudadas sobre vários aspectos de sua biologia, ecologia e genética de suas populações, para que não venham a sofrer os efeitos de sobrepesca, como já acontece com algumas espécies de peixes na Amazônia.

1.3 *Pellona castelnaeana* Valenciennes, 1847

Os representantes desta espécie (Figura 1), segundo Santos (2006) possuem de 10 a 11 serras pós-ventrais entre a base da nadadeira pélvica e nadadeira anal, 11 a 13 rastros no ramo inferior do primeiro arco branquial (Figura 2), atingem mais de 60 cm de comprimento. Le Guennec e Loubens (2004) no seu trabalho realizado na bacia de Mamoré observaram o maior comprimento padrão para esta espécie de 61,5 cm.



Figura 1: Vista lateral de *Pellona castelnaeana*.

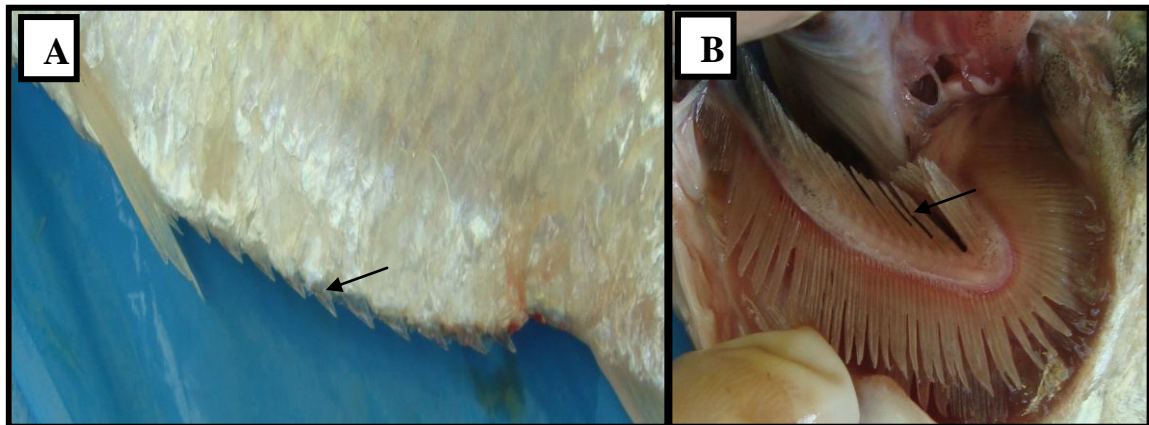


Figura 2: Caracteres merísticos do gênero *Pellona*, serras pós-ventrais (A) e rastros do arco branquial (B).

P. castelnaeana é considerada carnívora, se alimentando principalmente de peixes (Santos *et al.*, 2006). Segundo Santos *et al.* (2004), essa espécie, assim como outras de hábitos piscívoros reproduzem-se entre a seca (novembro) e a enchente (abril), com desova total e fecundação externa, porém, de acordo com Le Guennec e Loubens (2004), esta espécie desova o ano todo, existindo um pico ou a reprodução é intensificada no período de águas baixas. Os machos se reproduzem no início do segundo ano de vida e as fêmeas no fim deste mesmo ano. A espécie realiza migrações para fins reprodutivos (Le Guennec e Loubens, 2004; Ikeziri *et al.*, 2008). As águas brancas preferencialmente funcionam com área de desova, devido as chances de viabilidades das larvas neste tipo de água ser maior (Ikeziri *et al.*, 2008).

A distribuição do apapá amarelo segundo Whitehead (1985) ocorre no sistema Amazônico, como mostrado na drenagem em negrito da figura 3.



Figura 3: Distribuição geográfica de *Pellona castelnaeana*.

1.4 *Pellona flavipinnis* (Valenciennes 1837)

De acordo com Santos (2006), os representantes desta espécie possuem de 11 a 14 serras pós-ventrais entre a base da nadadeira pélvica e nadadeira anal, 25 a 29 rastos no ramo inferior do primeiro arco branquial, atingem cerca de 50 cm de comprimento padrão e coloração prateada esbranquiçada (Figura 4).



Figura 4: Vista Lateral de *Pellona flavipinnis*.

P. flavipinnis é considerado uma espécie carnívora, alimentando-se principalmente de peixes juvenis e insetos aquáticos, as presas são geralmente encontradas associadas às raízes

de macrófitas aquáticas submersas, sugerindo que os indivíduos de esta espécie são predadores visualmente orientados, que caçam próximo aos bancos de macrófitas, especialmente durante a noite e no início da manhã. A maior atividade alimentar desta espécie ocorre no período de águas altas, o que pode estar relacionado com uma maior disponibilidade de alimentos (Moreira-Hara *et al.*, 2009). É uma espécie de hábitos diurnos, pelágica, migradora, com desova total onde os ovócitos têm maturação sincrônica e são eliminados em lotes únicos (Araújo, 2009; Severi e Verani, 2006).

Segundo Whitehead (1985), essa espécie ocorre na América do Sul, na bacia Amazônica, bacia do rio Parnaíba, bacia do Orinoco (Venezuela e Colômbia), Argentina (rio Paraná e rio de la Plata) e Guianas (Suriname e Guiana) (Figura 5).

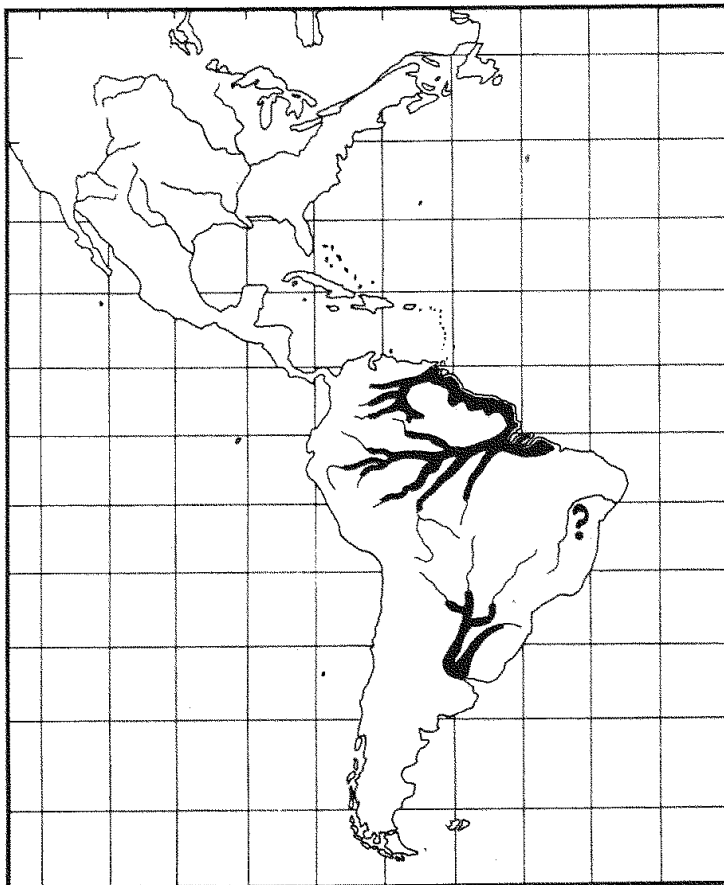


Figura 5: Distribuição geográfica de *Pellona flavipinnis*

Dentre os tributários do rio Amazonas, o rio Madeira é um dos maiores em termos de áreas de drenagens e descarga de água, com cerca de 3600 km de extensão e, contribui com aproximadamente 15% da descarga total do Atlântico. Entre o trecho de Guajará-Mirim e Porto Velho existem 16 corredeiras, das quais Jirau, Teotônio, Santo Antônio são as três que possuem queda mais acentuada e altos valores de velocidade da água (Goulding *et al.*, 2003).

Esse grande trecho de acidentes geográficos presente no rio Madeira impede totalmente a navegação ao longo do rio e restringe o fluxo gênico para alguns organismos aquáticos como os peixes do gênero *Prochilodus* e *Colossoma* (Machado, 2009; Faria *et al.* 2010). Com a construção das hidrelétricas Santo Antonio e Teotônio em duas das principais cachoeiras Jirau e Teotônio, respectivamente. Esses empreendimentos puseram um fim nas cachoeiras, no entanto, a concessionária Santo Antonio construiu um sistema de transposição de peixes para reproduzir as corredeiras originais, com objetivo dos peixes a manterem seu fluxo rio acima e permitindo assim a passagem pela usina (Queiroz *et al.*, 2013).

O uso de marcadores genéticos é importante para identificar populações de peixes, o que tem uma implicação direta no estabelecimento de políticas de conservação e manejo adequado da pesca (Iervolino *et al.*, 2009). Dentre os marcadores utilizados o DNAm é uma ferramenta molecular importante em estudos populacionais.

1.5 DNA mitocondrial

O genoma mitocondrial é uma molécula de DNA circular, fita dupla, pequena, extra cromossômica presente em múltiplas cópias na matriz interna da mitocôndria, estrutura de organização simples (Castro *et al.*, 1998; Boore, 1999; Brown, 2008; Klug *et al.*, 2010). Seu tamanho é relativamente estável para animais, em torno de 16-21 kilobases (kb) (Boore, 1999), não sofre recombinação, tem ritmo acelerado da evolução, e polimorfismo intraespecífico extenso (Neigel e Avise 1984; Avise, 1987; Ivankovic *et al.*, 2009; Matioli e Fernandes, 2012). Acredita-se que o polimorfismo do DNAm seja 10 vezes superior à de um gene de cópia única nuclear, isso pode ocorrer devido à alta exposição a radicais livres que podem ser gerados durante o processo de respiração, baixa eficiência do sistema de reparo na mitocôndria e ausência de histonas (Matioli 2001; Klug *et al.*, 2010; Calcagnotto, 2012).

O DNA mitocondrial (mtDNA) é uma ferramenta importante no estudo das relações evolutivas entre indivíduos, espécies e populações (Matioli, 2001; Calcagnotto, 2012), em sistemas de caracterização genética em nível molecular e em estudos de estrutura de genética de populações (Avise e Ellis, 1986). Este genoma está entre os fragmentos de DNA mais usados para estudos de níveis e padrões de distribuição da variabilidade genética entre populações de espécies animais (Avise, 2004), e comumente tem sido utilizado em estudos de filogenia molecular (Boore, 1999) e filogeografia (Brown, 2008).

O DNAm apresenta herança estritamente materna nos vertebrados, com raras observações de herança paterna (Neigel e Avise 1984; Avise *et al.*, 1987; Castro *et al.*, 1998; Dasmahapatra e Mallet, 2006; Brown, 2008; Ivankovic *et al.*, 2009; Matioli e Fernandes,

2012). No DNAmT de vertebrados não existem íntrons, pseudogenes, repetições gênicas são raras, e o DNA espaçador intergênico em geral é insignificante (Avisé *et al.*, 1987; klug *et al.*, 2010; Matioli e Fernandes, 2012). Dentre os 37 genes mitocondriais, 13 codificam proteínas, dois codificam RNAs ribossômicos (12S e 16S rRNA), 22 codificam RNAs de transportadores (tRNAs), e existe uma única região não codificante conhecida como região controle ou *D-loop* (Avisé *et al.*, 1987; Avisé e Elis 1987; Boore, 1999).

Os genes mitocondriais possuem uma diferença entre a taxa de acúmulo de substituições de base com algumas regiões acumulando mais rapidamente as substituições do que outras regiões, como por exemplo, a região controle do DNA mitocondrial.

1.5.1 Região controle do DNAmT

A região controle do DNA mitocondrial também conhecida como alça D ou *D-loop*, é uma região não codificante responsável pelo controle da replicação da fita pesada e transcrição de ambas as fitas do DNAmT (Avisé *et al.*, 1987; Boore, 1999). Em peixes essa região apresenta cerca de 1100 pares de bases (Meyer, 1993).

A região D-loop do DNAmT tem sido muito estudada (Matioli e Fernandes, 2012) e, é usada como marcador molecular por ser altamente polimórfica (Iervolino *et al.*, 2009), por apresentar alta taxa de substituição sendo de 1 a 10 vezes mais rápido do que a DNA nuclear (Avisé *et al.*, 1987), o que a torna uma boa ferramenta para estudos populacionais (Santos *et al.*, 2007) e estudos de filogeografia e análise de relações entre táxons que divergiram recentemente (Stepien e Kocher, 1997).

Análise comparativa de dois marcadores moleculares pode ser mais eficiente para caracterizar a estrutura genético-populacional. Entre eles o gene COI tem sido classificado como marcador importante para ajudar na identificação ou atuar como bandeira sinalizando espécies ocultas.

1.5.2 Gene Citocromo Oxidase I- COI

O gene citocromo oxidase da subunidade I (COI) está presente no genoma mitocondrial e codifica parte de uma enzima terminal da cadeia respiratória da mitocôndria. Atualmente este gene é utilizado como DNA *barcoding* proposto por Hebert *et al.* (2003). Esse método utiliza um fragmento de 648 pb da sequência do gene COI (Hajibabaei e McKenna, 2012) como ferramenta molecular para amparar a taxonomia e sistemática clássica na identificação e

classificação de novas espécies, utilizando métodos de distância para construção de árvores e usando o critério de monofilia recíproca (Herbet *et al.*, 2003; DeSalle *et al.*, 2005).

Para efetividade do DNA barcoding a divergência intraespecífica deve ser menor que as interespecíficas, o que é chamado de *barcoding gap* (Figura 6) (Hebert *et al.*, 2003; Hebert *et al.*, 2004). É importante usar um grande número de indivíduos, o que maximiza a chance de representar a variação intraespecífica existente na espécie (DeSalle *et al.*, 2005). Existe um limite universal de distância genética, e as espécies são identificadas através da presença ou ausência de substituições de nucleotídeos distintos (Rach *et al.*, 2008).

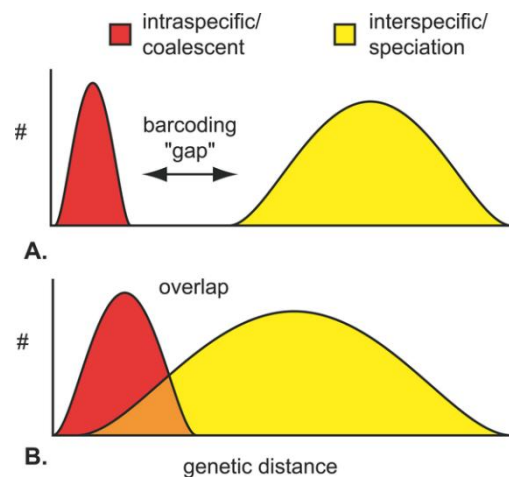


Figura 6: Esquema do *Barcoding gap*, variação intra e interespecífica em vermelho e amarelo respectivamente. DNA barcoding gap (A). Sem gap com sobreposição da variação (B). Fonte: Meyer e Paulay, 2005.

O DNA barcoding tornou-se um meio promissor para a identificação de organismos em todas as fases da vida e ganhou grande atenção como um meio universal para a identificação de organismos, podendo ser um meio rápido e confiável para (i) a atribuição de espécimes desconhecidos para um grupo taxonômico, (ii) a exploração de diagnosticabilidade de unidades de conservação, e (iii) que complementa os sistemas de identificação taxonômica (Rach *et al.*, 2008).

Utilizar marcadores genéticos com diferentes heranças nos permite obter um resultado mais conciso e congruentes sobre a diversidade e variabilidade genética, estrutura e dinâmica

populacional, uma vez que as informações geradas por um marcador complementam as informações do outro.

1.6 Marcadores Microsatélites

Microsatélites são sequências de DNA que possuem de 1 a 6 nucleotídeos repetidos em *tandem*, altamente variáveis e classificados de acordo com o motivo de repetição, como mono, di, tri, tetra, penta e hexanucleotídico (Oliveira *et al.*, 2006). E quanto à natureza de repetição são classificados em: perfeitos, quando a sequência de DNA repetida não é interrompida por qualquer base nucleotídica que não pertença ao motivo de repetição; imperfeitos quando existem nucleotídeos que não correspondem ao motivo de repetição; compostos quando a sequência nucleotídica do microsatélite é formado por dois ou mais motivos de repetição distintos e adjacentes e interrompidos quando existe inserção de um pequeno número de bases que não correspondem ao motivo de repetição (Goldstein e Schlotterer, 1999).

Dentre as vantagens dos microsatélites estão o alto polimorfismo, ser um marcador multialélico, co-dominante, estar amplamente distribuído no genoma, ser amplificados por sistema *multiplex* e, mesmo sendo de natureza espécie-específica, podem ser utilizados em espécies relacionadas (amplificação heteróloga). Contudo, existem desvantagens na técnica devido a complexidade da metodologia de desenvolvimento dos *primers*, demandar muito tempo e ter alto custo e ainda podem existir artefatos da PCR como alelos nulos, *stutters* e *dropout* (Oliveira *et al.*, 2006; Schlotterer, 2004)

Os microsatélites são classificados como importante ferramenta de análise em nível intrapopulacional e têm sido utilizados como marcadores moleculares importantes para obtenção de parâmetros genético-populacionais, para analisar a divergência intra e inter populacional e para avaliar diferentes padrões de estruturação populacional e ainda testar hipótese de panmixia. Estudos com peixes têm utilizado esse tipo de marcador como os realizados para as diferentes espécies Amazônicas, tais como: pirarucu (*Arapaima gigas*) (Farias *et al.*, 2003), tambaqui (*Colossoma macropomum*) (Santos, 2010), dourada (*Brachyplatystoma rousseauxii*) (Batista, 2010), ácara-disco (*Symphysodon* sp.) (Amado *et al.*, 2011), pirapitinga (*Piaractus brachypomus*) (Escobar, 2013) e surubim (*Pseudoplatystoma punctifer*) (Saulo, 2014).

Análises comparativas de multi-locus baseadas em marcadores genéticos nucleares (origem bipariental) e mitocondriais (unipariental) oferecem a abordagem mais eficiente, melhor e mais poderosa para caracterizar a estrutura genética populacional e diagnosticar os

processos evolutivos responsáveis pela diferenciação genética em peixes, portanto, os estudos genéticos, incluindo os dois tipos de marcadores moleculares são amplamente informativos (Gonzalez e Zardoya, 2007).

1.7 Padrões populacionais encontrados em Peixes

Trabalhos realizados com genética de populações de peixes de importância econômica para a alimentação e ornamentação têm identificado pelo menos três padrões populacionais na bacia Amazônica: espécies panmíticas em toda a bacia tais como a dourada *Brachyplatystoma rousseauxxi* (Batista e Alves-Gomes, 2006), tambaqui *Colossoma macropomum* (Farias *et al.*, 2010), curimãtã *Prochilodus nigricans* (Machado, 2009) e *Semaprochilodus insignis* jaraqui (Passos, 2009); espécies com padrões de estrutura em megarregiões geográficas na bacia amazônica, como o aruanã *Osteoglossum bicirrhosum* (Silva, 2009) e o pirarucu *Arapaima gigas* (Hrbek *et al.*, 2005; Hrbek *et al.*, 2007, Leão, 2009); e espécies com padrões de forte estruturação populacional como o acará-disco *Symphysodon* sp (Farias e Hrbek, 2008, Amado *et al.*, 2011).

Além destes padrões comumente encontrados para peixes amazônicos Sanches e Galetti Jr (2007) com o peixe migrador *Brycon hilarii* na sub-bacia do rio Miranda (bacia do rio Paraguai) e Wasko e Galetti Jr (2002 e 2003) com *Brycon lundii* na bacia do rio São Francisco observaram padrões com modelo de sub-estruturação populacional indicando uma co-ocorrência e co-migração em estoques diferenciados da mesma espécie. Ambas as espécies apresentaram mais de um estoque genético diferenciados, provavelmente com isolamento reprodutivo, dada a ocorrência simpátrica de indivíduos de diferentes populações geneticamente estruturadas.

O padrão de estruturação onde diferentes Unidades de Conservação (CUs) co-ocorrem foi evidenciado nas são populações de *Nannostomus eques* (peixe lápis) na bacia do rio Negro, os dados indicaram a presença de pelo menos duas unidades evolutivas, sendo que em uma das localidades (Jacundá) essas Unidades Evolutivas ocorrem em simpátria.

Capítulo I

Caracterização de marcadores microssatélites para apapá amarelo *Pellona castelnaeana* (Clupeiformes: Pristigasteridae)

ALINE MOURÃO XIMENES¹, EMIL JOSÉ HERNÁNDEZ-RUZ², VALÉRIA NOGUEIRA MACHADO¹, LUIS REGINALDO RIBEIRO RODRIGUES³, GILCILAINE DE SOUZA RITTER², IZENI P. FARIAS¹

¹ Laboratório de Evolução e Genética Animal, Departamento de Biologia, Universidade Federal do Amazonas, Av. Rodrigo Octávio Jordão Ramos, 3000, 69077-000, Manaus, AM, Brasil.

² Laboratório de Zoologia, Faculdade de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará, Rua Coronel José Porfírio, 2515, 68372-040, Altamira, PA, Brasil.

³ Laboratório de Genética & Biodiversidade, Instituto de Educação, Universidade Federal do Oeste do Pará/UFOPA, Campus Tapajós, Rua Vera Paz Sn, 68035110, Bairro Salé, Santarém, Pará, Brasil.

ABSTRACT

The Amazon pellona is one of the few species of Pristigasteridae with recognized commercial value in the Amazon. We isolated 24 and characterized eight microsatellites loci for this species. Number of alleles ranged from two to eight per locus. Observed heterozygosities ranged from 0.052 to 0.823, and expected heterozygosities from 0.052 to 0.836. These eight microsatellites could be used as a valuable tool to characterize levels and distribution of genetic diversity, population structure and gene flow, among others important parameters for the genetic conservation of this species, as well as for its sister taxon *Pellona flavipinnis*.

Keywords: Apapa, Basin Amazon, Enriched genomic library, microsatellite loci, population analysis.

RESUMO

Apapá amarelo é uma das poucas espécies de Pristigasteridae com valor econômico reconhecido na Amazônia. Nós isolamos 24 e caracterizamos oito locos de microssatélites para esta espécie. O número de alelos variou de 2 a 8 por locus. A heterozigosidade observada variou de 0.052 a 0.823, e heterozigosidade esperada de 0.052 a 0.836. Os oito microssatélites caracterizados podem ser usados para avaliar e caracterizar níveis e distribuição da diversidade genética, estrutura populacional e fluxo gênico, dentre outros parâmetros importantes para a conservação desta espécie, assim como para táxon irmão a *Pellona flavipinnis*.

Palavras-chave: Apapá, Bacia Amazônica, biblioteca genômica enriquecida, locos microssatélite, Análise populacional.

1. INTRODUÇÃO

Pellona castelnaeana Valenciennes 1847, pertence a família Pristigasteridae que é representado por peixes marinhos e de água doce (Whitehead, 1985), está é conhecida popularmente como apapá amarelo, e esta entre as cinco espécies que ocorre em ambientes de água doce (Whitehead, 1985; de Pinna e Di Dario, 2003), considerada carnívora alimentando-se principalmente de peixes (Santos *et al.*, 2006). Assim como outras espécies de hábitos piscívoros se reproduz durante o período seco, essa antecipação do período reprodutivo pode ser uma estratégia para que seus alevinos alcancem um tamanho suficientemente grande para

se alimentarem de outros peixes amazônicos que desovam na enchente (Ikeziri *et al.*, 2008). Esta espécie ocorre na bacia Amazônica, aparentemente não entra no mar, mas provavelmente tolera um grau de salinidade, distribui-se nos rios da Amazônia, Iquitos (na Amazônia Peruana) e rio Ambyiacos no Equador até a boca do rio Amazonas no Pará e nas Guianas (Froese e Pauly, 2011).

De acordo com Ikeziri *et al.* (2008), o apapá amarelo é uma das poucas espécies de Pristigasteridae de água doce com reconhecido valor econômico na Amazônia. Santos *et al.* (2006) reportam que a importância econômica dentro da família para a apapá amarelo é aproximadamente 20% e para apapá branco [*Pellona flavipinnis* (Valenciennes 1837)], é 5-20% esses números correspondem ao comercializado em Manaus, e a porcentagem dentro do grupo a qual pertence. Almeida (2006) citou o apapá amarelo entre uma das 30 novas espécies comercializadas na indústria pesqueira. Esses dados mostram que esta espécie faz parte do recurso pesqueiro e como tal precisa ser estudada e implementadas práticas de manejo de pesca.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Para acessar os parâmetros genéticos de *Pellona* da bacia Amazônica, nós desenvolvemos uma biblioteca genômica enriquecida de microssatélites para *P. castelnaeana*. Utilizando o método seletivo de hibridização com biotina tipo (CT)₈ e (GT)₈, conjugada com estreptavidina recuperadas por esferas magnéticas (Refseth *et al.*, 1997). Após a hibridização, os microssatélites enriquecidos foram amplificados por reação em cadeia da polimerase, ligados aos vetores de clonagem pGEM-T easy vector e transformados em bactérias *Escherichia coli* XL1-Blue eletro-competentes. As bactérias transformadas foram inoculadas em meio sólido Luria-Bertani (LB) com ampicilina (100mg/ml) + X-gal (2%), e depois de crescer, as colônias brancas contendo os insertos foram transferidos e inoculados em placas contendo meio líquido Tartoff-Hobbs com ampicilina. Um total de 96 clones positivos foram sequenciados em ambas direções usando o kit de sequenciamento BigDye^R terminator v3.1, de acordo com as instruções do fabricante. As sequências foram alinhadas e editadas utilizando o software BioEdit (Hall, 2007).

Um total de 96 clones foram sequenciados e desses 24 foram selecionados para desenhar os primers usando o software Primer 3 (Rozen e Skaletsky, 2000). Todos os pares de primers forward tiveram a cauda M13 adicionada, seguindo a metodologia proposta por Schuelke (2000). A temperatura de anelamento da PCR foi inferida usando um gradiente com temperatura variando entre 50°C e 60°C. Do total de 24 locis originais, oito primers foram

polimórficos, e esses usados na caracterização amplificaram com 60°C. A reação de genotipagem foi conduzida em Veriti™ Thermal Cycler (Life Technology, Inc.), em um volume final de 10µl. Cada reação contendo 3,8 µL de água MilliQ, 1,2 µL de MgCl₂(50 mM), 1,0 µL de dNTPs (10 mM), 1,0 µL de buffer (100 mM Tris-HCl, pH 8,5, 50 mM KCl), 0,4 µL de 2(µM) (primer forward com cauda M13), 0,4 µL de 2(µM) (primers com fluorescência), 0,8 µL de 2(µM) (primer reverse), 0,3 µL de 2,0 U Taq DNA polimerase, e 1 µL de DNA (50 – 100 ng/µL). O perfil de amplificação foi: pré-aquecimento, a 94°C por 60 segundos, seguido de 25 ciclos consistindo de 30 seg a 94°C para desnaturação, 60°C por 30 seg para anelamento dos primers específicos, e 68°C por 40 seg para extensão; seguindo de 20 cics adicionais: desnaturação a 94°C por 20 seg, anelamento do primer M13 marcado com fluorescência M13 a 52°C por 30 seg, e extensão a 72°C por 60 seg; extensão final a 72°C por 30 min. As reações de genotipagens foram preparadas com 1µL de produto dePCR, 1µL of ROX (DeWoody et al. 2004) e 8 µL de Hi-Di formamida (Life Technology, Inc.), e os tamanhos dos fragmentos foram resolvidos no sequenciador automático ABI 3130xl. As genotipagens foram visualizadas utilizando o software GeneMapper v4.0 (Life Technology, Inc.).

Os microssatélites foram caracterizados utilizado indivíduos de *Pellona castelnaeana* da localidade de Santarém (bacia Amazônica). Usando o programa Micro-Checker v 2.2.3 (Van Oosterhout *et al.* 2004) verificou-se que não existe alelos nulos nos dados. Os parâmetros de genética foram obtidos utilizando o programa Arlequin 3.5 (Excoffier e Lischer, 2010).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A população de *Pellona castelnaeana* apresentou heterozigosidade observada entre 0,052 a 0,823, heterozigosidade esperada entre 0,052 a 0,836, e número de alelo por locus variou de dois (locus Pc63) a 8 (locus Pc77) (tabela 01). Os locis analisados não apresentaram desvios significativos no equilíbrio de Hardy-Weinberg e nem desequilíbrio de ligação.

A amplificação heteróloga foi realizada em exemplares de *Pellona flavipinnis* de Manaus, dos oito locis de microssatélites polimórficos em *P. castelnaeana*, sete amplificaram e foram polimórficos (tabela 02). Os marcadores microssatélites desenvolvidos para *Pellona castelnaeana* poderão ser utilizados como ferramentas para avaliar e caracterizar níveis e distribuição da diversidade genética, estrutura populacional, fluxo gênico, entre outros parâmetros que poderão ser úteis para o conhecimento da genética populacional e da conservação desta espécie, assim como do táxon irmão *Pellona flavipinnis*.

Tabela 01: Caracterização de oito locos de microssatélites em 9-19 indivíduos de *Pellona castelnaeana* do Município de Santarém.

Gen Bank Accession		Primer (5' – 3')	Repeat motif	T (°C)	Size range (bp)	N/A	H_O	H_E
KJ013303	Pc 3	F: CCCTGGTCTTGACGCACT R: CAGTCCCGAGGCACACTT	(TGA) ₁₉	60	310-316	19/3	0.368	0.655
KJ013304	Pc 11	F: AAAAATTCCTGACCTGAGCA R: <u>GTTTCTTCCAATACCATACATAGAGCACA</u>	(TG) ₁₉	60	201-213	19/5	0.473	0.627
KJ013305	Pc 63	F: GAATAGTGCCTGACGCAACA R: † <u>GTTTCTTGT</u> CGGACACAAGTTCTGCAA	(CA ₅)TGCATA A ₆	60	212-214	19/2	0.263	0.308
KJ013306	Pc 66	F: TGACATACGGTTAGCATGTAGCA R: <u>GTTTCTTCCATTT</u> CGCGAGAGAAAATC	(TG ₃)TATGT ₁₀	60	182-186	19/2	0.052	0.052
KJ013307	Pc 77	F: GCCAGGATCCTAAACACCAA R: GTTTCTTCCCAAACACACACGATCACA	(AG) ₅ AA(AG) ₁₀ A (AG) ₅ A(TG) ₁₀	60	312-334	17/8	0.823	0.836
KJ013308	Pc 78	F: GGAGACTCTGTGGGTGGAAA R: TACCTTTCCCTGCACTTGCT	(GT) ₁₄	60	242-260	9/4	0.666	0.725
KJ013309	Pc 81	F: TATTGGCCCTATTGCCTTTG R: TGACACACATGCTGTCAAACCTC	(TG) ₁₅	60	312-316	17/3	0.470	0.383
KJ013310	Pc 93	F: TCTGGAACCATGGATTTGGT R: † <u>GTTTCTTCCCGT</u> GCTAGCAGAGAGTGT	(TG) ₁₅	60	167-171	19/3	0.368	0.362
	All loci					17/3.8	0.435	0.493

Nota: N/A número de indivíduos/número de alelos; H_O heterozigidade observada; H_E heterozigidade esperada; * $P < 0.05$. (Brownstein *et al.*, 1996).

Tabela 02: Amplificação heteróloga em *P. flavipinnis* de sete microssatélites desenvolvidos para *P. castelnaeana*.

<i>Pellona flavipinnis</i>				
Locus	Size-range	N/A	H_O	H_E
Pc3	296-318	31/10	0.312	0.688
Pc11	181-193	31/6	0.593	0.563
Pc63	266-270	27/4	0.375	0.530
Pc66	166-184	27/5	0.172	0.384
Pc77	276-292	31/7	0.531	0.712
Pc78	266-276	27/7	0.571	0.671
Pc81	-----			
Pc93	179-199	28/12	0.633	0.782
All loci		29/6.7	0.455	0.533

Nota: N/A número de indivíduos/número de alelos; H_O heterozigiosidade observada; H_E heterozigiosidade esperada; * $P < 0.05$

AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi apoiado por CNPq/CT-Amazônia 575603/2008-9, CNPq SISBIOTA 563348/2010-0, FAPEAM/Pronex de I.P.F., FAPESPA/ CNPq ICAAF 134/2010 de E.J.H.R. Agradecemos a Anete Pereira de Souza (CBMEG/BV/IB/UNICAMP) por permitir a participação no curso “NT 264 A– Microssatélites para estudos genéticos de Eucariotos”. Agradecemos ao IBAMA pela autorização de captura, coleta e transporte de material biológico.

Capítulo II

Estrutura genética e dinâmica populacional do apapá amarelo (*Pellona castelnaeana*, *Pristigasteridae*) na bacia Amazônica

RESUMO

Na bacia Amazônica o gênero *Pellona* está representado por duas espécies, *P. castelnaeana* Valenciennes, 1847 e *P. flavipinnis* (Valenciennes, 1837). O presente trabalho teve por objetivo avaliar a estrutura genética e dinâmica populacional do apapá amarelo (*P. castelnaeana*) na bacia Amazônica e sub-bacia Boliviana, para isso foi sequenciado um fragmento com 617 pares de bases da região controle do DNA mitocondrial de 175 indivíduos provenientes de quatro localidades na calha do rio Amazonas, duas localidades a jusante e montante das corredeiras do alto rio Madeira e cinco outros tributários do rio Amazonas. Sete locos de microssatélites foram usados para genotipar 119 indivíduos oriundos de cinco localidades da bacia Amazônica e duas localidades a jusante e montante das corredeiras do alto rio Madeira. Os resultados mostram uma estruturação na distribuição dessa espécie na bacia Amazônica dividindo esta em três megarregiões. Também mostram uma diferenciação entre os indivíduos desta bacia com os indivíduos da sub-bacia Boliviana (drenagem do alto rio Madeira). Dados do DNAm_t mostram altos índices de diversidade gênica ($\hat{H}=0.8646$) e diversidade nucleotídica ($\pi=0.044236$). Das 175 sequências foram obtidos 49 haplótipos, sendo 35 únicos, com um haplótipo compartilhado entre todas as localidades da bacia Amazônica. A partir dos dados de microssatélites totalizou-se 251 alelos, com variação de 4 a 12 alelos por loco e, média de 10,4. A heterozigosidade esperada (H_E) e observada (H_O) variou de 0,42211 a 0,79681 e 0,23564 a 0,63561, respectivamente. A análise de variância molecular evidenciou uma subdivisão populacional entre bacia Amazônica e bacia Boliviana com os dados do DNAm_t e microssatélites, respectivamente. Altos valores de estruturação foram observados quando analisados os pontos da bacia Amazônica juntos e, comparados com a sub-bacia Boliviana ($\Phi_{ST}= 0,3172$, $P=0,0000$). Os valores de Nm indicam baixo fluxo gênico entre o alto rio Madeira e a bacia Amazônica. Os resultados a partir do DNAm_t indicam que *P. castelnaeana* forma uma população geneticamente homogênea na bacia Amazônica, porém, subestruturada em relação a bacia Boliviana como indicam os resultados do DNAm_t e, também dos microssatélites, corroborando a hipótese das corredeiras como barreiras ao fluxo gênico, padrão esse já encontrado em outras espécies de peixes. Sendo assim as populações de apapá da bacia Amazônica e Boliviana devem ser consideradas como unidades de manejo diferentes.

Palavras chaves: Microssatélite, região controle, genética de populações, corredeiras, fluxo gênico.

1. INTRODUÇÃO

Pristigasteridae é uma família de peixes que inclui as sardinhas marinhas e costeiras que ocorrem em todos os oceanos tropicais e nas águas doces da América do Sul e do Sudeste da Ásia (Santos *et al.*, 2009). É uma das cinco famílias de peixes da ordem Clupeiformes (Li e Ortí, 2007; Lavoué *et al.*, 2010). Na Amazônia esta família é representada por três gêneros *Ilisha*, *Pristigaster* e *Pellona*.

O gênero *Pellona* Valenciennes 1837, o qual está incluído na subfamília Pelloninae (Nelson, 2006), caracteriza-se por apresentar corpo comprimido, quilhas ao longo do ventre, mandíbula inferior projetada e boca direcionada para cima. Estão distribuídos na América do Sul entre Argentina, Uruguai, Brasil, Venezuela, Guianas e Colômbia. O gênero inclui cinco espécies, sendo *Pellona castelnaeana* Valenciennes 1847 e *Pellona flavipinnis* (Valenciennes, 1837) representantes de água doce (Whitehead, 1985).

Pellona castelnaeana conhecida popularmente como apapá amarelo, é uma espécie considerada carnívora, se alimentando principalmente de peixes (Santos *et al.*, 2009). É uma das maiores espécies conhecidas de Clupeiformes, podendo pesar até 7 kg e atingir até 60 cm de comprimento padrão (Le Guennec e Loubens, 2004; Di Dario, 2013). Essa espécie realiza migrações para fins reprodutivos no período da vazante-seca e, essa antecipação do período reprodutivo pode ser uma estratégia para que seus alevinos alcancem um tamanho suficientemente grande para se alimentarem de outros peixes amazônicos que desovam na enchente (Ikeziri *et al.*, 2008).

Ainda Ikeziri (*et al.*, 2008) comentaram que houve um aumento gradativo no desembarque pesqueiro dessa espécie e, eles mencionam a importância de unidades de conservação na região do rio Cautário (Guaporé) e apontam o apapá amarelo como peixe comercial de abundância restrita. Com importância relativa na pesca comercial (Di Dario, 2013) e devido ao aumento da pressão populacional, com exploração de indivíduos de tamanhos médios, é necessário o conhecimento sobre a biologia desta espécie (Le Guennec e Loubens, 2004).

Pellona castelnaeana faz parte dos recursos pesqueiros da bacia Amazônica e, como tal necessita ser estudada, para que não venha sofrer os efeitos de sobrepesca, como já acontece com algumas espécies de peixes na Amazônia. Neste sentido o presente trabalho utilizou sete locos de microssatélites e parte da região controle do DNAMt com o intuito de: avaliar a estrutura genética, dinâmica populacional, estimar a variabilidade e diversidade genética intra e interpopulacional, inferir sobre a estrutura genética, testar isolamento por distância nas populações do apapá amarelo na bacia Amazônica.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Amostras populacionais e suas localidades

As amostras foram obtidas diretamente em feiras ou através de coletas Zoológicas do Laboratório de Evolução e Genética Animal (LEGAL-UFAM), da Universidade Federal de Rondônia, Universidade Federal do Pará (Campus Altamira), Universidade Federal do Oeste do Pará. De cada exemplar, foi retirada parte da nadadeira peitoral que foi preservada em álcool 100% para posteriores análises laboratoriais. No total foram amostrados 12 localidades na bacia Amazônica (Figura 1) (tabela 01).

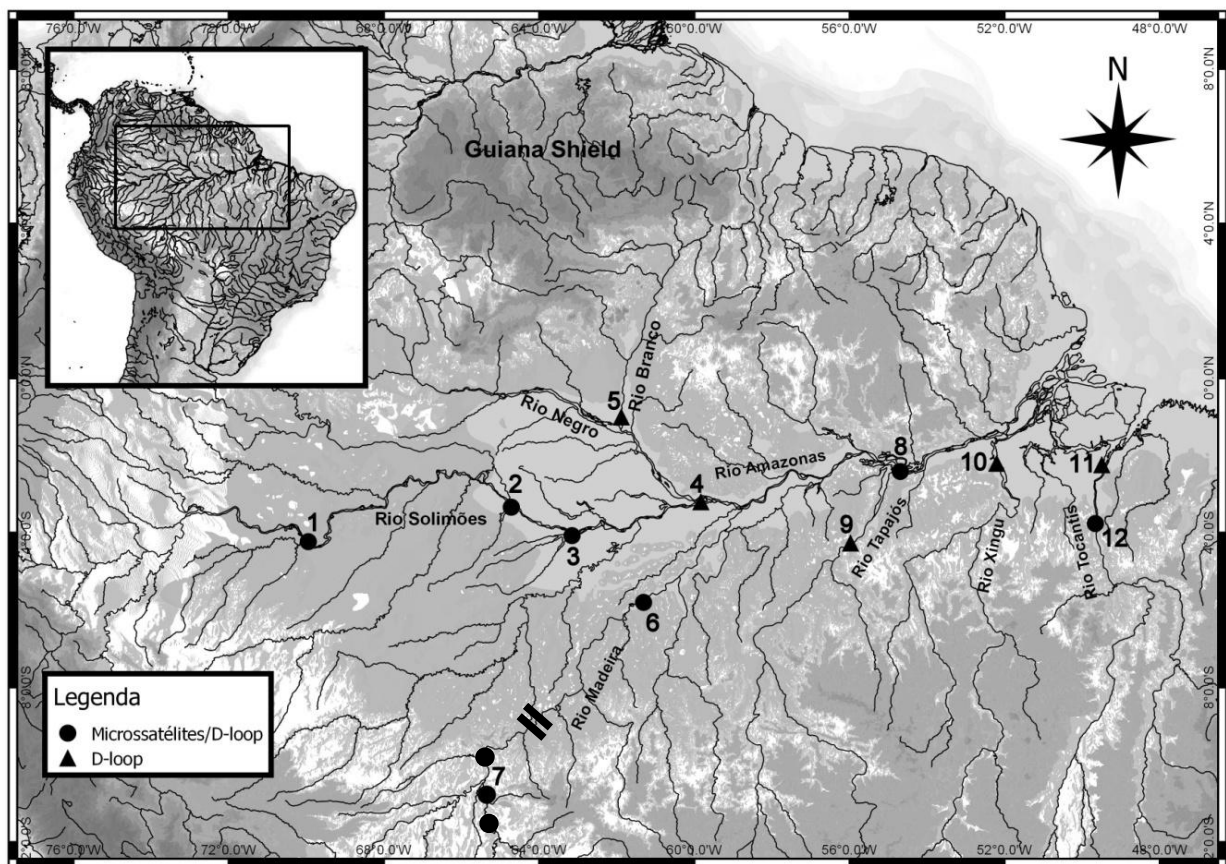


Figura 01: Mapa geográfico das localidades amostradas.

Tabela 01: Localidades, rios e números de indivíduos coletados.

Localidades	Nº de indivíduos analisados	
	D-loop	Microssatélites
1-Tabatinga (rio Solimões)	16	23
2-Tefé (rio Solimões)	25	14
3-Coari (rio Solimões)	8	15
4-Manaus (rio Amazonas)	11	-
5-Baixo rio Branco (rio Branco)	5	-
6-Baixo rio Madeira (rio Madeira)	22	22
7-Alto rio Madeira (rio Guaporé)	24	13
8-Santarém (rio Amazonas/Tapajós)	38	19
9-Itaituba (rio Tapajós)	3	-
10-Altamira (rio Xingu)	9	-
11- Cametá (rio Tocantins)	3	-
12- Tucuruí (rio Tocantins)	11	13
TOTAL	175	119

2.2 Extração de DNA

O DNA total de cada indivíduo foi extraído pelo método fenol clorofórmio (Sambrook *et al.*, 1989). O processo consiste basicamente de lise celular através da digestão com proteinase K (10mg/mL) e solução de SDS. As amostras foram incubadas e, posteriormente lavadas com fenol/clorofórmio/álcool isoamílico e clorofórmio/álcool isoamílico e precipitadas com etanol 70%. Em seguida as amostras foram ressuspensas em tampão TE (10mM Tris-HCl pH 8.0, 1mM EDTA) e mantidas em freezer a -20°C . A qualidade das amostras foi observada através de eletroforese em gel de agarose 1%, corado com *Gel red* e azul de bromofenol. A quantificação foi realizada através de espectrofotômetro Nanodrop 2000. Posteriormente o DNA foi diluído em uma concentração final variando de 30-50 ng/μl.

2.3 Amplificação e purificação da região controle do DNA mitocondrial

A região D-loop foi amplificada via PCR (reação em cadeia da polimerase), com volume total de 15μl: contendo 6.5 μl de ddH₂O, 1.2 μl de DNTP (2,5mM), 1,5μl tampão 10X (100mM Tris-HCl, 500mM KCl), 1.2μl de MgCl₂ (25mM), 1.5μl do primer DLBD (AGCRYCGGTCTTGTAATCCG) e 1.5 μl do primer DLAR (AGTCAGGACCAARCCT TTGTGC), desenvolvidos por Montoya-Burgos (2003) (2 pMol) e 0.5μl de Taq (2U/μl), 1μL de DNA. O perfil de amplificação utilizada foi: pré-aquecimento, a 92 °C por 35 segundos,

desnaturação, a 92 °C por 35 segundos, anelamento a 60°C por 35 segundos, e extensão a 72 °C por 1 minuto repetidos por 35 ciclos e uma extensão final de 72 °C por 5 minutos uma única vez.

A eficiência da amplificação foi verificada utilizando 2µl do produto de PCR juntamente com 2µl de corante azul de bromofenol e *Gel red* e em seguida aplicados em gel de agarose 1%. Utilizou-se um marcador de peso molecular conhecido para posterior comparação.

A purificação dos produtos de PCR foi realizada com intuito de eliminar os produtos de baixo peso molecular que não foram incorporados na reação de amplificação. Nesta etapa utilizou-se as enzimas Exonuclease e Shrimp Phosphatase Alcaline (Sap) submetidos a temperatura ideal para otimização da atividade enzimática.

2.4 Sequenciamento da região controle do DNA mitocondrial

As reações de sequenciamento foram realizadas com um volume final de 10 µl por amostra, contendo: DNA purificado, o *primer sense* e o kit BigDye terminator (Life Technologies) seguindo o protocolo do fabricante. O produto da reação de sequenciamento foi precipitado com EDTA/Etanol e, ressuspendido em 10 µL de formamida. As amostras foram sequenciadas em sequenciador automático ABI 3130xl (Applied Biosystems).

3.5 Alinhamento e edição das sequências

Para o alinhamento múltiplo das sequências obtidas da região controle do DNAm_t utilizou-se a ferramenta Clustal W (Thompson *et al.*, 1996) contida no programa BioEdit (Hall, 1999) e a conferência e correção do alinhamento foram feitas manualmente.

2.6 Reação de genotipagem

A amplificação dos microssatélites de acordo com Ximenes *et al.* (2014), consistiu no volume final de 10 µl: contendo 3.4 µl de ddH₂O, 1.0 µl de DNTP (2,5mM), 1.0 µl tampão 10X (100mM Tris-HCl, 500mM KCl), 1.5 de MgCl₂ (25mM), 1.0 µl do primer *reverse*, 0.5 µl do primer *forward*, 0.5 µl da “cauda” M13 e 0.3µl de Taq (2U/µl). O termociclador foi programado pra uma desnaturação inicial a 94⁰C por 1min, seguido de 25 ciclos consistindo de 30seg a 94⁰C para desnaturação, 60⁰C por 30seg para anelamento dos *primers* específicos, 68⁰C por 40seg para extensão, seguido de 30 ciclos adicionais para desnaturação 94⁰C por 20 seg, 52⁰C por 30 seg o anelamento do primer M13 marcado com fluorescência FAM e 72⁰C por 1 min para extensão, e uma extensão final de 72⁰C por 30 min. Os produtos da amplificação foram visualizados através de eletroforese em gel de agarose 1%. As reações de genotipagens foram preparadas com 1.0µl de

produto de PCR diluído, 1.0 µl do marcador *Rox* (6-carboxi-X-rodamina) e 8.0 µl de formamida e genotipadas em sequenciador automático ABI 3130xl (Applied Biosystems). O tamanho dos alelos (em pares de bases) foi estimado usando o *software* específico para genotipagem *GeneMapper*TM versão 4.0.

2.7 Análises populacionais

2.7.1 Região Controle do DNA mitocondrial

Para a região controle mitocondrial, os níveis de polimorfismo de DNA foram estimados no programa Arlequin versão 3.5 (Excoffier *et al.*, 2010) utilizando os seguintes parâmetros populacionais: diversidade haplotípica (h), que considera a frequência e número de haplótipos observados em cada localidade amostrada; índice de diversidade gênica (H), que é a probabilidade de duas sequências tomadas ao acaso em uma mesma população serem diferentes entre si; e diversidade nucleotídica (π), que é a média das diferenças nucleotídicas em cada sítio entre duas sequências tomadas ao acaso na população.

A Análise de Variância Molecular (AMOVA) (Excoffier *et al.*, 1992) foi realizada para verificar o grau de diferenciação genética entre as populações com base nos valores de Φ_{ST} (F_{ST} de Wright). Através desta análise foram estimadas a diversidade e a estruturação genética. O nível de fluxo gênico Nm (número de migrantes por geração) foi inferido a partir das comparações par-a-par dos valores obtidos de Φ_{ST} por meio da AMOVA. Ambas as análises foram realizadas no programa Arlequin 3.5 (Excoffier *et al.*, 2010).

A partir dos valores de comparação par a par de Φ_{ST} , foi construída uma matriz de distância genética com auxílio do programa Arlequin versão 3.5 (Excoffier *et al.*, 2010), que foi correlacionada com a matriz de distância geográfica (distâncias aproximadas seguindo o curso dos rios) construída com auxílio do *Google Earth*. O nível de significância das matrizes é estimado com o teste de Mantel (Mantel, 1967), e o nível de confiança para esse teste foi 10.000 permutações.

Os testes de neutralidade D de Tajima (Tajima, 1989) e F_s de Fu (Fu, 1997) são usados para avaliar a neutralidade seletiva em populações naturais. Valores significativos indicam que as sequências não estão evoluindo segundo a hipótese de neutralidade seletiva, isto é, não estão em equilíbrio com respeito à mutação e à deriva genética e que as populações experimentaram flutuações no passado. Como a região Controle não codifica proteína, ela não sofre pressão de seleção, e a detecção de desvios significantes do equilíbrio genético pressupõe uma recente expansão populacional ou *bottleneck*.

Para verificar as populações geneticamente estruturadas com base nos dados de sequências do DNAm através do método bayesiano, utilizou-se o programa BAPS (Bayesian Analysis of Genetic

Population Structure) versão 6 (Corander *et al.*, 2013). Os grupos biológicos são formados a partir da estimativa na distribuição das frequências alélicas de todas as populações, utilizando o método de algoritmo Bayesiano. O número de *clusters* genético é inferido posteriormente, pois inicialmente o programa considera o número de populações como “desconhecido”. À medida que diferenças nas frequências alélicas mostraram-se não significantes, estas frequências e distribuição são recalculadas usando outra combinação de populações (Corander *et al.*, 2003). Os grupos biológicos são estimados de acordo com a distribuição das frequências alélicas e do melhor valor de probabilidade encontrado para o número de *clusters*.

2.7.2 Marcadores Microsatélites

Para os marcadores microsatélites, os parâmetros de variabilidade genética foram obtidos no programa Arlequin 3.5 (Excoffier *et al.*, 2010) através dos índices de heterozigosidade observada e esperada e números de alelos. A Análise de Variância Molecular (AMOVA) (Excoffier *et al.*, 1992) foi realizada para verificar o grau de diferenciação entre as populações com base nos valores de F_{st} . O nível de fluxo gênico Nm (número de migrantes por geração) foi inferido a partir dos valores de F_{st} . Ambas as análises foram realizadas no programa Arlequin 3.5 (Excoffier *et al.*, 2010).

Adicionalmente utilizou-se uma análise bayesiana implementada no programa *Structure* (Pritchard *et al.*, 2000), que atribui indivíduos a um número K de populações assumindo equilíbrio de Hardy Weinberg (EHW) e ausência de desequilíbrio de ligação (DL) entre os locos analisados dentro de cada população. Foi usado o modelo de mistura (*admixture model*) que assume que cada indivíduo pode ter ancestrais de mais de uma população e opção de frequências alélicas correlacionadas entre populações (*correlated allele frequencies between populations*). Esta opção é sensível para identificação de populações sub-estruturadas (Falush *et al.*, 2003). Foram realizadas dez réplicas (*runs*) para cada valor de K entre 1 e 10 com valores de corte (*burnin*) de 100.000 permutações e 1.000.000 simulações em Cadeias de Monte Carlo (MCMC). O número de populações esperado é o valor de K máximo estimado pelo modelo *log-likelihood* ($\log(P(X/K))$) (Falush *et al.*, 2003).

3. RESULTADOS

3.1 Região controle do DNA mitocondrial

O banco de dados para análise de genética populacional foi composto por 175 sequências parciais da região controle do DNA mitocondrial com um total de 617 pares de bases para cada

indivíduo, coletados em 12 localidades (Figura 01). A composição média de bases nucleotídicas deste fragmento foi de 38,92% para Adenina, 28,60% para Timina, 19,82% para Citosina e 12,66% para Guanina.

A partir das 175 sequências analisadas verificou-se que 332 sítios foram monomórficos e 284 sítios foram polimórficos. Em meio aos sítios variáveis 38 corresponderam a mutações do tipo transição (substituição de uma purina por outra purina ou de uma pirimidina por outra pirimidina) e 15 do tipo transversão (substituição de uma pirimidina por uma purina e vice-versa).

Foram encontrados 49 haplótipos a partir dos 175 indivíduos analisados provenientes das 12 localidades, destes 35 foram únicos. O haplótipo de maior frequência e distribuição geográfica foi compartilhado por 71 indivíduos, estando presente em 11 localidades das 12 localidades amostradas (não estava presente somente no alto rio Madeira) e o segundo mais frequente foi compartilhado por 16 indivíduos distribuídos em nove localidades.

Os níveis de variabilidade genética foram estimados com base nos parâmetros genéticos e na análise de polimorfismo do DNA como é mostrado na tabela 02. Os resultados mostraram que a diversidade gênica \hat{H} foi alta para maioria das populações analisadas, com os maiores valores sendo observados nas localidades do baixo rio Branco e de Itaituba no rio Tapajós com $\hat{H}=1,000$ e o menor valor observado em Tefé no rio Solimões $\hat{H}= 0,6400$. A diversidade nucleotídica (π) variou de $\pi= 0,0028$ em Tefé a $\pi= 0,1079$ no baixo rio Branco.

Tabela 02: Parâmetros genéticos para *Pellona castelnaeana* (D-loop).

População	Nº Amostrai	Nº de Haplótipos	Sítios polimórficos	Diversidade gênica (\hat{H})	Diversidade nucleotídica Π	D de Tajima	F_s de Fu
Tabatinga	16	10	80	0.8667 +/- 0.0793	0.020394 +/- 0.010881	-0.58350	1.03500
Tefé	25	9	12	0.6400 +/- 0.1070	0.002896 +/- 0.001929	-1.48767	-3.10489
Coari	8	5	42	0.7857 +/- 0.1508	0.029926 +/- 0.016951	0.41421	4.06580
Manaus	11	5	8	0.7818 +/- 0.1073	0.004479 +/- 0.002894	0.04893	0.36244
Baixo Branco	5	5	146	1.0000 +/- 0.1265	0.107942 +/- 0.066028	-0.80734	1.84382
Baixo Madeira	22	16	149	0.9307 +/- 0.0463	0.040020 +/- 0.020391	-0.41161	0.42048
Alto Madeira	23	18	257	0.9763 +/- 0.0201	0.079167 +/- 0.039677	-1.32955	1.44189
Santarém	38	20	183	0.8905 +/- 0.0425	0.073176 +/- 0.036034	-1.33248	-1.32955
Itaituba	3	3	28	1.0000 +/- 0.2722	0.030254 +/- 0.023263	0.00000	1.79304
Xingu	9	5	9	0.8056 +/- 0.1196	0.006213 +/- 0.003908	0.72536	0.59183
Baixo Tocantins	14	6	46	0.7473 +/- 0.1114	0.011577 +/- 0.006486	-1.05567	2.70711
TOTAL	175	75	284	0.8684 +/- 0.0238	0.045703 +/- 0.022238	-1.43185	-7.29546

* indica significância após correção de Bonferroni ($P < 0,0009$).

Os valores obtidos por meio dos testes de neutralidade D de Tajima e F_s de Fu não se mostraram significativos para nenhuma das localidades amostradas ($P > 0,05$), indicando que o polimorfismo genético nessas localidades está de acordo com o modelo neutro de mutações. Valores positivos para ambos os testes são associados com gargalos populacionais enquanto que, valores negativos indicam expansão populacional.

Para estimar a variação genética dentro e entre as populações foi realizada uma análise de variância molecular (AMOVA) e, os resultados mostraram um grau moderado de subdivisão populacional com significativo valor de P ($\Phi_{ST} = 0,1303$, $P = 0,0001$) com uma maior variação ocorrendo dentro das populações (86,97%). Os resultados das comparações par a par de Φ_{ST} indicaram valores de significância para as comparações envolvendo as localidades da sub-bacia Boliviana. O resultado de AMOVA considerando apenas duas áreas amostrais: sub-bacia Boliviana e bacia Amazônica, onde agrupou todas as localidades da sub-bacia Boliviana (alto rio Madeira) e comparou com as localidades da bacia Amazônica agrupadas, evidenciaram um alto grau de estruturação populacional ($\Phi_{ST} = 0,3172$, $P = 0,0000$), indicando diferenciação genética entre as duas bacias.

Os valores de Nm (Número de migrantes por geração) e Φ_{ST} (F_{st} de Wright) indicaram baixo fluxo gênico entre as localidades do alto rio Madeira e demais localidades da bacia Amazônica, dados sumarizados na tabela 03.

O isolamento por distância foi testado correlacionando a distância genética e a distância geográfica. Os resultados não foram significativos para o coeficiente de correlação do teste de Mantel ($r_{Y1} = 0,00009$, $P = 0,4804$), indicando que a diferenciação genética encontrada entre as populações não é explicada pela distância geográfica entre as mesmas.

Os resultados da análise bayesiana de estrutura populacional (Figura 02) realizada no *BAPS* indicaram quatro grupos biológicos, com uma melhor probabilidade de agrupamento ($k = (-779.0687/.100)$). Os dados também evidenciaram subestruturação para as populações da bacia boliviana, no alto rio Madeira.

A rede de haplótipos (Figura 03) foi construída usando o critério da máxima verossimilhança, cujos resultados não evidenciaram agrupamentos haplotípicos (*clusters*) relacionados com os pontos de coletas da bacia Amazônica, mostrando compartilhamento de haplótipos e ausência de estruturação genética nas áreas. Entretanto, um agrupamento foi formado pelos indivíduos provenientes da bacia boliviana indicando uma subestruturação genética, resultado já observado nas análises anteriores.

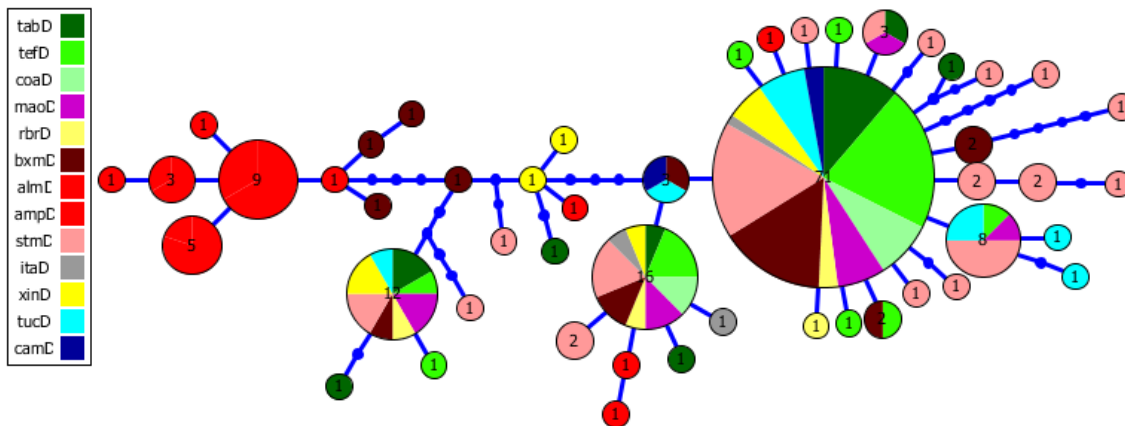
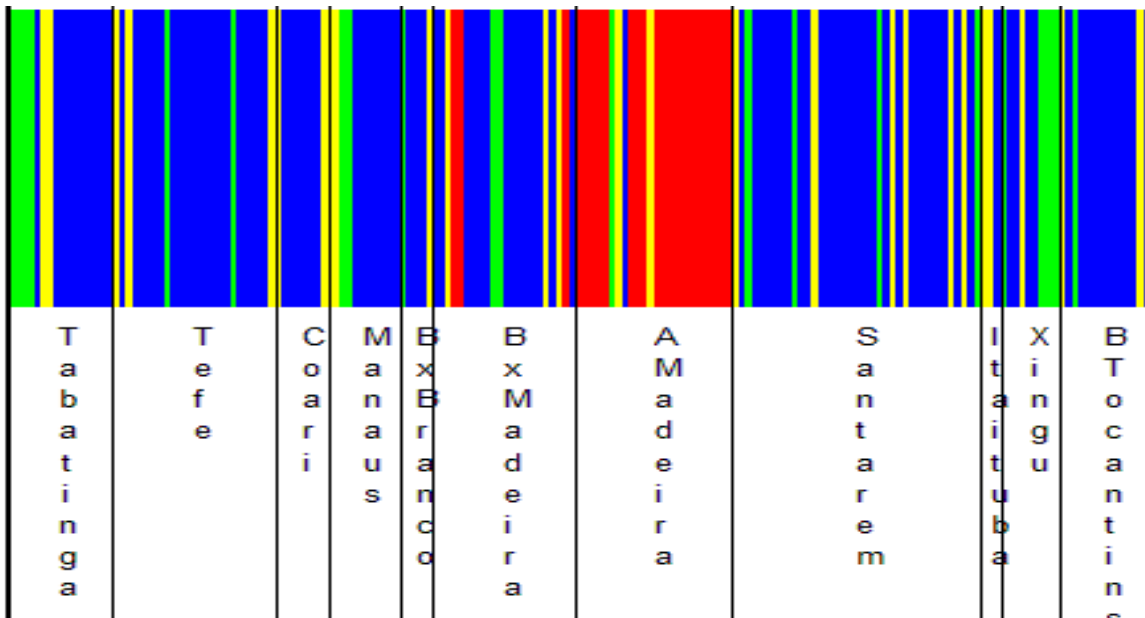


Tabela 03: Valores de Nm (diagonal acima) e Φ_{ST} (diagonal abaixo) obtidos com a região controle do DNAm.

	Tabatinga	Tefé	Coari	Manaus	Baixo rio Branco	Baixo rio Mad	Sub-bacia Boliviana	Santarém	Itaituba	Xingu	Baixo Tocant
Tabatinga	-	14.34064	4.98579	inf	2.60104	Inf	1.53135	12.78559	inf	inf	Inf
Tefé	0.03369	-	0.78622	inf	0.60499	6.36167	6.36167	6.36167	0.54107	2.64826	23.27051
Coari	0.09114	0.38874	-	1.46113	Inf	31.30517	2.54482	43.98511	inf	1.51050	3.38610
Manaus	-0.03328	-0.01176	0.25496	-	1.43429	34.78316	1.23778	7.86767	1.18616	inf	inf
Baixo Branco	0.16124	0.45249	-0.01806	0.25849	-	6.18143	7.38108	inf	inf	1.82477	1.83857
Baixo Madeira	-0.01944	0.07287	0.01572	0.01417	0.07483	-	2.21841	15.99120	inf	79.21748	inf
Sub-bacia Boliviana	0.24614*	0.39681*	0.16421	0.28772*	0.06344	0.18393	-	2.59799	5.80289	1.53751	1.29101
Santarém	0.03763	0.10952*	0.01124	0.05975	-0.08036	0.03032	0.16140	-	inf	8.61290	9.77136
Itaituba	-0.00493	0.48028	-0.21968	0.29653	-0.14545	-0.09817	0.07933	-0.08944	-	1.38671	4.60196
Xingu	-0.02919	0.15882	0.24869	-0.01398	0.21508	0.00627	0.24540	0.05487	0.26501	-	15.54919
Baixo Tocantins	-0.02919	0.02103	0.12866	-0.01979	0.21381	-0.00053	0.27917	0.04868	0.09800	0.03115	-

* indica significância após correção de Bonferroni ($P < 0,0009$).

3.2 Marcadores Microsatélites

Para as análises com marcadores microsatélites foram genotipados um total de 119 indivíduos provenientes de sete localidades, utilizando sete locos de microsatélites o que totalizou 251 alelos, com uma média de 10,4 alelos por locos (tabela 04). O número de alelos variou entre quatro (Pc 81) e 19 (Pc 77) por loco e o tamanho entre 167 a 334 pb. A heterozigosidade esperada (H_E) variou de 0,42211 (Pc 66) a 0,79681 (Pc 77), enquanto que a heterozigosidade observada (H_O) variou de 0,23564 (Pc 66) a 0,63561 (Pc 77) (tabela 04). Os valores observados para H_E e H_O por loco e por população são mostrados nas tabelas 04 e 05, respectivamente. O índice de diversidade genética (π) observado variou de 0.481000 +/- 0.280081 em Santarém e de 0.659341 +/- 0, 372411 em Tucuruí (tabela 06).

Os resultados da AMOVA usada para estimar a diferenciação dentro e entre as populações com base nos valores de F_{st} mostraram um grau moderado, porém, significativo de subestruturação genética ($F_{st} = 0,10477$, $P < 0,0023$, valor de P significativo após correção de Bonferroni) com uma maior variação ocorrendo dentro das populações (89,52%). Os resultados das comparações par a par de F_{st} indicaram valores de significância para a maioria das comparações envolvendo as localidades da sub-bacia Boliviana. O resultado de AMOVA considerando as duas áreas amostrais, sub-bacia Boliviana (alto rio Madeira) e bacia Amazônica (todas as localidades desta bacia foram consideradas como uma única população), indicou uma estruturação populacional ($F_{st} = 0,1448$, $P = 0,0000$), o mesmo grau de diferenciação intermediária observado quando as localidades foram analisadas separadamente. Nas localidades da bacia Amazônica, as diferenças nas frequências alélicas foram observadas pelos valores de F_{st} nas comparações par a par para as localidades de Tabatinga, Tefé e baixo Tocantins (tabela 07).

O isolamento por distância foi testado através da correlação entre a distância genética e a distância geográfica, porém os resultados para o coeficiente do teste de Mantel não foram significativos ($r_{Y1} = 0,18113$; $P = 0,3201$), indicando que não existe correlação entre essas duas variáveis.

O método de agrupamento bayesiano realizado no programa *Structure* resultou um $K = 4$ (Figura 05) e de probabilidade $L(K)$ (-1696.3850) (Figura 04), como a melhor probabilidade para explicar número de grupos biológicos obtidos. Os dados mostram subestruturação para as populações da bacia boliviana no alto rio Madeira.

O coeficiente de endogamia (F_{is}) (tabela 06) apresentou valores altos e significantes em Santarém (0.20725) e Tucuruí (0.43746), o que pode estar mostrando um cruzamento não aleatório, ou seja, cruzamento entre indivíduos relacionados. Efeitos de amostragem não podem ser descartados,

pois para a maioria das localidades foram coletados indivíduos em um único esforço amostral, podendo indicar indivíduos do mesmo cardume (relacionados).

Tabela 04: Valores médios dos índices de Heterozigosidade observada (H_O), Heterozigosidade esperada (H_E) e os Números de alelos.

Locos	Nº de alelos	H_O	H_E
Pc 3	11	0.5444	0.7344
Pc 11	12	0.4809	0.6435
Pc 63	11	0.2445	0.5753
Pc 66	6	0.2356	0.4221
Pc 77	19	0.6356	0.7968
Pc 81	4	0.2469	0.4663
Pc 93	10	0.3379	0.5285
Média	10,42	0.3895	0.5953

Tabela 05: Índices de diversidade genética resultantes dos 7 locos microssatélites analisados para *Pellona castelnaeana* considerando, separadamente, os grupos de indivíduos por localidade de coleta.

Localidades		Pc 3	Pc 11	Pc 63	Pc 66	Pc 77	Pc 81	Pc 93
Tabatinga	Na	7	7	5	4	10	4	4
	H_O	0.78261	0.52174	0.17391	0.17391	0.60870	0.13043	0.21739
	H_E	0.78068	0.70918	0.73043	0.31208	0.84444	0.59807	0.61739
	P	0.00821	0.00178*	0.00000*	0.00834	0.09443	0.00000*	0.00000*
Tefé	Na	6	5	5	4	6	3	6
	H_O	0.71429	0.57143	0.21429	0.42857	0.85714	0.07143	0.42857
	H_E	0.77513	0.81481	0.71693	0.66667	0.82540	0.20370	0.57407
	P	0.02559	0.00000*	0.00000*	0.00516	0.05139	0.03799	0.02096
Coari	Na	6	3	6	3	7	3	4
	H_O	0.60000	0.66667	0.20000	0.40000	0.53333	0.20000	0.40000

	H _E	0.77011	0.60690	0.61839	0.44138	0.79540	0.30115	0.35632
	P	0.10423	0.03134	0.00000*	0.43891	0.01704	0.04833	1.00000
Baixo rio Madeira	Na	4	8	4	5	8	3	4
	H _O	0.50000	0.36364	0.09091	0.36364	0.63636	0.13636	0.18182
	H _E	0.70085	0.64482	0.44397	0.48203	0.84567	0.52960	0.50634
	P	0.12895	0.00168*	0.00000*	0.50504	0.04971	0.00000*	0.00016*
Sub-bacia Boliviana	Na	5	5	5	4	4	3	5
	H _O	0.46154	0.15385	0.38462	0.23077	0.38462	0.38462	0.30769
	H _E	0.68308	0.35077	0.63692	0.60615	0.50154	0.53231	0.66769
	P	0.00385	0.00629	0.00334	0.00231*	0.08483	0.00908	0.00042*
Santarém	Na	3	5	2	2	9	4	3
	H _O	0.36842	0.47368	0.26316	0.05263	0.73684	0.42105	0.36842
	H _E	0.65576	0.62731	0.30868	0.05263	0.86060	0.49929	0.36273
	P	0.01089	0.20402	0.48834	1.00000	0.07246	0.00706	0.60363
Tucuruí	Na	7	7	8	3	12	3	7
	H _O	0.38462	0.61538	0.38462	0.00000	0.69231	0.38462	0.46154
	H _E	0.77538	0.75077	0.57538	0.39385	0.90462	0.60000	0.61538
	P	0.00108*	0.01580	0.02993	0.00020*	0.01335	0.00200*	0.07111

Na: Número de alelos; H_O: heterozigosidade observada; H_E: heterozigosidade esperada; P= significância para o Equilíbrio de Hardy-Weinberg. * indica significância após correção de Bonferroni (P< 0,002380).

Tabela 06: Índices de diversidade genética resultantes dos 7 locos microssatélites analisados para *Pellona castelnaeana* considerando as localidades de coletas.

Localidades	Diversidade gênica média	<i>Fis</i>
Tabatinga	0.656039 +/- 0.364224	0.43746*
Tefé	0.653817 +/- 0.368577	0.28979*
Coari	0.555665 +/- 0.319167	0.23497*
Baixo rio Madeira	0.593325 +/- 0.334006	0.45862*
Sub-Bacia Boliviana	0.568352 +/- 0.327241	0.42993*
Santarém	0.481000 +/- 0.280081	0.20725*
Tucuruí	0.659341 +/- 0.372411	0.37620*

* indica significância após correção de Bonferroni ($P < 0,002380$)

Tabela 07: Valores de Nm (diagonal acima) e F_{ST} (diagonal abaixo) obtidos com Marcadores Microssatélites.

	Tabatinga	Tefé	Coari	Baixo rio Madeira	Sub-bacia Boliviana	Santarém	Tucuruí
Tabatinga	-	2.99552	3.83962	6.44817	2.82261	3.72159	6.80873
Tefé	0.14304*	-	4.42288	5.77099	1.60735	2.62408	4.96181
Coari	0.11522*	0.11157*	-	19.67014	1.84784	12.59040	26.79116
Baixo rio Madeira	0.07196*	0.07973*	0.02479	-	2.60734	21.16863	39.53673
Sub-bacia Boliviana	0.15048*	0.23726*	0.21296*	0.16091*	-	1.60088	2.86869
Santarém	0.11844*	0.16005*	0.03820	0.02307	0.23800*	-	17.65211
Tucuruí	0.06841*	0.09154*	0.01832	0.01249	0.14843*	0.02755	-

*indica significância após correção de Bonferroni ($P < 0,002380$)

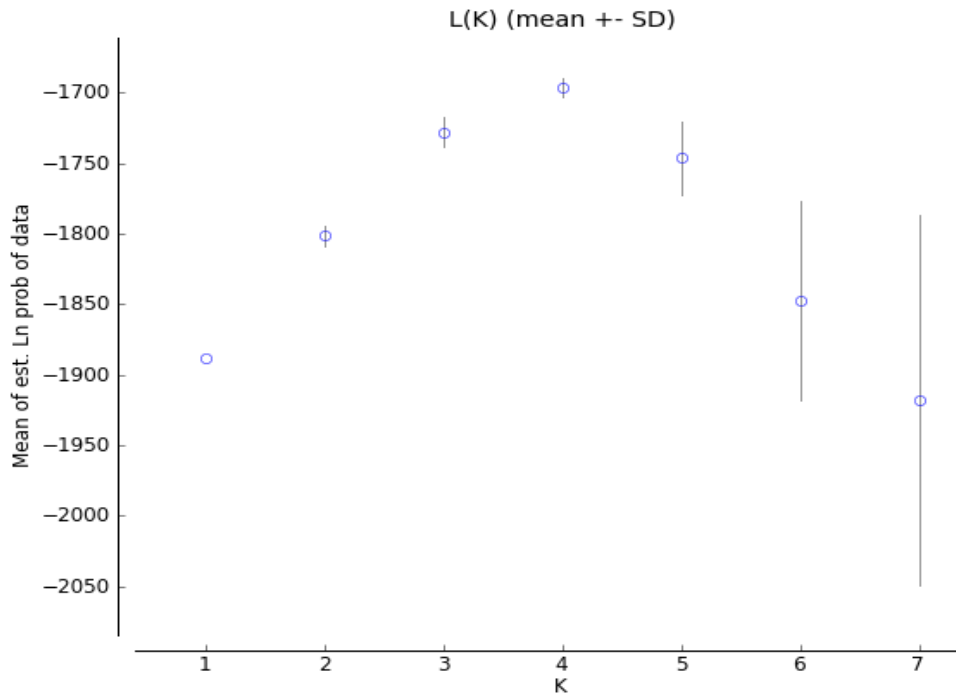


Figura 04: Resultado do *structure*, indicando $k=4$, como a melhor probabilidade para explicar os dados. A vertical mostra a média da estimativa da distribuição das probabilidades dos dados e a horizontal número de *clusters* testados (k) e o desvio padrão (SD) da probabilidade média.

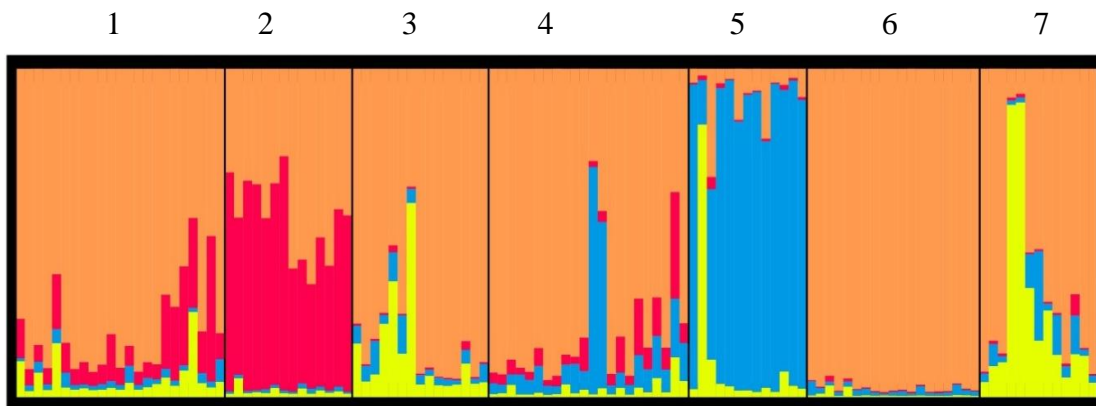


Figura 05: Estrutura populacional baseada em 7 locos de microssatélites de *Pellona castelnaeana* estimado pela análise bayesiana realizada pelo programa *Structure*, onde cada indivíduo é representado por uma linha vertical e cada uma das cores indica um *cluster* baseado em semelhanças genotípicas. Os números de 1 a 7 representam as localidades de coleta: 1 Tabatinga, 2 Tefé, 3 Coari, 4 Baixo rio Madeira, 5 Alto rio Madeira, 6 Santarém e 7 Tucuruí.

4. DISCUSSÃO

4.1 Diversidade Genética

O apapá amarelo está entre as 30 novas espécies de peixes que foram introduzidas para comercialização pelos frigoríficos (Almeida 2006). De acordo com Ikeziri *et al.* (2009) *Pellona* têm sofrido um aumento gradativo na composição do desembarque pesqueiro, chegando a representar até 20% do desembarque total em algumas cidades (percentuais de importância dentro do seu grupo) (Santos *et al.*, 2009). Diante do evidente aumento da exploração desta espécie para fins comerciais, este trabalho representa um importante passo para o conhecimento da genética das populações de *P. castelnaeana* a fim de esclarecer a questão da estrutura e como a diversidade genética desta espécie está distribuída.

A diversidade genética compreende a variedade de alelos e genótipos, e representa o material sobre o qual a seleção natural atua para permitir a adaptação e evolução dos indivíduos e a sua adequação às mudanças ambientais (Frankham *et al.*, 2008). Conhecer os níveis de diversidade genética permite estimar a estruturação e a variabilidade genética e, com o objetivo de entender como essa diversidade está distribuída ao longo da bacia Amazônica utilizou-se sete locos de microssatélites e a região controle do DNA mitocondrial para acessar essa informação.

Os valores de diversidade gênica ($\hat{H}=0.8646$) e nucleotídica ($\pi=0.044236$) obtidos no presente trabalho foram relativamente altos e são congruentes com valores obtidos em estudos utilizando regiões do genoma mitocondrial em outros peixes migradores e semi-migradores da bacia amazônica (tabela 08). Podemos citar como exemplo, os resultados obtidos por Batista e Alves-Gomes (2006) em populações do bagre *Brachyplatystoma rousseauxii*, onde eles observaram um decréscimo da variabilidade genética no sentido leste/oeste (do estuário para as cabeceiras) da calha do rio Amazonas e sugeriram que a variabilidade genética é maior no estuário em função dessa região congrega os indivíduos nascidos nas diferentes cabeceiras do sistema Solimões-Amazonas. Esses altos níveis também foram encontrados por Santos *et al.* (2007) para populações de tambaqui (*Colossoma macropomum*) e por Passos (2009) com jaraqui de escama grossa (*Semaprochilodus insignis*) onde observou-se valores ainda mais altos de diversidade genética. O mesmo também foi reportado por Machado (2009) com *Prochilodus nigricans* na calha do rio Amazonas e principais tributários. Ao contrário, níveis baixos de diversidade genética, foram encontrados por Hrbek *et al.* (2005) analisando populações de pirarucu (*Arapaima gigas*) provavelmente como sinal de sobreexploração dos estoques naturais desta espécie (tabela 08).

Tabela 08: Comparações de índices de variabilidade genética obtidos com o uso de DNAm (D-loop) para espécie em estudo e outros peixes amazônicos.

Espécies	N	Nº hapl.	\hat{H}	Π	Referência bibliográfica
Apapá amarelo (<i>P. castelnaeana</i>)	175	49	0.8684	0.0457	Presente estudo
Curimatã (<i>Prochilodus nigricans</i>)	390	205	0.9317	0.0181	Machado, 2009
Tambaqui (<i>Colossoma macropomum</i>)	537	444	0.998	0.0124	Santos, 2010
Dourada (<i>Brachyplatystoma rousseauxii</i>)	105	66	0.8381	0.0092	Batista, 2010
Pescada (<i>Plagioscion squamosissimus</i>)	81	54	0.9778	0.0163	Galletti, 2009
Pirarucu (<i>Arapaima gigas</i>)	139	34	0.5537		Hrbek <i>et al.</i> , 2005

N= número de indivíduos, Nº hapl.= número de haplótipos, \hat{H} = diversidade gênica (haplótipica) e Π = diversidade nucleotídica.

A diversidade genética na forma de heterozigossidade (observada e esperada) obtida de marcadores microssatélites das populações de *P. castelnaeana* também pode ser comparativamente classificada de moderada a alta, tendo as outras espécies de peixes valores relativamente mais altos, como os obtidos para dourada (Batista 2010), piramutaba (Rodrigues, 2009), tambaqui (Santos, 2010; Farias *et al.* 2010), pirapitinga (Escobar, 2013), surubim (Machado 2013; Telles, 2014), ou seja, os valores de diversidade genética obtidos com marcadores microssatélites são relativamente similar aos obtidos pra maioria dos peixes amazônicos migradores e semi-migradores.

A diversidade genética é a variedade de alelos e genótipos e a heterozigossidade é número de indivíduos heterozigotos presente na população, e esse índice é usado para caracterizar essa diversidade (Frankham *et al.*, 2008).

Tabela 09: Comparações de índices de variabilidade genética obtidos com o uso de marcadores microsatélites para espécie em estudo e outros peixes amazônicos

Espécies	Nº locus	Ar	H _O	H _E	Referência bibliográfica
<i>Pellona castelnaeana</i>	7	10,4	0.000-0.857	0.052-0.905	Presente estudo
<i>Pseudoplatystoma punctifer</i> (surubim)	10	10,4	0.072-0.866	0.088-0.928	Machado, 2013
<i>Semaprochilodus insignis</i> (jaraqui)	16	16,3	0.516-0.968	0.574-0.973	Passos <i>et al.</i> , 2010
<i>Colossoma macropomum</i> (tambaqui)	14	4-21	0.320-0.920	0.491-0.951	Santos <i>et al.</i> , 2008
<i>Brachyplatystoma rousseauxii</i> (dourada)	30	2-22	0.286-0.914	0.353-0.929	Batista <i>et al.</i> , 2010
<i>Astronotus crassipinnis</i> ()	13	3	0.000-0.720	0.25-0.58	Sousa <i>et al.</i> , 2009
<i>Osteoglossum bicirrhosum</i> (aruanã)	19	3,6	0.045-0.761	0.045-0.674	Silva, 2009
<i>Symphysodon</i> (acarã-disco)	13	11,5	0.00-1,00 (0,4-0,5)	0.01-0.96 (0,2-0,3)	Amado <i>et al.</i> , 2011

Nºlocus= número primers, Ar= riqueza alélica, Ho=heterozigiosidade observada e He= Heterozigiosidade esperada.

Analisando peixes ciclídeos que em geral possuem cuidado parental e são sedentários, Amado *et al.* (2008) estudando o gênero *Symphysodon* e Sousa *et al.* (2009) com a espécie *Astronotus crassipinnis* observaram baixa diversidade genética. Silva *et al.* (2009) também observaram baixa diversidade em aruanã branca (*Osteoglossum bicirrhosum*), nesse grande osteoglossídeo que também é sedentário e possui cuidado com a prole. A baixa diversidade observada nesses peixes pode ser

atribuída à ecologia dessas espécies que desempenham cuidado com prole e não empreendem grandes migrações para fins reprodutivos. Farias *et al.* (2003) e Hrbek *et al.* (2007) observaram baixos valores de diversidade para o pirarucu (*Arapaima gigas*), peixe muito explorado e, esses baixos valores podem ser atribuídos ao reduzido tamanho efetivo populacional da espécie. De acordo com Frankham (2002) a baixa diversidade reduz o potencial evolutivo e reduz a capacidade dos indivíduos em responder e se adaptar a mudanças ambientais.

Alta diversidade geralmente é vista em espécies com tamanho efetivo populacional grande, exogâmicas e panmíticas. Estudando pimelodídeos migradores, Rodrigues *et al.* (2009) com a piramutaba (*Brachyplatystoma vaillantii*), Batista *et al.* (2010) com a dourada (*Brachyplatystoma rousseauxi*), e Machado (2013) com *Pseudoplatystoma punctifer* observaram altos valores de diversidade genética. Santos *et al.* (2008 e 2010) e Farias *et al.* (2010) estudando populações de tambaqui (*Colossoma macropomum*) também observaram alta diversidade para essa espécie. Dados ecológicos apontam que o tambaqui é uma espécie semi-migradora e dados genéticos mostraram que é uma população panmítica. Então, espécies que possuem tamanho efetivo populacional grandes com intenso fluxo gênico e que não encontram-se sobre-exploradas tendem a apresentar altos níveis de diversidade genética.

4.2 Estrutura populacional

Para os marcadores mitocondriais e microssatélites os resultados foram concordantes e evidenciaram uma subestruturação entre a bacia Amazônica e a sub-bacia Boliviana. Entre o alto rio Madeira (sub-bacia Boliviana) e as demais localidades da bacia Amazônica amostradas foi encontrado um fluxo gênico restrito, o que pode ser indicativo de que as corredeiras do rio Madeira poderiam estar atuando (ou ter atuado) como barreiras restringindo o fluxo gênico para esta espécie. A migração permite entrada e saída de genes em uma população, o que gera uma alta e homogênea diversidade genética. Estruturação entre a bacia Amazônica e a sub-bacia Boliviana tem sido reportada para várias espécies de peixes amazônicos (Escobar, 2013; Farias *et al.*, 2010; Machado, 2009). Os dados obtidos através da análise bayesiana mostraram subestruturação para as populações da bacia boliviana, alto rio Madeira, esses dados foram obtidos tanto através da região controle do DNAm quanto através dos locos de microssatélites. Resultados anteriores como aqueles obtidos por Machado (2009) com populações de curimatã (*Prochilodus nigricans*), Farias *et al.* (2010) com populações de tambaqui (*Colossoma macropomum*) e Escobar (2013) com a pirapitinga (*Piaractus brachypomus*) também mostraram que as corredeiras do rio Madeira restringem o fluxo gênico, ou seja, atuam (ou atuaram)

como barreiras ecológicas limitando a migração desses peixes. No entanto, para os peixes altamente migradores como a dourada (*Brachyplatystoma rousseauxii*) (Batista, 2010) e surubim (*Pseudoplatystoma punctifer*) essas corredeiras não constituem (não constituíram) (Machado, 2013; Telles, 2014) barreiras ao fluxo gênico.

O resultado da análise de variância molecular tanto de dados do DNAm quanto de locos de microssatélites ($\Phi_{ST} = 0,3172$; $F_{ST} = 0,1448$, respectivamente), mostraram uma estruturação genética entre indivíduos da bacia Amazônica e sub-bacia Boliviana. A variação intra populacional foi maior, mostrando que a maior variabilidade genética encontra-se distribuída dentro das populações amostradas. Esses resultados sugerem que existe uma subestruturação em relação aos indivíduos pertencentes a sub-bacia Boliviana provavelmente causada pelas cachoeiras do alto rio Madeira como barreiras ao fluxo gênico.

As corredeiras do alto rio Madeira têm sido sugeridas como uma grande barreira à migração para várias espécies de organismos aquáticos e, limitantes a distribuição de inúmeras outras (Goulding, 1979; 2003). O papel das corredeiras do rio Madeira na diferenciação populacional ou de unidades evolutivas entre as bacias da Bolívia e da Amazônia foi proposto para o boto cor de rosa *Inia geoffrensis* (Banguera-Hinestroza *et al.*, 2002; Gravena *et al.*, 2014), para tartaruga da Amazônia *Podocnemis expansa* (Pearse *et al.*, 2006), para o peixe-agulha *Potamorhaphis eigenmanni* (Lovejoy e Collette, 2001) entre outros. Esta região também tem sido reportada como uma área de transição/contato entre diferentes espécies do gênero *Caiman* (Hrbek *et al.*, 2008) e anuros (Simões *et al.*, 2012).

Os resultados obtidos pelos dados de microssatélites também indicaram na bacia Amazônica uma estruturação nas populações de Tefé e Tabatinga (Figura 04). Esta estruturação entre leste-oeste na calha do rio Amazônica já foi reportada para outras espécies de peixes, como o aruanã (Silva, 2009) e o pirarucu (Leão, 2009), sendo explicada como um efeito do antigo arco do Purus na separação de populações. O efeito deste evento na estrutura genética das populações foi observado na separação das formas “verde” e “azul” do acará-disco, *S. aequifasciatus* nas porções Oeste e Leste respectivamente (Ready *et al.*, 2006; Farias e Hrbek, 2008). O arco do Purus é uma falha geológica situada a montante de Coari, e pode estar relacionada com a divisão faunística da bacia Amazônica ocidental e oriental (Hubert e Renno, 2006; Wesselingh e Salo, 2006). O arco do Purus foi formado durante as últimas fases da elevação da Cordilheira dos Andes (Cordani *et al.*, 2000; Gregory-Wodzicki, 2000) e, quando o fluxo com o mar caribenho foi interrompido, o arco foi provavelmente “quebrado” e o rio Amazonas inverteu sua direção e começou a fluir na direção leste (Lundberg *et al.*, 1998) no seu curso atual.

Lundberg *et al.* (1998) sugerem que a quebra do arco é de aproximadamente 8-6 milhões de anos atrás, no entanto, pesquisas mais recentes (Cordani *et al.*, 2000; Vega, 2007) sugerem que a quebra ocorreu muito mais recentemente. Com base em evidências tectônica, Cordani *et al.* (2000) sugerem 3 milhões de anos, enquanto Vega (2007) com base em estudo de depósitos sedimentares entre as cidades de Tefé e Coari sugere o fim do período neogênico, ou seja, no final do Plioceno em aproximadamente 1,8 milhões de anos atrás.

Para os indivíduos do baixo Tocantins também foi observada uma estruturação genética, o que pode estar relacionada ao fato de o rio Tocantins estar inserido em outra bacia de drenagem, a bacia Tocantins-Araguaia. Esta bacia não está diretamente conectada a bacia Amazônica e, é considerada por muitos pesquisadores como não integrante da bacia Amazônica, uma vez que não deságua diretamente no rio Amazonas e sim no rio Pará, ao Sul da ilha de Marajó. O rio Pará tem uma ligação com o rio Amazonas através do canal de Tagipuru, um canal estreito na parte oeste da ilha do Marajó. Neste sentido, o sistema Tocantins-Araguaia pode ser tecnicamente considerado uma bacia a parte da bacia Amazônica. No entanto, o fim da conexão desse sistema com a bacia Amazônica se deu no fim do Plioceno cerca de 1.8 milhões de anos atrás (Rossetti e Valeriano, 2007). Recentemente tem sido reconhecido que as espécies atualmente compartilhadas entre as duas bacias podem representar espécies, unidades evolutivas ou unidades de manejo diferentes. Por exemplo, o recente trabalho do Amaral *et al.* (2013) demonstrou a existência de um espécie irmã (*Colomesus tocantinensis*) de *Colomesus asellus* da bacia Amazônica. De maneira análoga, indivíduos de *Arapaima gigas* (Leão, 2009) e da tartaruga da Amazônia *Podocnemis expansa* (Pearse *et al.*, 2006) do rio Araguaia mostram forte diferenciação em relação aos indivíduos da bacia Amazônica. Os botos do rio Araguaia também mostram diferenças genéticas e morfológicas em comparação com aqueles da bacia Amazônica e, recentemente foram considerados uma nova espécie *Inia araguaiaenses*, com um tempo de divergência estimado de 2.08 mya (Hrbek *et al.*, 2013). Desta maneira, a diferenciação dos indivíduos de *P. castelnaeana* da drenagem do baixo Tocantins em relação aos indivíduos da bacia Amazônica pode estar associada a separação das bacias e portanto, populações dessa espécie devem ser consideradas e tratadas como unidades de manejo diferenciadas.

As diferenciações genéticas observadas nas populações de *P. castelnaeana* dentro da bacia Amazônica e, entre essa e a sub-bacia Boliviana, não foram explicadas pelo isolamento por distância, uma vez que não houve correlação entre a divergência genética e a distância geográfica. Essas diferenciações encontradas parecem estar mais associadas com eventos geológicos que separaram ou estão separando a Amazônia em macrorregiões. No entanto, essa diferenciação que dividiu a Amazônia

em macrorregiões não foi mostrado nas análises utilizando o DNAm (D-loop), esse marcador apesar de ter sido concordantes com microssatélites indicado quatro grupos biológicos, foi discordantes e sugeriu que a população da bacia Amazônica é formada por uma população panmítica. Essa discrepância mitonuclear poder ser sugerida por homoplasia, seleção, migração tendenciosa assimétrica de um dos sexos e tamanho efetivo populacional são geralmente aceitos como explicações para diferentes graus de diferenciação entre populações (Larmuseau *et al.*, 2010).

Os resultados dessa pesquisa devem ser considerados como um ponto de partida para um melhor conhecimento sobre a biologia e distribuição da diversidade genética dentro de *P. castelnaeana*.

5. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos através dos marcadores microssatélites e região controle do DNAm foram concordantes e indicaram que as populações de *P. castelnaeana* da bacia Amazônica possuem uma estruturação genética em relação as populações da sub-bacia Boliviana, indicando que as corredeiras do alto rio Madeira podem ter atuado como barreiras restringindo o fluxo gênico, indicando assim a existência de diferentes Unidades Evolutivas Significantes em cada bacia. Os resultados a partir da região controle do DNAm indicaram que na bacia Amazônica essa espécie é formada por uma população panmítica e os marcadores microssatélites indicaram uma estruturação populacional dividido a bacia Amazônica em megarregiões geográficas.

Capítulo III

Evidências de duas Unidades Significantes Evolutivas em apapá branco (*Pellona flavipinnis*; Pristigasteridae) na bacia Amazônica

RESUMO

A família Pristigasteridae é representada por três gêneros na Amazônia, dentre os quais está o gênero *Pellona* conhecido popularmente como apapá ou sarda. Esses peixes fazem parte de um grupo pouco estudado nos vários aspectos de sua biologia, sendo uma dessa a espécie *Pellona flavipinnis*. O presente trabalho teve como objetivo entender como a diversidade genética desta espécie está distribuída na bacia Amazônica, para tanto foi genotipado 79 indivíduos com 7 locos de microssatélites, sequenciado um fragmento de 588 pares de bases do gene Citocromo Oxidase da subunidade I de 99 indivíduos e, 555 pares de bases da região controle do DNAm de 114 indivíduos provenientes de 11 localidades na bacia Amazônica, sendo quatro localidades na calha, duas localidades a jusante e montante das corredeiras do alto rio Madeira e cinco outros tributários do rio Amazonas. O resultado da análise de agrupamento de vizinhos através do método de distância e, da análise de Máxima Verossimilhança pelo método probabilístico a partir da região controle do DNA mitocondrial e do gene COI analisados separadamente e concatenados mostraram a existência de duas linhagens (A e B) distintas dentro de *P. flavipinnis*. A distância genética entre as linhagens A e B foi de 2.3%. O método bayesiano a partir da região controle do DNAm indicou a existência de três grupos biológicos para esta espécie, e esta análise bayesiana a partir de sete locos microssatélites indicou a existência de dois grupos biológicos. Dados obtidos de ambos marcadores mitocôndrias mostraram alta diversidade dentro da linhagem B. Esses resultados mostram a ocorrência de diferentes linhagens (A e B) dentro de uma mesma localidade, indicando um modelo de sub-estruturação, onde a espécie *P. flavipinnis* compõem unidades reprodutivas geneticamente diferenciadas.

Palavras chaves: Região Controle, COI, Microssatélites, Unidades diferenciadas, Apapá branco.

1. INTRODUÇÃO

A bacia Amazônica é um dos ecossistemas com maior diversidade de peixes (Goulding, 2003). O número de espécies de peixes ainda é incerto, sendo comum a descrição de novas espécies, mesmo sendo algumas delas já exploradas pela pesca comercial, com diversos grupos ainda carecendo de uma revisão mais atualizada (Barthem e Fabré, 2004). Segundo Lundberg *et al.* (2000) apenas aproximadamente 40% da fauna de peixes de água doce da bacia Amazônica é conhecida, e novas espécies estão sendo descritas constantemente e de acordo com estimativas recentes o número de espécies de peixe de água doce é estimado em 13.000 (Eschmeyer, 2014).

A diversidade ictica da Amazônia é grande, e apresenta vários grupos pouco estudados, entre eles estão as espécies da ordem Clupeiformes. Na Amazônia esta ordem é representada pela família Pristigasteridae e pelos gêneros *Ilisha*, *Pristigaster* e *Pellona* (de Pinna e Di Dario, 2003; Santos *et al.*, 2006). Para de Pinna e Di Dario (2003) o *status* taxonômico dos representantes de Pristigasteridae tem sido objeto de pouco estudo e precisa ser reavaliado. Para eles existem outras espécies não descritas de *Pellona* e, possivelmente em *Ilisha* na região neotropical.

Pellona flavipinnis é uma espécie com ampla distribuição geográfica, foi descrita para Argentina (Buenos Aires) rio da Prata, mas ocorre também na bacia do Paraná/Prata, bacia Amazônica, bacia do rio Parnaíba, bacia do Orinoco (Venezuela e Colômbia), e Guianas (Suriname e Guiana) (Whitehead, 1985; de Pinna e Di Dario, 2003). É uma espécie considerada carnívora alimentando-se principalmente de peixes juvenis e insetos aquáticos (Moreira-Hara *et al.*, 2009), com hábitos diurnos, pelágica, desova total (Araújo, 2009; Severi e Verani, 2006) e, realiza migrações para fins reprodutivos (Cox-Fernandes, 1997 e Nakatami *et al.*, 2001).

Através da análise de 34 caracteres morfométricos e merísticos realizados em 359 exemplares, depositados em coleções ictológicas nacionais e estrangeiras, Melo (2001) sugeriu duas novas espécies para as espécies sul-americanas do gênero *Pellona*. Segundo Di Dario *apud* (2013), como resultado desta revisão taxonômica no gênero *Pellona*, Melo sugeriu que *P. flavipinnis* é um complexo de espécies formada por pelo menos três grupos.

Com o objetivo de investigar esse possível complexo de espécies existente dentro de *P. flavipinnis*, foram utilizados dois segmentos do DNA mitocondrial, a região controle e o gene COI. A região controle do DNAm devido sua alta variabilidade mostra-se útil para análise de relações entre táxons que divergiram recentemente tais como populações e espécies. Esta região tem sido amplamente utilizada para estudos de filogeografia de peixes (Farias e Hrbek, 2008) assim como estudos

populacionais (Farias *et al.*, 2010). O gene COI é o marcador proposto por Hebert *et al.* (2003), como ferramenta molecular para amparar a taxonomia e sistemática clássica. Este gene tem sido utilizado como um código de barras para identificação, classificação e sinalização de novas espécies, utilizando 648 pb da sequência deste gene (Hajibabaei e McKenna, 2012).

A metodologia proposta para o *barcoding* assume que a divergência intraespecífica seja menor do que a divergência interespecífica (*barcoding gap*) e monofilia recíproca de forma a permitir o posicionamento correto de um espécime à sua espécie. Este modelo utiliza métodos de distância para construção de árvores para definir espécie usando o critério de monofilia. Diversos trabalhos demonstraram que esta metodologia é eficiente para identificar e sinalizar complexo de espécies. Hebert *et al.* (2004) identificaram através deste código de barras 10 espécies crípticas de borboleta. No entanto, esse método não é eficiente para identificar introgressão e/ou hibridação (Hebert *et al.*, 2003).

Para os críticos do DNA *barcoding* esse método não permite comparar espécies irmãs, os principais candidatos a compartilhar haplótipos e mostrar pequena diferença genética interespecífica (Moritz e Cicero, 2004). Os estudos atuais de DNA *barcoding* tendem a subestimar a variabilidade intraespecífica, pois não usam um número razoável de indivíduos e não amostram a diversidade dentro da distribuição geográfica, o que minimiza a chance de representar a variação intraespecífica existente na espécie (DeSalle *et al.*, 2005).

Com o objetivo de conservar e manejar populações diferenciadas surgiu o conceito de Unidades que devem obedecer critérios como o de: monofilia recíproca para o DNAm e divergências significativa nas frequências alélicas para os locus nucleares, esses táxons ou linhagens são chamadas Unidades Evolutivas Significantes (*ESUs*), neste caso, essa unidade necessita de manejo à longo prazo (Moritz, 1994). Populações que apresentam uma separação filogenética incompleta e uma menor, porém significativa diferença nas frequências alélicas são chamadas de Unidades de Manejo (*MUs*), nesta Unidade o modelo levado em consideração é a estrutura populacional atual sendo necessário um manejo à curto prazo (Moritz, 1994). Neste trabalho aplicaremos o termo de Unidades Evolutivas para testarmos a presença de diferentes grupos dentro de *P.flavipinnis* na bacia Amazônica.

Estudos prévios realizados com um número reduzidos de indivíduos *P. flavipinnis* (Ximenes, 2011) na região de Santarém a partir de COI, região controle do DNAm e 13 medidas morfométricas sugeriram a existência de dois grupos diferentes naquela região. Estes resultados prévios serão mostrados como um estudo de caso dentro do contexto do estudo das unidades evolutivas em *P. flavipinnis*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Amostras populacionais e suas localidades

As amostras foram obtidas em mercados com desembarque de pesca artesanal, através de coletas zoológicas do Laboratório de Evolução Genética Animal (LEGAL-UFAM), coletas do Laboratório de Zoologia da Universidade Federal do Pará (Campus Altamira), Laboratório de Biodiversidade e Genética Animal da Universidade Federal do Oeste do Pará, e de parceira com a Universidade Federal de Rondônia (UNIR). Para cada exemplar, foi coletado parte da nadadeira peitoral e em seguida preservado em álcool 96% para posteriores análises laboratoriais. No total foram amostrados 11 localidades na bacia Amazônica (Figura 01) (tabela 01).

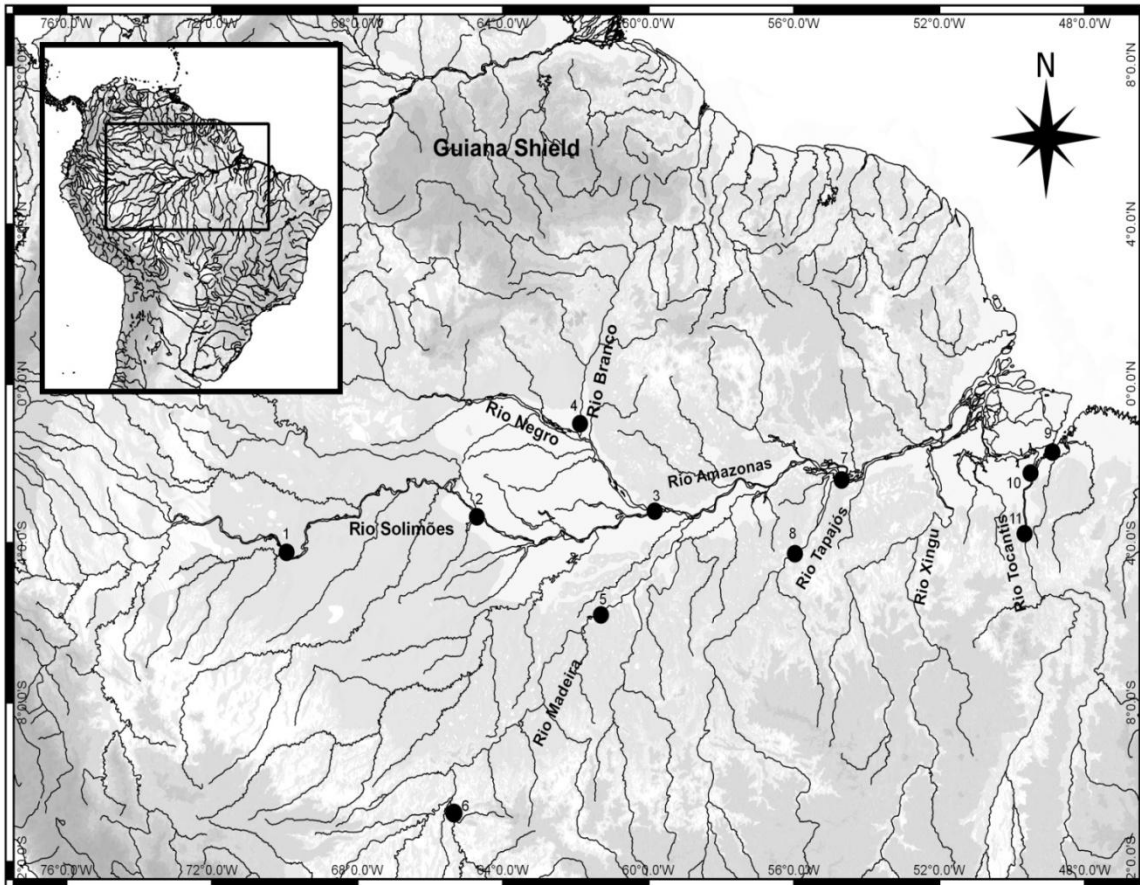


Figura 01: Mapa geográfico com as localidades amostradas.

Tabela 01: Localidades, rios e números de indivíduos coletados.

Localidades	Nº de indivíduos analisados		
	<i>D-loop</i>	COI	Microsatélites
1-Tabatinga (rio Solimões)	8	8	-
2-Tefé (rio Solimões)	4	-	-
3-Manaus (rio Amazonas)	19	25	40
4-Baixo rio Branco (rio Branco)	1	1	-
5-Baixo rio Madeira (rio Madeira)	17	8	-
6-Alto rio Madeira (rio Guaporé)	5	5	-
7-Santarém (rio Amazonas/Tapajós)	16	12	
8-Itaituba (rio Tapajós)	4	-	-
9-Abaetetuba (rio Tocantins)	19	11	20
10-Cametá (rio Tocantins)	3	6	-
11-Tucuruí (rio Tocantins)	18	12	13
TOTAL	114	99	73

2.2 Extração de DNA

O DNA total de cada indivíduo foi extraído pelo método fenol clorofórmio (Sambrook *et al.*, 1989). O processo consiste basicamente de lise celular através da digestão com proteinase K (10mg/mL) e solução de SDS. As amostras foram incubadas e posteriormente lavadas com fenol/clorofórmio/álcool isoamílico e clorofórmio/álcool isoamílico e precipitadas com etanol 70%, ressuspendidas em tampão TE (10mM Tris-HCl pH 8.0, 1mM EDTA) e mantidas em freezer a -20°C. A qualidade das amostras foi observada através do gel de agarose 1%, corado com *Gel red* e azul de bromofenol. A quantificação foi realizada através de espectrofotômetro Nanodrop 2000 e o DNA foi diluído em uma concentração final variando de 30-50 ng/μl.

2.3 Amplificação e purificação da região controle e gene COI do DNA mitocondrial

A região D-loop foi amplificada via PCR (reação em cadeia da polimerase), com volume total de 15μl: contendo 6.5 μl de ddH₂O, 1.2 μl de DNTP (2,5mM), 1.5μl tampão 10X (100mM Tris-HCl, 500mM KCl), 1.2μl de MgCl₂ (25mM), 1.5μl do primer DLB-D (AGCRYCGGTCTTGTAATCCG) e 1.5 μl do primer DLA-R (AGTCAGGACCAARCCT TTGTGC) (Montoya-Burgos, 2003), (2 pMol) e 0.5μl de Taq (2U/μl), 1μL de DNA. O perfil de amplificação: pré-aquecimento, a 92 °C por 35

segundos, desnaturação, a 92 °C por 35 segundos, anelamento a 60°C por 35 segundos, e extensão a 72 °C por 1 minuto repetidos por 35 ciclos e uma extensão final de 72 °C por 5 minutos.

O COI foi amplificado com volume total de 15µl: contendo 7.6 µl de ddH₂O, 1.2 µl de DNTP (2,5mM), 1.5µl tampão 10X (100mM Tris-HCl, 500mM KCl), 1.2µl de MgCl₂ (25mM), 1.2 µl de cada primer (2pmol) COI-Fish-f.2 (F 5´-GTA AAA GGA CGG CCA GTT TRT GGR GC-3´) e COI-Fish-r.1 (5´-TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGT ACT TC), desenvolvidos por Ivanova *et al.* (2007) 0.3µl de Taq (2U/µl), 1µL de DNA. O perfil de amplificação: pré-aquecimento, a 73 °C por 1minuto, desnaturação, a 93 °C por 10 segundos, anelamento a 56°C por 45 segundos, e extensão a 72 °C por 1minuto e 30 segundos repetidos por 35 ciclos e uma extensão final de 72 °C por 6 minutos.

A eficiência das amplificações foi verificada utilizando-se 2µl do produto de PCR com 2µl de corante azul de bromofenol e *gel red* e em seguida aplicados em gel de agarose 1%. Utilizou-se um marcador de peso molecular conhecido para posterior comparação.

A purificação dos produtos de PCR foi realizada com intuito de eliminar os produtos de baixo peso molecular que não foram incorporados na reação de amplificação como sais, *primers* e dNTPs. Nesta etapa utilizou-se as enzimas Exonuclease e Shrimp Phosphatase Alcaline (ExoSap) submetidos a temperatura ideal para otimização da atividade enzimática.

2.4 Sequenciamento da região controle e do gene COI do DNA mitocondrial

As reações de sequenciamento foram realizadas em placa específica (para eletroinjeção no sequenciador automático), com um volume final de 10 µl por amostra, contendo: DNA purificado, o *primer sense* e o kit BigDye terminator (Life Technologies), contendo DNA polimerase, dNTPs e ddNTPs (dideoxinucleotídeos) que possuem fluorescência a ser captada pelo sequenciador, seguindo o protocolo do fabricante. O produto da reação de sequenciamento foi precipitado com EDTA/Etanol e, ressuspendido em 10 µL de formamida. A placa foi então injetada e as sequências resolvidas no sequenciador automático ABI 3130xl (Applied Biosystems). A metodologia dessa reação é padrão, sendo a mesma para cada região amplificada substituindo apenas o *primer*, pois este é específico para cada fragmento amplificado.

2.5 Alinhamento e edição das sequências

A conferência e edição das sequências foi realizada no programa BioEdit (Hall, 1999). Para o alinhamento múltiplo das sequências obtidas tanto do gene COI quanto da região Dloop utilizou-se a ferramenta Clustal W (Thompson *et al.* 1996) contida também no programa BioEdit (Hall, 1999).

2.6 Reação de genotipagem

A amplificação dos microssatélites de acordo com Ximenes *et al.* (2014), consistiu no volume final de 10 μ l: contendo 3.4 μ l de ddH₂O, 1.0 μ l de DNTP (2,5mM), 1.0 μ l tampão 10X (100mM Tris-HCl, 500mM KCl), 1.5 de MgCl₂ (25mM), 1.0 μ l do primer *reverse*, 0.5 μ l do primer *forward*, 0.5 μ l da “cauda” M13 e 0.3 μ l de Taq (2U/ μ l). O termociclador foi programado pra uma desnaturação inicial a 94⁰C por 1min, seguido de 25 ciclos consistindo de 30seg a 94⁰C para ocorrer desnaturação, 60⁰C por 30seg para ocorrer anelamento dos *primers* específicos, 68⁰C por 40seg para ocorrer à extensão, seguido de 30 ciclos adicionais para desnaturação 94⁰C por 20 seg, 52⁰C por 30 seg para ocorrer o anelamento do primer M13 marcado com fluorescência FAM e 72⁰C por 1 min para ocorrer extensão, e uma extensão final de 72⁰C por 30 min. Os produtos da amplificação foram visualizados através de eletroforese em gel de agarose 1%. As reações de genotipagens foram preparadas com 1.0 μ l de produto de PCR diluído, 1.0 μ l do marcador *Rox* (6-carboxi-X-rodamina) e 8.0 μ l de formamida e genotipadas em sequenciador automático ABI 3130xl (Applied Biosystems). O tamanho dos alelos (em pb) foi estimado usando o *software* específico para genotipagem *GeneMapper*TM versão 4.0.

2.7 Análises Genéticas

2.7.1 Região Controle e gene COI do DNA mitocondrial

Para as sequências de COI utilizou-se a metodologia do DNA *Barcode*. Assim, os grupos foram determinados utilizando o método de Agrupamento de Vizinhos (*Neighbour-joining*, NJ) (Saitou e Nei, 1987) e para correção das distâncias nucleotídicas utilizou-se o modelo Kimura-2-parâmetros (K2P) (Kimura, 1980), a confiabilidade de cada nó foi estimada pelo método de *bootstrap*, com 1000 réplicas (Felsenstein, 1985). O algoritmo de distância NJ é usado para o DNA *barcoding*, porque é simples e rápido para análises de grandes volumes de dados. As análises filogenéticas de NJ e os cálculos de distância genética foram realizados no programa Mega 5 (Tamura *et al.*, 2011).

Os dados de sequências de COI gerados neste trabalho foram analisados em conjunto com sequências obtidas na plataforma do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) de duas espécies de *Pellona*:

P. ditchela, *P. harroweri* e a espécie *P. castelnaeana* (dados obtidos na própria dissertação). A partir deste banco de dados gerou-se uma árvore de *NJ*, utilizando o método de Kimura-2-parâmetros.

Os resultados realizados com as sequências da região controle e do gene COI separadamente foram semelhantes, e estes dois fragmentos foram concatenados para realização das análises com informação de uma região maior do genoma mitocondrial.

A partir do banco de dados com as sequências concatenadas realizou-se análise de máxima verossimilhança (MV) que é um método de inferência filogenética que procura a árvore que melhor explica a evolução observada nas sequências, tendo em vista o modelo de evolução molecular que melhor explica a variância dos dados apresentados. O modelo de substituição nucleotídica adequado para esse banco de dados foi J1, que considera as transições. A MV e o modelo de substituição foram obtidos com auxílio do programa *Treefinder* (Jobb *et al.*, 2011). A consistência de cada nó foi avaliada através da análise de *bootstrap*, realizadas com 10.000 réplicas.

Através do método bayesiano foi estimado o número de grupos biológicos, usando o programa BAPS (*Bayesian Analysis of Genetic Population Structure*) versão 6 (Corander *et al.*, 2013). Esses dados sobre as populações geneticamente estruturadas foram obtidos com base nos dados de sequências do DNAm.

2.7.2 Marcadores Microsatélites

Para a inferência do número de grupos biológicos usamos a análise bayesiana implementada pelo *Structure* (Pritchard *et al.*, 2000), que atribui indivíduos a um número K de populações assumindo equilíbrio de Hardy Weinberg (EHW) e ausência de desequilíbrio de ligação (DL) entre os locos analisados dentro de cada população. Foi usado o modelo de mistura (*admixture model*) que assume que cada indivíduo pode ter ancestrais de mais de uma população e opção de frequências alélicas correlacionadas entre populações (*correlated allele frequencies between populations*), esta opção é sensível para identificação de populações sub-estruturadas (Falush *et al.*, 2003). Foram realizadas dez réplicas (*runs*) para cada valor de K entre 1 e 10 com valores de corte (*burnin*) de 100.000 permutações e 1.000.000 simulações em Cadeias de Monte Carlo (MCMC). O número de populações esperado é o valor de K máximo estimado pelo modelo *log-likelihood* ($\log(P(X/K))$) (Falush *et al.*, 2003).

2.8 Análise morfométrica: *P. flavipinnis* de Santarém como estudo de caso

Foram coletados dados morfométricos de 15 indivíduos da espécie *P. flavipinnis*, provenientes do rio Tapajós e Amazonas das proximidades da cidade de Santarém. Os indivíduos foram coletados em três coletas. Foram obtidas 13 medidas morfométricas: comprimento total (mm), comprimento padrão (mm), comprimento da forquilha (mm), comprimento pré-orbital (mm), comprimento do olho (mm), distância pós-orbital (mm), comprimento da cabeça (mm), comprimento da nadadeira dorsal (mm), comprimento da nadadeira peitoral (mm), comprimento da nadadeira pélvica (mm), comprimento da nadadeira anal (mm), comprimento do pedúnculo caudal (mm) e altura do corpo (mm) (Ximenes, 2011). Essas variáveis foram obtidas utilizando-se uma régua metálica com precisão de 1 mm e paquímetro com 0,05 mm de precisão.

Foram feitas duas análises. Primeiro, os dados foram sumarizados usando componentes principais (PCA), e o primeiro e segundo componentes foram plotados. Segundo, o efeito do tamanho foi retirado antes de análises de componentes principais. O efeito do tamanho foi retirado pela regressão linear sendo que o comprimento padrão foi a variável independente. Subsequentemente a dimensionalidade dos resíduos foi reduzida pela análise de componentes principais, e o primeiro e segundo componentes foram plotados. Adicionalmente testamos se existe diferença no tamanho e forma (componentes principais da primeira análise) e/ou da forma (componentes principais da segunda análise) usando os primeiros eigenverctores que juntos explicaram 80% da variância e implementando um modelo de análise de variância multivariada. As análises foram feitas usando o pacote estatístico R (Core Team, 2011).

3. RESULTADOS

3.1 Região controle e gene COI do DNA mitocondrial

Foram obtidas 99 sequências com 583 pares de base para o gene Citocromo Oxidase da subunidade I e 114 sequências com 555 pares de base para região controle de DNAm. A árvore de distância genética gerada pelo método de agrupamento de vizinhos (*NJ*) separou a espécie de *P. flavipinnis* em duas linhagens distintas (referidas como linhagens A e B), sendo que a linhagem B possui dois grupos estruturados (Figura 02), este resultado foi obtido a partir da análise das sequências da região controle do DNAm e COI analisadas separadamente e concatenadas.

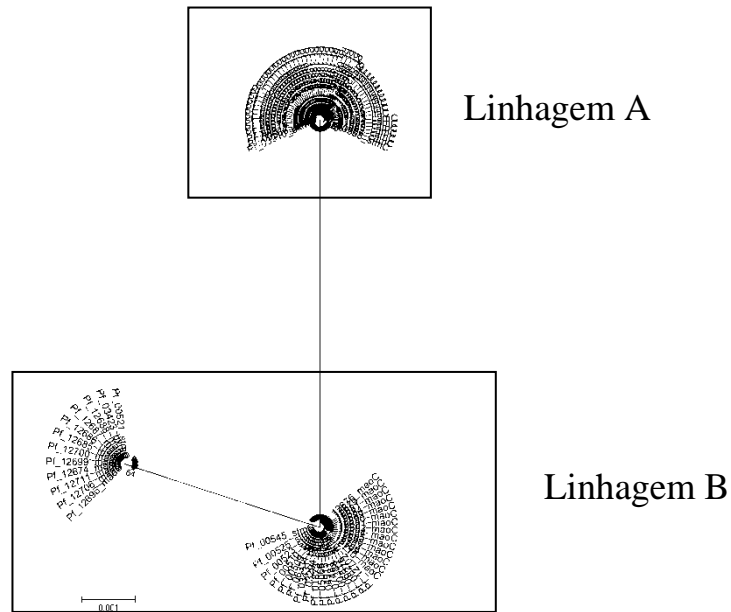


Figura 02: Árvore Neighbour-Joining da divergência nucleotídica das sequências de COI indicando a existência de duas linhagens distintas dentro de *P. flavipinnis*, usando o método Kimura-2-parâmetros com análise de *bootstrap* com 1000 réplicas.

Os resultados da matriz de distância genética par a par (tabela 02), utilizando método Kimura-2-parâmetros, mostraram que a divergência genética entre as linhagens A e B é 2,3% e que a existem uma variação intraespecífica maior dentro da linhagem B.

Tabela 02: Distância genética média interespecífica e intraespecífica das espécies do gênero *Pellona*.

	[1]	[2]	[3]	[4]	[5]	Intraespecífica
[1] <i>P. harroweri</i>	-					0,002
[2] <i>P. ditchela</i>	0,187	-				0,000
[3] <i>P. castelnaeana</i>	0,176	0,173	-			0,000
[4] <i>P. flav_linhagem_A</i>	0,138	0,180	0,125	-		0,001
[5] <i>P. flav_linhagem_B</i>	0,136	0,175	0,123	0,023	-	0,002

A árvore de Neighbour-joining gerada com os dados de sequências de COI do gênero *Pellona* (*P. ditchela*, *P. harroweri*, *P. castelnaeana* e *P. flavipinnis*) (Figura 03), sugere que as linhagens A e B possuem menor divergência entre si do que entre as outras espécies do gênero. As sequências de *P. flavipinnis* obtidas do NCBI agruparam juntos com linhagem A juntos com os indivíduos provenientes mais da região leste da Amazônia. A espécie *P. flavipinnis* teve como grupo irmã a espécie *P. harroweri*, seguida de *P. castelnaeana* e *P. ditchela* como a espécie mais divergente.

A árvore de máxima verossimilhança obtida com as sequências concatenadas de Dloop e COI (Figura 04) confirma a existência de duas linhagens, destacando a presença de sub-estruturação entre uma destas linhagens. O modelo escolhido foi o J1, e os parâmetros indicados pelo modelo foram: $\alpha = 0.1001606$ e as frequências de bases nucleotídicas foram: T= 0.271, C=0.238, A=0.325 e G=0.164.

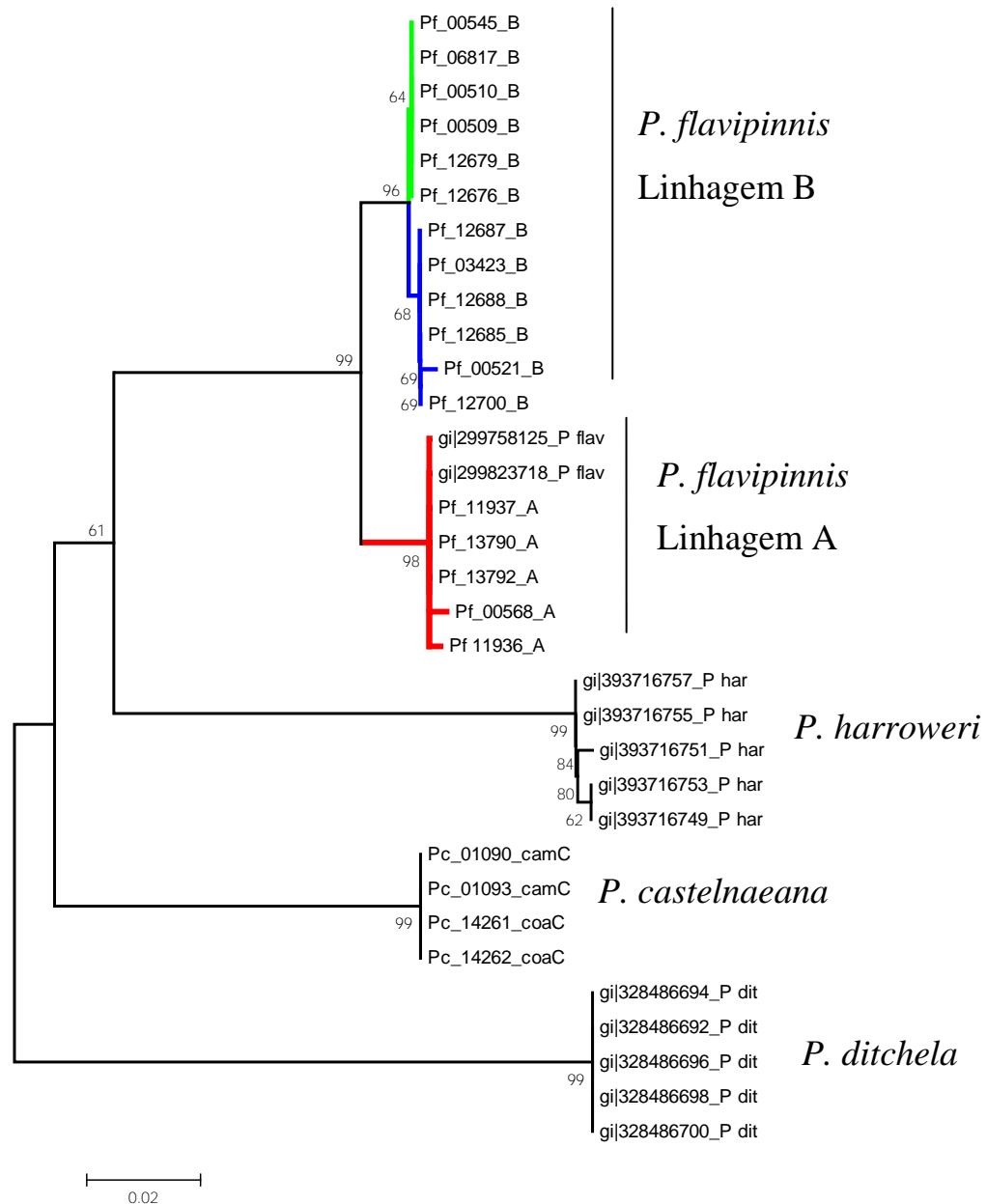


Figura 03: Árvore Neighbour-joining da divergência nucleotídica das sequências de COI do gênero *Pellona*, usando o método Kimura-2-parâmetros com análise de *bootstrap* com 1000 réplicas. (As cores representam o agrupamento de acordo com BAPS)

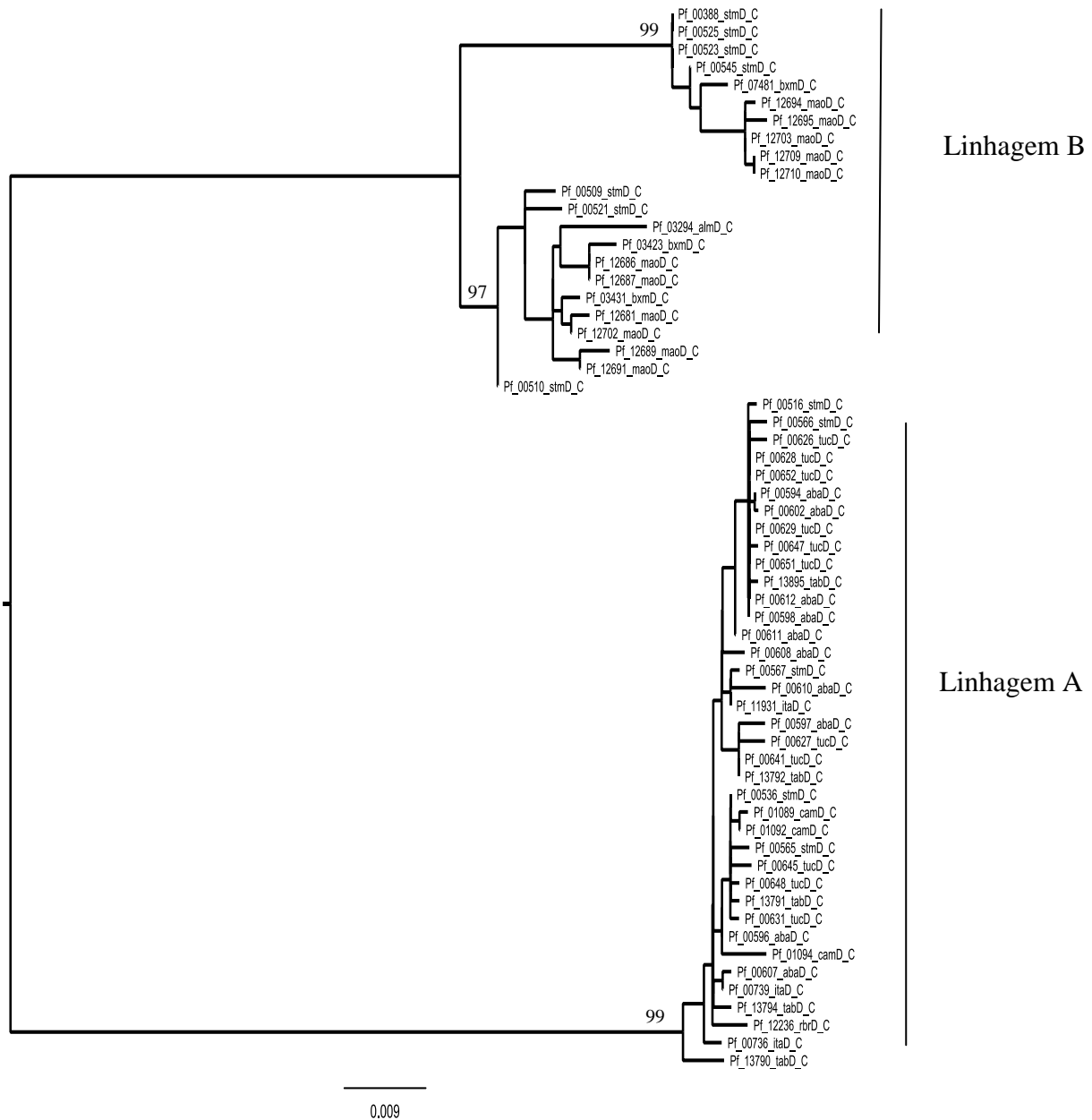


Figura 04: Árvore máxima verossimilhança gerada a partir das sequências concatenadas (COI e DLOOP) mostrando a existência de duas linhagens e sub-estruturação entre uma delas dentro da espécie *P. flavipinnis*.

O método *bayesiano* inferido no Programa BAPS a partir das sequências da região controle do DNAm_t mostraram que nas 11 áreas amostradas existem três grupos biológicos dentro da espécie *P. flavipinnis* com a melhor probabilidade (-2127.8401/1.00) de agrupamento (Figura 05). Nesta análise os indivíduos pertencentes a linhagem A são evidenciados pela cor vermelha, e a linhagem B é

visualizada com seus grupos 1 (cor verde) e 2 (cor azul). A linhagem A foi observada nas localidades mais ao leste da bacia Amazônica e a linhagem B mais a oeste da bacia. As cores verde e azul observadas dentro da linhagem B é explicada pela grande diversidade gênica observada dentro desta linhagem nas diferentes localidades (tabela 03 e 04).

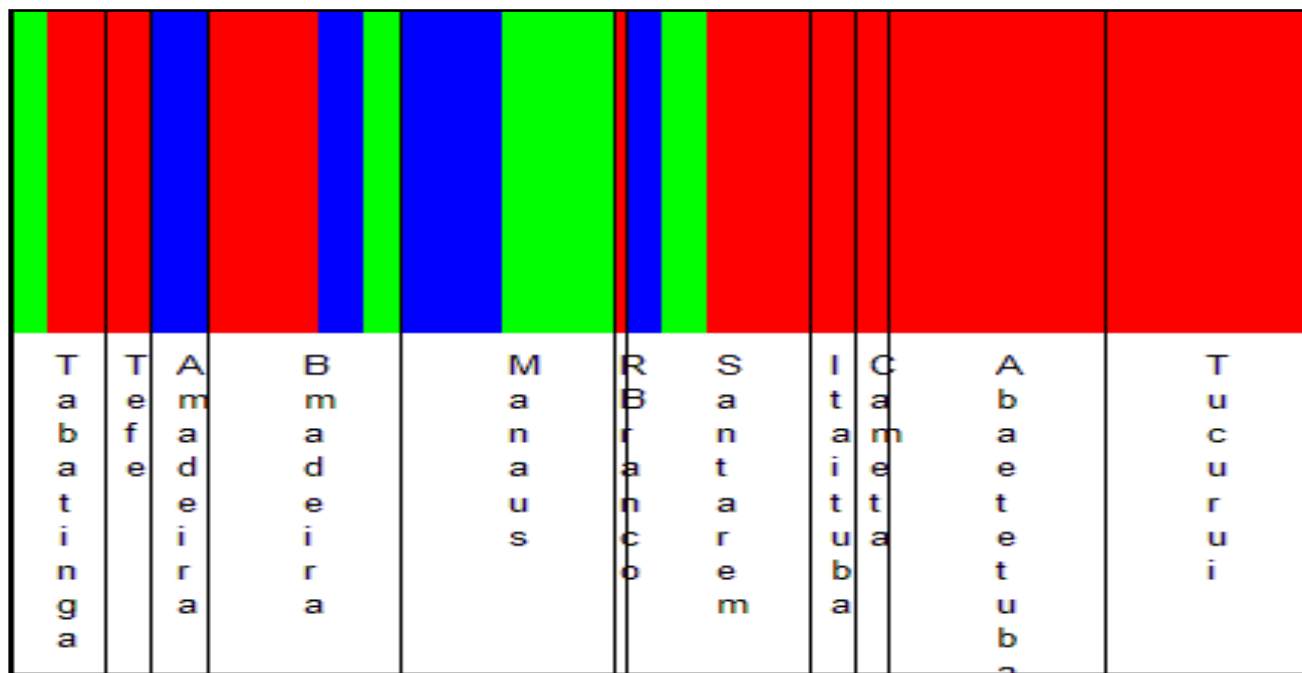


Figura 05: Análise bayesiana indicando a presença de três agrupamentos biológicos. As cores dispostas verticalmente representam cada um dos três agrupamentos. Linhagem A (Grupo 1 vermelho) e linhagem B (Grupo 2 verde e Grupo 3 azul).

Tabela 03: Parâmetros de diversidade genéticos para as linhagens de *Pellona flavipinnis* (D-loop).

	Nº de indivíduos	Nº de haplótipos	Sítios polimórficos	Diversidade gênica (\hat{H})	Diversidade nucleotídica Π	D de Tajima	F_s de Fu	F_{st} entre as duas linhagens
Linhagem A	70	52	225	0.9652 +/- 0.0162	0.033977 +/-0.016884	-2.29426*	-18.92677*	0.63593*
Linhagem B	44	39	219	0.9937 +/-0.0067	0.090363 +/-0.044254	-0.02902	-5.04744	

* indica significância ($P < 0, 05$).

Tabela 04: Parâmetros de diversidade genéticos para as linhagens de *Pellona flavipinnis* (COI).

	Nº de indivíduos	Nº de haplótipos	Sítios polimórficos	Diversidade gênica (\hat{H})	Diversidade nucleotídica Π	D de Tajima	F_s de Fu	F_{st} entre as duas linhagens
Linhagem A	57	14	326	0.6779 +/-0.0496	0.084428 +/-0.041130	-0.39283	29.19230	0.19713*
Linhagem B	42	25	198	0.9489 +/-0.0197	0.049989 +/-0.024761	-0.38560	1.04764	

* indica significância ($P < 0, 05$).

3.2 Marcadores Microsatélites

Para análises com marcadores microsatélites foram genotipados um total de 79 indivíduos provenientes de três localidades, utilizando sete locos de microsatélites.

Devido os resultados de sequência a partir da região controle e gene COI indicarem a existência de Unidades Evolutivas, as análises de genético-populacional com locos microsatélites não são convenientes, pois os grupos formados nas diferentes localidades não são compostos por um número ideal para estas análises. Logo os dados de microsatélites foram usados somente para estimar o número de grupos biológicos pelo método de agrupamento bayesiano realizado no *Structure*, os resultados indicaram dois grupos biológicos ($k=2$) (Figura 06) e a estimativa de probabilidade $L(K)$ (-1696.3850) como a melhor probabilidade para explicar número de grupos obtidos (Figura 07).

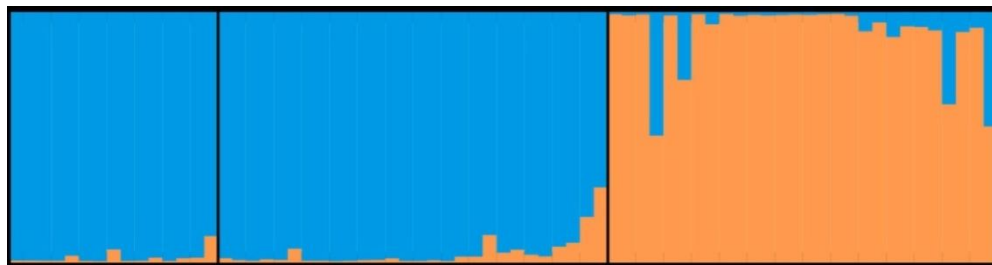


Figura 06: Mostrando a existência de dois grupos biológicos baseados em 7 locos de microsatélites de *Pellona flavipinnis* estimado pela análise bayesiana realizada pelo programa *Structure*. Cada indivíduo é representado por uma linha vertical e cada uma das cores indica um *cluster* baseado em semelhanças genotípicas.

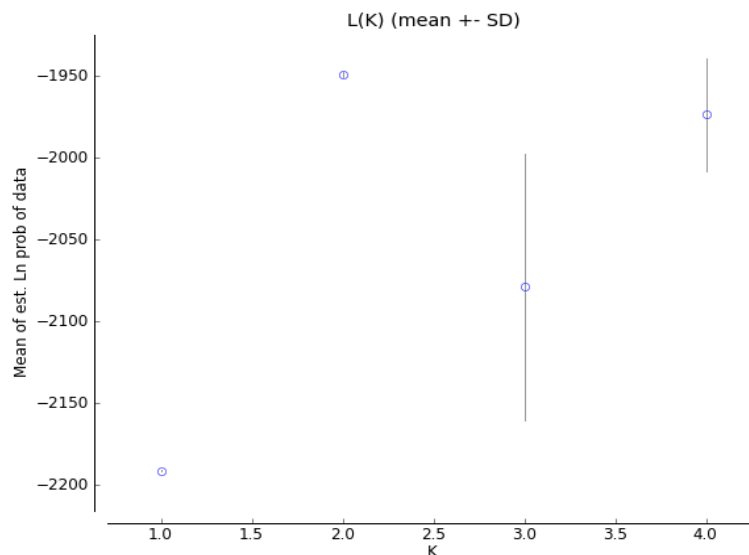


Figura 07: Resultado do *Structure*, indicando $k=2$, como a melhor probabilidade para explicar os dados. A vertical mostra a média da estimativa da distribuição das probabilidades dos dados e a horizontal número de clusters testados (k) e o desvio padrão (SD) da probabilidade média.

Análise morfométrica: *P. flavipinnis* de Santarém como estudo de caso

Os testes estatísticos multivariados obtidos a partir de medidas morfométricas utilizaram-se dois parâmetros diferentes:

1- O efeito de tamanho foi retirado

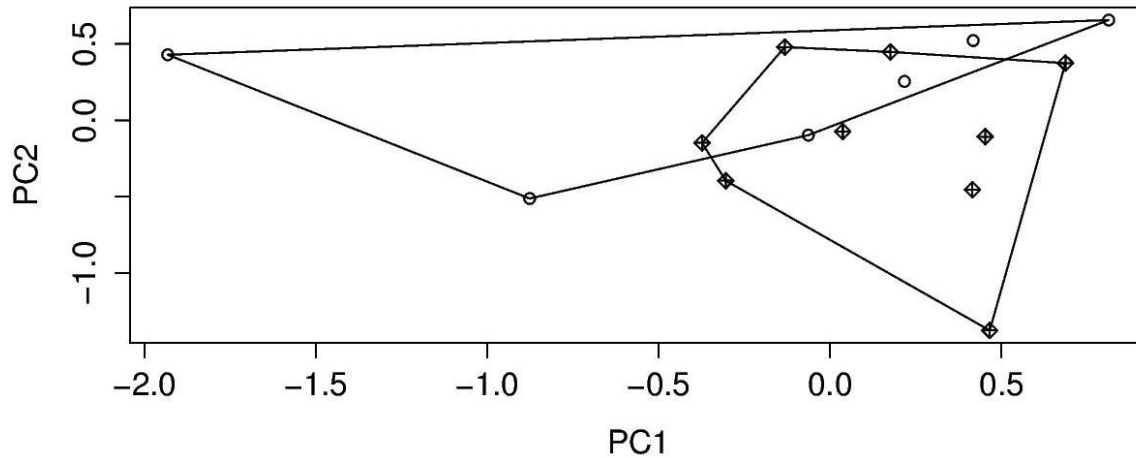


Figura08: PC1 vs PC2 com resíduos (tamanho retirado)-grupos se sobrepõem.

Neste teste os primeiros 6 PCs explicaram 80% da variação, os resultados indicaram que não existem diferença entre os dois grupos identificados pelo DNAmT e microssatélites. Ou seja, não existem diferenças na forma entre os indivíduos analisados (linhagem A e B). O valor de P não foi significativo ($P=0,894$; $F= 0,3452$; $DF=$ grau de liberdade 8 R^2 ajustado $-0,391$).

2- Tamanho incluído

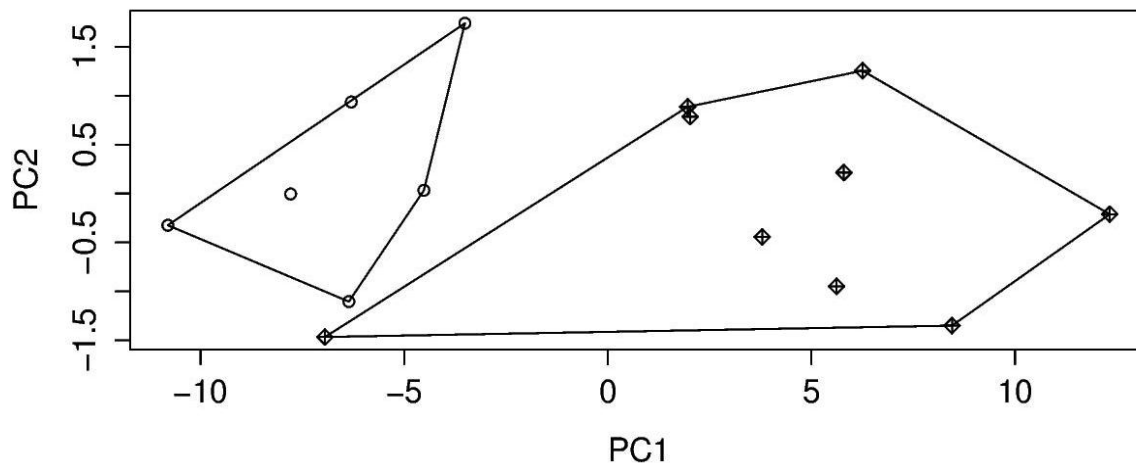


Figura 09: PC1 vs PC2 com tamanho incluído-dois grupos que não se sobrepõem.

Neste teste os primeiros 3 PCs explicaram 80% da variação, mostrando assim que existem diferença entre os dois grupos identificados pelo DNAmT e microssatélites . Os resultados assim como o obtidos com os dados genéticos indicaram que existem diferença no tamanho entre as duas linhagens (A e B). Primeiro componente é responsável por esta diferença, e explicam 63,9% da variância, é significativo e contribuição para ele é das variáveis de tamanho.

4. DISCUSSÃO

Mudanças no genoma nem sempre são detectadas na morfologia e ecologia das espécies, por isso, estudos genéticos associados com outras ferramentas são importantes para o entendimento da diversidade. Devido ao pressuposto de uma nova espécie dentro de *Pellona* (de Pinna e Di Dario, 2003) e escassez de estudos na espécie *P. flavipinnis*, este trabalho é um importante passo para o conhecimento da diversidade genética desta espécie na bacia Amazônica, colaborando para a política de manejo e conservação.

A identificação de linhagens utilizando DNA mitocondrial (COI e *D-LOOP*), grupos biológicos (utilizando locos de microssatélites) e os dados de medidas morfométricas (estudo de caso) indicaram a existência de duas linhagens (aqui chamadas A e B). O estudo de caso mostrou que pode existir uma diferenciação entre os grupos baseando-se nos tamanhos (comprimento). Acreditamos que isso possivelmente deve ser real uma vez que os espécimes para as análises morfométricas foram coletados em três ocasiões diferentes, e indivíduos das duas linhagens foram encontrados em todas as três coletas. A diferença no tamanho pode ser reflexo das diferenças ecológicas dentre outras (morfologia reflete ecologia – ecomorfologia). No entanto, esse resultado do estudo de caso precisa ser confirmado incluindo outros indivíduos e padronizando os espécimes, diferenciado idade, sexo e época de coleta, dentre outros.

Os dados obtidos a partir do método Bayesiano utilizando as sequências da região controle do DNAmT mostraram que nas 11 localidades amostradas na bacia Amazônica existem duas principais linhagens dentro da espécie *P. flavipinnis* (linhagem A e B) com alta diversidade gênica na linhagem B observado ao longo da área amostrada, a qual foi congruente com os resultados das análises filogenéticas.

Utilizando o protocolo do DNA barcode, os resultados das árvores filogenéticas de agrupamento de vizinho (*NJ*) mostraram a existência de duas linhagens distintas (linhagem A e B) dentro de *P. flavipinnis*. As linhagens formadas não são exclusivas de uma determinada localidade, as análises no programa *Structure* (Figura 06) mostraram dois grupos biológicos (linhagem A e B). Aparentemente, e

atualmente não existe uma barreira física que separa essas linhagens, mas é evidente a maior diversidade na linhagem B, e esta linhagem é mais restrita a porção oeste da bacia Amazônica (Amazônia ocidental), mas também está presente no Município de Santarém (Amazônia Central).

Dados da literatura indicam que os peixes da espécie *P. flavipinnis* realizam migrações com fins reprodutivos, estudos com peixes migradores de curta e longa duração como a dourada (Batista e Alves-Gomes, 2006), o tambaqui (Santos *et al.*, 2007; Santos, 2010), o jaraqui (Passos, 2009), a curimatã (Machado, 2009), a pirapitinga (Escobar, 2013) e o surubim (Machado 2013; Telles *et al.*, 2014) mostram que esses peixes possuem padrões genéticos de grandes populações panmíticas, no entanto, nossos resultados com *P. flavipinnis* não estão de acordo com esse padrão observado.

Resultados semelhantes ao encontrado neste estudo, foi mostrado por Terencio (2009) que indicou um padrão de estruturação onde diferentes Unidades de Conservação (CUs) co-ocorrem, esse padrão foi encontrado nas populações de *Nannostomus eques* (peixe lápis) da bacia do rio Negro, os dados indicaram a presença de pelo menos duas Unidades Evolutivas Significantes (ESUs), sendo que em uma das localidades (Jacundá) essas Unidades Evolutivas ocorrem em simpátria.

Populações diferenciadas existindo em uma mesma bacia foi mostrado por Sanches e Galetti Jr (2007) com o peixe migrador *Brycon hilarii* na sub-bacia do rio Miranda (bacia do rio Paraguai) e Wasko e Galetti Jr (2002 e 2003) com *Brycon lundii* na bacia do rio São Francisco, eles observaram padrões com modelo de sub-estruturação populacional indicando uma co-ocorrência e co-migração em estoques diferenciados da mesma espécie. Ambas as espécies apresentaram mais de um estoque genético diferenciados, provavelmente com isolamento reprodutivo, dada a ocorrência simpátrica de indivíduos de diferentes populações geneticamente estruturadas.

O valor de divergência genética observado entre as linhagens (A e B) foi de 2,3% (tabela 2). De acordo com a metodologia do barcode essas linhagens atendem a um dos critérios desse método e poderia ser considerada uma espécie diferenciada, no entanto a genética não deve ser a única ferramenta utilizada para identificar espécies ocultas. O estudo de caso mostrou resultados a partir de medidas morfométricas corroborando o encontrado através das análises genéticas. Devido o número de indivíduos reduzidos e esses serem oriundos de uma única localidade, é indicado que existam outras análises ou que outras ferramentas sejam utilizadas para corroborar os achados neste estudo. Assim adotamos o conceito de unidade de conservação, pois este grupo atende ao critério de monofilia recíproca para DNAm e diferenças significativas nas frequências alélicas nos marcadores nucleares podendo assim ser chamado de Unidade Evolutiva Significante (ESU).

O DNA *barcoding* é uma ferramenta molecular usada para amparar a taxonomia e sistemática clássica na identificação, classificação e sinalização de novas espécies (Hebert *et al.*, 2003; Dasmahapatra e Mallet, 2006; Dasmahapatra *et al.*, 2010). Estudos em peixes amazônicos tem suportado ou não o DNA barcoding como ferramenta para limitar geneticamente diferentes espécies.

Estudos como o realizado por Toffoli *et al.* (2008) com arraias do gênero *Potamotrygon* indicaram um processo de radiação filogenética recente neste grupo e, mostrou que a utilização de sequências de DNA para atribuir espécime desconhecida em umas das três espécies estudadas por eles, *P. scorbina*, *P. orbignyi*, *P. motoro*, não foi eficiente, sendo necessário dados morfológicos e/ou ecológicos. Provavelmente existe um processo de especiação incipiente dentro desses Condrictes e a ferramenta barcode não foi eficiente na discriminação deste grupo. Por outro lado, os achados de Frederico *et al.* (2012) baseada na divergência genética do fragmento de COI separou a espécie de arraia *Paratrygon aiereba* em três grandes megarregiões: Sistema Solimões-Amazonas, rio Xingu e rio Tocantins. Esses padrões genéticos encontrados foram explicados pela fragmentação alopátrica e diversificação nas populações de *P. aiereba*, sinalizando a presença de diferentes espécies neste gênero que é atualmente monoespecífico.

DNA barcoding não é eficiente ao comparar espécies irmãs, os principais candidatos a compartilhar haplótipos e mostrar pequena diferença genética interespecífica (Moritz e Cicero, 2008).

Nossos resultados tanto das análises filogeográficas (filogenéticas) como da genética populacional e, obtidos a partir de marcadores uniparentais (DNAMt COI e *D-loop*) quanto de biparentais (microssatélites) mostraram que a espécie *P. flavipinnis* da bacia Amazônica é composta por duas unidades evolutivas ou dois grupos biológicos geneticamente diferenciados. Com base na região controle e gene COI ambos mitocondriais e marcadores microssatélites três localidades (Tabatinga, baixo rio Madeira e Santarém) abrigam as duas linhagens mostradas neste trabalho (linhagem A e B).

A confirmação de que essas Unidades observadas em *P. flavipinnis* tratam-se de novas espécies só poderá ser realizada incorporando-se amostras de indivíduos da localidade tipo (bacia do Paraná-Paraguai) onde a espécie de *Pellona flavipinnis* foi descrita ou/e incorporando outras ferramentas.

5. CONCLUSÃO

Os resultados utilizando marcadores uniparentais e biparentais indicam que a espécie *Pellona flavipinnis* é composta de duas Unidades Evolutivas Significantes, a presença dessas linhagens genéticas diferenciadas sugere a ocorrência de unidades reprodutivas geneticamente diferenciadas. Os indivíduos desta espécie parecem manter um modelo de sub-estruturação populacional co-existindo e co-migrando dentro do mesmo sistema de rio. Outras ferramentas devem ser utilizadas para confirmar a presença de novas espécies dentro deste grupo.

6. REFERÊNCIAS GERAIS

Almeida, O.T.; Androczevecz, S. 2006. Novas espécies e novos produtos de pescado na Amazônia: As instituições de pesquisa e a indústria. Pp.41-66. In: Almeida O.T. (Ed.). *A indústria pesqueira na Amazônia*. Manaus: Ibama/Provarzea. 85-7300-204-2. 110pp.

Amado, M. V.; Farias, I.P.; Hrbek, T. 2011. A molecular perspective of systematics, taxonomy and classification Amazonian discus fishes of the genus *Symphysodon*. *International Journal of Evolutionary Biology* ID 360654.

Amado, M.V.; Hrbek, T.; Gravena, W.; Fantini, C.; Assunção, E.N.; Astolfi-Filho, S.; Farias, I.P. 2008. Isolation and characterization of microsatellite markers for the ornamental discus fish *Symphysodon discus* and cross-species amplification in other Heroini cichlid species. *Molecular Ecology Resources*. 8, 1451-1453.

Amaral, C.R.; Brito, P.M.; Silva, D.A.; Carvalho, E.F. 2013. A new cryptic Species of South American freshwater pufferfish of the genus *Colomesus* (Tetraodontidae), based on both morphology and DNA data. *Plos One*.

Araújo, B. R. 2009. Desova e fecundidade em peixes de água doce e marinhos. *Revista de Biologia e Ciências da Terra*. 9 (2): 24-31.

Avise J.C. 2004. *Molecular Markers, Natural History and Evolution*, second edition

Avise John C, Arnold Jonathan, Bale R. Martin Bale, Berminghamf Eldredg, Lamb,Trip, Neigell Joseph E, Reebl Carol A, Saunders Nancy C.(1987) Intraspecific Phylogeography: The mitochondrial DNA Bridge between Population Genetics and Systematics- *Ann. Rev. Ecol. Sys/*, 18:489-522
Copyright © 1987 by Annual Reviews

Avise, J.C.; Ellis, D.1986. Mitochondrial DNA and the evolutionary genetics of higher animals- *Philosophical transactions of the royal society of London.Series B, Biological Science Vol.312, the evolution of DNA sequence*. 342pp.

Banguera-Hinestroza, E.; Cárdenas, H.; Ruiz-García, Marmontel, M.; Gaitán, E.; Várquez, R.; Vallejo_Garcia, F. 2002. Molecular Identification of Evolutionarily Significant Units in the Amazon River Dolphin *Inia* sp. (Cetacea:Inniidae).*The journal of Heredity*.93:312-322.

Barthem, R. B.; Fabr e, N. N. 2004. Biologia e diversidade dos recursos pesqueiro da Amazônia. In: Ruffino, M. L. (Ed). *A pesca e os recursos pesqueiros na Amazônia brasileira*. ProV rzea/Ibama/MMA.

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

- Batista, J.S.; Farias, I.P.; Formiga-Aquino, K.; Sousa, A.C.B.; Alves-Gomes, J.A. 2009. DNA microsatellite markers for “dourada” (*Brachyplatystoma rousseauxii*, Siluriformes: Pimelodidae), a migratory catfish of utmost importance for fisheries in the Amazon: development, characterization and inter-specific amplification. *Conservation Genet Resourc* 2:5-10
- Boore, Jeffery. L. 1999. Animal mitochondrial genomes. *Nucleic Acids Reseach*. Oxford University Press. 15 p. Vol. 27, No 8 1767-1780
- Brown, K. H. 2008. Fish mitochondrial genomics: sequence, inheritance and functional variation. *Journal of Fish Biology* 72: 355–374.
- Brown, W. M., Prager, E. M., Wang, A., Wilson, A. C. 1982. Mitochondrial DNA sequences of primates. Tempo and mode of evolution. *Journal de Molecular and Evolution*. 18 : 225-239
- Brownstein, M.J.; Carpten J.D.; Smith J.R. 1996. Modulation of nontemplated nucleotide addition by Taq DNA polymerase: primer modifications that facilitate genotyping. *BioTechniques* 20: 1004–1006, 1008–1010.
- Buckup, P. A. 2010. Endemismo de Peixes na Ecorregião Xingu-Tapajós. *Boletim Sociedade Brasileira de Ictiologia*. 98: 2.
- Calcagnotto, D. 2012. Taxas de evolução e relógios moleculares. *In: Matioli, S.R.; Fernandes, F. M. C. (Eds). Biologiaa Molecular e Evolução. 2ª Ed. Sociedade Brasileira de Genética. p.61-73.*
- Castro, J. A.; Picornell A.; Ramon, M. 1998. Mitochondrial DNA: a tool for populational genetics studies. *Review article* 1:327-332
- Corander, J.; Cheng, L.; Marttinen, P.; Sirén, J.; Tang, J. 2013. BAPS: Bayesian Analysis of Population Structure enhanced possibilities for the analysis of genetic population structure. *Bioinformatics* 20(15)
- Corander, J.; Waldmann, P.; Sillanpaa, M.J. 2003. Bayesian analysis of genetic differentiation between populations. *Genetics*, 163:367-374.
- Cordani, U.G.; Sato, K.; Teixeira, W.; Tassinari, C.G.; Basei, M.A.S. 2000. Crustal Evolution of the South American Platform. *In: Cordani, U.G., Milani, E.J.; Thomaz-Filho, A.; Campos, D.A. (ed.) Tectonic Evolution of South America, Rio de Janeiro, Brazil, Spec. Publ.* 19-40.
- Core Team, R.D. 2011. R: A language and environment for statistical computing. *R Foundation for statistical Computing*. Vienna, Austria (www.r-project.org), 3-900051-07-0.
- Cox-Fernandes, C. 1997. Lateral migrations of fishes in Amazon floodplains. *Ecology Freshwater Fish* 6: 36 – 44.
- Dasmahapatra, K. K.; Mallet, J. 2006. DNA barcodes: recent successes and future prospects. *News and commentary*. *Nature* 97, 254-255

- De Pinna, M.C.C.; Di Dario, F. 2003. Family Pristigasteridae (Pristigasterids). In: Reis, R. E.; Kullander, S. O.; Ferraris, Jr. C. J. (Eds). *Check List of the Freshwater Fishes of South and Central America*. Edipucrs. Porto Alegre. p. 43-45.
- DeSalle, R.; Egan, M.G.; Siddall, M. 2005. The unholy trinity: taxonomy, species delimitation and DNA barcoding. *Philosophical transactions of The Royal Society*. 360, 1905-1916.
- Dewoody, J.A.; Schupp, J; Kenefic, L.; Busch, J.; Murfitt, L.; Keim, P. 2004. Universal method for producing ROX-labeled size standards suitable for automated genotyping. *BioTechniques* 37:348–352. doi 10.2144/04373BM02.
- Di Dario, F. 2002. Evidence Supporting a Sister-Group Relationship between Clupeoidea and Engrauloidea (Clupeomorpha). *Copeia*, 2002(2): 496–503.
- Di Dario, F. 2013. Pristigasteridae. In: Queiroz, L. J.; Torrente-Vilara, G.; Ohara, W. M.; Pires, T. H. S.; Zuanon, J.; Doria, C. R. C. 2013. (Eds). *Peixes do Rio Madeira* . 1.ed.-São Paulo: Diaeto Latin American Documentary, 2013. p. 100-105.
- Eschmeyer, W.N (ed). Catalog of fishes: genera, species, references. Electronic version accessed in 25 of May of 2014 (<http://research.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/fishcatmain.asp>).
- Escobar, L.M.D. 2013. Diversidade genética e padrões populacionais da pirapitinga *Piaractus brachypomus* (Cuvier, 1818) Characiformes: um critério para seu manejo. Tese de doutorado. Universidade Federal do Amazonas. 173pp.
- Excoffier, L.; Lischer, H.E.L. 2010. Arlequin suite version 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows, *Molecular Ecology Resources* 10, 564-567.
- Excoffier, L.; Smouse, P.E.; Quattro, J. M. 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: Application to human mitochondrial 22 DNA restriction data. *Genetics*. 131: 479-491.
- Falush, D.; Stephens, M.; Pritchard, J.K. 2003. Inference of Population Structure Using Multilocus Genotype Data: Linked Loci and Correlated Allele Frequencies. *Genetics*, 164: 1567-1587.
- Farias, I.P.; Hrbek, T. 2008. Patterns of diversification in the discus fishes (*Symphysodon* spp. Cichidae) of the Amazon basin. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 49 (2008) 32-43.
- Farias, I.P.; Hrbek, T.; Brinkmann, S.; Sampaio, I.; Meyer, A. 2003. Characterization and isolation of DNA microsatellite primers for *Arapaima gigas*, an economically important but severely over-exploited fish species of the Amazon basin. *Molecular Ecology Notes*, 10.1046.
- Farias, I.P.; Torrico, J. P.; Dávila, C.G.; Santos, M.C. F.; Hrbek, T.; Renno, J. F. 2010. Are rapids a barrier for floodplain fishes on the Amazon basin? A demographic study of the Keystone floodplain species *Colossoma macropomum* (Teleostei: Characiformes). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 56:1129-1135.

- Ferreira, E. J. G.; Zuanon, J. A. S.; Santos, G.M. 1998. *Peixes Comerciais do Médio Amazonas: Região de Santarém*. Edição IBAMA, Brasília. 211pp.
- Frankham, R.; Ballou, J.R.; Briscoe, D.A. 2002. *Introduction to Conservation Genetics*. Cambridge University Press. England. 640pp.
- Frankham, R.; Ballou, J.R.; Briscoe, D.A. 2008. Diversidade Genética *In* (Eds). *Fundamentos de Genética da Conservação*. SBG-Sociedade Brasileira de Genética, p. 12-30.
- Froese, R.; Pauly D. 2011. FishBase. World Wide Web electronic publication. www.fishbase.org. Accessed 28 December 2013.
- Fu, Y. X. 1997. Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics*. 147: 915-925.
- Gonzalez, E. G., Zardoya R. 2007. Relative role of life-history traits and historical factors in shaping genetic population structure of sardines (*Sardina pilchardus*). *BMC Evolutionary Biology* 2007, 7:197.
- Gouding, M.; Cañas, C., Barthem, R., Forsberg, B., Ortega, H. 2003. *Las fuentes del Amazonas*. ed Biblos S.A
- Goulding, M. 1979. *Ecologia de pesca do Rio Madeira*. Ed INPA, Manaus, Brasil. 172pp.
- Goulding, M.; Barthem, R.; Ferreira E. 2003a. *The Smithsonian: Atlas of the Amazon*. British Library Cataloging-in-Publication. 252pp.
- Gravena, W.; Farias, I.P.; da Silva, M.N.F.; da Silva, V. M.F., Hrbek. 2014. Looking to the past and the future: were the Madeira River rapids a geographical barrier to the boto (Cetacea:Iniidae)? *Conservation Genetics*, 014-0565-4.
- Gregory-Wodzicki, K.M.G. 2000. Uplift history of the Central and Northern Andes: A review. *Geological Society of America Bulletin*, 1091-1105
- Hajibabaei, M.; McKenna, C. 2006. DNA Mini-barcodes. *In*: Kress, W.J., Erickson, D.L. (Eds). *DNA Barcodes: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology*, Vol 858. Springer Science+Business Media, p. 339-353.
- Hall, T. 1999. Bioedit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 41: 95-98.
- Hebert, P. S. N.; Penton, E. H.; Burns, J. M.; Janzen, D. H.; Hallwachs, W. 2004. Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astraptes fulgerator*. *PNAS*. 1812-14817.
- Hebert, P.D.N.; Cywinska, A.; Ball, S.L.; deWaard, J.R. 2003. Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society*, 270: 313-321.

- Herbek, T. Farias I. P. 2008. The complete mitochondrial genome of the pirarucu (*Arapaima gigas*, Arapaimidae, Osteoglossiformes). *Genetics and Molecular Biology* 31. 293-302.
- Herbek, T.; Vasconcelos, R.W.; Rebelo, G.; Farias, I.P.2008. Phylogenetic Relationship of South American Alligatorids and the Caiman of Madeira River. *Journal of experimental zoology* 309A:588-599.
- Hrbek, T.; Silva, V.M.F.; Dutra, N.; Gravena, W.; Martin, A.R.; Farias, I.P. 2013. A new species of river dolphin from Brazil or: How little do we know our biodiversity. *Plos One*.9(1):e 83623.10.1371.
- Hrbek, T.; Crossa, M.; Farias I. P. 2007. Conservation strategies for *Arapaima gigas* (Schinz, 1822) and the Amazonian várzea ecosystem. *Braz. J. Biol.*, 67(4, suppl.): 909-917.
- Hrbek, T.; Farias I. P.; Crossa, M.; Sampaio, I. ; Porto, J. I. R.; Meyer, A. 2005. Population genetic analysis of *Arapaima gigas*, one of the largest freshwater fishes of the Amazon basin: implications for its conservation. *Animal conservation* 8, 297-308.
- Hubert, N.; Renno, J. F. 2006. Historical biogeography of South American freshwater fishes. *Journal of Biogeography* 33: 1414-1436.
- Iervolino, F.; Resende K. E.; Hilsdorf S. W. A. 2009. The lack of genetic differentiation of pacu (*Piaractus mesopotamicus*) populations in the Upper-Paraguay Basin revealed by the mitochondrial DNA D-loop region: Implications for fishery management. *Journal Fisheries Research-Elsevier* 101: 1-5.
- Ikeziri, A. A. S. L.; Queiroz, L. J.; Doria, C. R. C.; Fávaro, L. F.; Araújo, T. R.; Torrete-Vilara, G. 2008. Estrutura populacional e abundância do Apapá-Amarelo, *Pellona castelnaeana* (Valenciennes, 1847) (Clupeiformes, Pristigasteridae), na Reserva Extrativista do Rio Cautário, Rondônia. *Revista Brasileira de Zoociências* 10 (1): 41-50.
- Ivankovic, A.; Ramljak, J.; Konjacic, M.; Kelava, N.; Dovc, P.; Mijic, P. 2009. Mitochondrial D-loop sequence variation among autochthonous horse breeds in Croatia. *Czech J. Animal.Sci.*, 54, 2009 (3):101-111.
- Ivanova, N.V.; Zemlak, T.S.; Hanner, R.H.; Hebert, P.D.N. 2007. Universal primer cocktails for fish DNA barcoding. *Molecular Ecology Notes*.7, 544-548.
- Joly, C.A.; Haddad, C.F.B.; Verdade, L.M.; Oliveira, M.C.; Bolzani, V.S.; Berlinck. 2011. Diagnóstico da pesquisa em biodiversidade no Brasil. *Revista USP São Paulo*, n.89, p. 114-133.
- Klug S.W.; Cummings R.M.; Spencer A.C.; Palladino A.M. 2010 *Conceitos de Genética*, 9 edição, Porto Alegre: editora Artmed. 896pp.
- Kocher, T.D.; Stepien, C.A. 1997. *Molecular systematics of fishes*. San Diego, California, Academic Press.

Larmuseau, M.H.D.; Raeymaekers, J.A.M.; Hellemans, B.; Van Houdt, J.K.J.; Volckaert, F.A.M. 2010. Mito-nuclear discordance in the degree of population differentiation in a marine goby. *Heredity* 105, 532-542.

Lavoué, S.; Miya, M.; Nishida, M. 2010. Mitochondrial phylogenomics of anchovies (family engraulidae) and recurrent origins of pronounced miniaturization in the order Clupeiformes. *Molecular Phylogenetics and Evolution*.

Le Guennec, B. 1992. Contribution à la systématique du genre *Pellona* (Clupeidae) de Bolivie. *Cybium Montbéliard*. 16(2): 145-150.

Le Guennec, B.; Loubens, G. 2004. Biologie de *Pellona castelnaeana* (Teleostei: Pristigasteridae) dans le bassin du Marmoré (Amazonie bolivienne). *Ichthyology Explorer Freshwaters* 15: 369-383.

Leão, A.S.A. 2009. *Análise da variabilidade genética das populações de pirarucu (Arapaima gigas, Schinz 1822) dos principais tributários do rio Amazonas através do uso de marcadores microssatélites*. Dissertação de Mestrado, Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia-Universidade Federal do Amazonas. 87pp.

Li, C.; Ortí, G. 2007. Molecular phylogeny of Clupeiformes (Actinopterygii) inferred from nuclear and mitochondrial DNA sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 44 (2007): 386–398.

Lima, C. A. R. M. ; Ruffino, M. L. 2003. Migratory fishes of South America, *Migratory fishes of the Brazilian Amazon-ProVárzea-MMA/ IBAMA/ PPG7*. Manaus, AM, Brasil.

Lundberg, J. G.; Marshall, L. G.; Guerrero, J.; Horton, B.; Malabarba, M. C. S. L.; Wesselingh, F.P. 1998. *The Stage for Neotropical Fish Diversification*. In: Malabarba, R. L.; Reis, R. E.; Vari, R. P.; Lucena, Z. M. S.; Lucena, C. A. S. (Eds). A History of Tropical South American Rivers. In: *Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes*. Edipurcs, Porto Alegre. 13-68p.

Machado, A.S.C. 2013. *Genética populacional do bagre amazônico Pseudoplatystoma punctifer (Siluriformes: Pimelodidae) nas sub-bacias dos rios Madeira e Mamoré/Guaporé*. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Amazonas. 86pp.

Machado, V. N. 2009. *Análise da variabilidade genética da curimatã, Prochilodus nigricans (Agassiz, 1829) na calha do rio Amazonas e seus principais tributários*. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, Amazonas. 65pp.

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

Matioli, S. R. 2001. *Biologia Molecular e Evolução*. Ribeirão Preto, SP, editora Holos. 202pp.

Matioli, S. R., Fernandes, F. M. C. 2012. *Biologia Molecular e Evolução*. Ribeirão Preto: Holos, Editora. Sociedade Brasileira de Genética. 256pp.

- Melo, A.L.A. 2001. *Relações filogenéticas das sardinhas do gênero Pellona Valenciennes (1847) (Clupeomorpha:Pellonidae), com revisão taxonômica das espécies sul-americanas*. Dissertação de mestrado, Departamento de Biologia, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto. 71pp.
- Meyer, A. 1993. Evolution in Mitochondrial DNA in Fishes. In: Hochachka, P.W. and T.P. Mommsen (Eds.). *Biochemistry and Molecular Biology of Fishes*, vol. 2. Molecular Biology Frontier, Elsevier Science Publishers, Amsterdam, The Netherlands. 38pp.
- Meyer, C.P.; Paulay, G. 2005. DNA Barcoding: error rates based on comprehensive sampling. *Plos Biology*, 3(12): e422.
- Moreira-Hara, S. S.; Zuanon, J. A. S.; Amdio, S. A. 2009. Feeding of *Pellona flavipinnis* (Clupeiformes, Pristigasteridae) in a Central Amazonian floodplain. *Iheringia, Série Zoologia*. Porto Alegre, 99(2):153-157.
- Moritz, C. 1994. Defining Evolutionarily Significant Units for conservations. *Trends in Ecology and Evolution*, 9 (10), 373-375.
- Moritz, C; Cicero, C. 2004. DNA barcoding: Promise and pitfalls. *PLos Biology* 2, 1529-1534.
- Morrone, J. J. 2004. Panbiogeografia, componentes bióticos y zonas de transición. *Revista Brasileira de Entomologia* 48(2): 149-1162.
- Nakatani, k.; Agostinho, A. A.; Baumgartner, G.; Bialecki, A.; Sanches, P. V.; Makrakis, M.C.; Pavanelli, C.S. 2001. Ovos e larvas de peixes de água doce:desenvolvimento e manual de identificação.Maringá. 378pp.
- Nelson, J. S. 2006. *Fishes of the World*, fourth edition 4th ed. 622 pp.
- Oliveira, E.J.; Pádua, J.G.; Zucchi, M.I.; Vencovsky,R.; Vieira, M.L.C. 2006. Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. *Genetics and molecular Biology*, 29,2,294-307.
- Ortiz, M. F. 2010. Validação do DNA Barcode como identificador de espécies:um estudo de ampla amostragem com o gênero *Pseudoplatystoma* (Siluriformes, Pimelodidae) na Amazônia. . Dissertação de Mestrado- INPA, Manaus. 73pp
- Passos, K. B. 2009. *Genética populacional do jaraqui de escama grossa (Semaprochilodus insignis – Prochilodontidae, Characiformes)*- Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, Amazonas. 66pp.
- Passos, K.B.; Leão, A.S.A.; Oliveira, D.P.; Farias, I.P.; Hrbek, T. 2010. Polymorphic microsatellite markes for the overploited Amazonian fish, *Semaprochilodus insignis* (Jardine and Schomburgk 1841). *Conservation Genet Resourc* 2:231-234.
- Pearse, D.E.; Arnadt, A.D.; Valenzuela, N.; Miller, B.; Cantarelli, V.; Sites-Jr, J.W. Estimating population structure under nonequilibrium conditions in a conservation context:continent-wide

- population genetics of the giant Amazon river turtle, *Podocnemis expansa* (Chelonia; Podocnemididae). *Molecular Ecology*, 15, 985-1006.
- Pritchard, J.K.; Stephens, M.; Donnelly, P. 2000. Inference of Population Structure Using Multilocus Genotype Data. *Genetics*, 155: 945-959.
- Rach, J.; DeSalle, R.; Sarkar, I. N.; Schierwater, B.; Hadrys, H. 2008. Character-based DNA barcoding allows discrimination of genera, species and population in Odonata. *The Royal Society*. 275, 237-247.
- Ready, J.S.; Ferreira, E.J.G.; Kullander, S.O. 2006. Discus fishes: mitochondrial DNA evidence for a phylogeographic barrier in the Amazonian genus *Symphysodon* (Teleostei:Cichlidae). *Journal of Fish Biology*, 69:200-211.
- Refseth, U.H.; Fangen, B.M.; Jakobsen, K.S. 1997. Hybridization capture of microsatellites directly from genomic DNA. *Electrophoresis* 18: 1519–1523.
- Rodrigues, F.C.; Farias, I.P.; Batista, J.S.; Alves-Gomes, J. 2009. Isolation and characterization of microsatellite loci for “piramutaba” (*Brachyplatystoma vaillantii*, Siluriformes:Pimelodidae), one of the commercially most important migratory catfishes in the Amazon Basin. *Conservation Genet Resourc-Technical Note*. doi 10.1007.
- Rossetti, D.F.; Valeriano, M.M. 2007. Evolution of the lowest Amazon basin modeled from the integration of geological and SRTM topographic data. *Catena*. 70, 253-265.
- Rozen, S.; Skaletsky, H.J. 2000. Primer 3 on the www for general users and for biologist programmers. In: Krawetz S, Misener S (eds.) *Bioinformatics methods and protocols: methods in molecular biology*. Humana press, Totowa, pp 365–386.
- Sambrook, J.; Fritsch, E.f.; Maniatis, T. 1989. *Molecular cloning: a laboratory annual*. 2 ed. Cold Spring Harbor Laboratory, New York, NY. 653pp.
- Sanches, A.; Galetti Jr, P.M. 2006. Genetic evidence of population structuring in the neotropical freshwater fish *Brycon hilarii* (Valenciennes, 1850). *Brazilian Journal Biology*.67:8889-895.
- Santos, G. M.; Ferreira, E. J. G.; Jansen A.; Zuanon, S. 2006. *Peixes comerciais de Manaus*. Ibama/AM, Pro Várzea. 2ª edição. 144pp.
- Santos, G. M.; Mérona, B.; Juras, A. A.; Jégu M. 2004. *Peixes do Baixo Rio Tocantins: 20 anos depois da Usina Hidrelétrica Tucuruí*. 92pp.
- Santos, M. C. F.; Ruffino, M. L.; Farias, I. P. 2007. High levels of genetic variability and panmixia of the tambaqui *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1816) in the main channel of the Amazon River. *Journal of Fish Biology* 71, 1-12.

- Santos, M.C. F. 2010. Caracterização da diversidade genética de populações naturais de tambaqui (*Colossoma macropomum*) através de marcadores moleculares: uma contribuição para conservação da espécie- Tese de Doutorado, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, Amazonas. 175pp.
- Santos, M.C.F.; Hrbek, T.; Farias, I.P. 2008. Microsatellites markers for the tambaqui (*Colossoma macropomum*, Serrasalminidae, Characiformes), an economically important keystone species of the Amazon River floodplain. *Permanent Genetic Resources Note*.874.
- Schlotterer, C. 2004. The evolution of molecular markers: just a matter of fashion? *Nature Reviews Genetics* 5: 7.
- Schuelke, M. 2000. An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments: A poor man's approach to genotyping for research and high-throughput diagnostics. *Nature Biotechnology* 18, 233-234.
- Severi, W.; Verani, F. N. 2006. Morphological development of *Pellona flavipinnis* post-yolk-sac larvae and juveniles (Clupeiformes: Pristigasteridae). *Zootaxa* 1126: 21–33.
- Silva, T. J.; Hrbek, T.; Farias, I.P. 2009. Microsatellites markers for the silver arowana (*Osteoglossum bicirrhosum*, Osteoglossidae, Osteoglossiformes). *Permanent Genetic Resources Note*.1094.
- Silva, T.J. 2009. *Marcadores moleculares para análise da variabilidade genética de populações do aruanã (Osteoglossum bicirrhosum)*. Tese de doutorado, Universidade Federal do Amazonas. 110pp.
- Simões, P.I.; Lima, A.P.; Farias, I.P. 2012. Restricted natural hybridization between two species of litter frogs on a threatened landscape in southwestern Brazilian Amazonia. *Conservation Genetics*.10592-01200362.
- Sioli, H. 1985. *Amazônia: Fundamentos da ecologia da maior região de florestas tropicais*. Editora Vozes, RJ. 34pp.
- Sousa, C.F.S.; Santos, C.H.A.; Sousa, A.C.B.; Paula-Silva, M.N.; Souza, A.P.; Farias, L.P.; Ferreira-Nozawa, M.S.; Almeida-Val, V. M. F. 2009. Development and characterization of microsatellite markers in *Astronotus crassipinis* (Heckel, 1840). *Conservation Genet Resour* 1:277-280.
- Tajima, F. 1989. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics*. 123: 585–595.
- Tamura, K.; Peterson, D.; Peterson, N.; Stecher, G.; Nei, M.; Kumar, S. 2011. Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 5.0. *Molecular Biology and Evolution* 24: 1596-1599.
- Telles, M.P.C.; Collevatti, R.G.; Braga, R.S.; Guedes, L.B.S.; Castro, T.G.; Costa, M.C., Silva-Júnior, N.J.; Barthem, R.B.; Diniz-Filho, J.A.F. 2014. Geographical genetics of *Pseudoplatystoma punctifer* (Castelnau, 1855) (Siluriformes, Pimelodidae) in the Amazon Basin. *Genetics and Molecular Research*. 10.4238.

- Terencio, M.L. 2009. *Estimativa da variabilidade genética da região controle do DNA Mitocondrial de Nannostomus eques (Characiformes, Lebiasinidae) da bacia do rio Negro*. Dissertação de Mestrado-INPA/UFAM, Manaus. 101pp
- Thompson, J.D.; Higgins, D.G.; Gibson, T.J. 1994. Clustal W. Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*. 22(22): 4673–4680.
- Van Oosterhout, C.V.; Hutchinson, W.F.; Wills D.P.M.; Shipley, P. 2004. Micro-Checker software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Mol Ecol Notes* 4:535–538.
- Vega, A.M.L. 2007. *Reconstituição paleoambiental dos depósitos Miocenos na região centro-oriental da Bacia do Solimões*, Amazonas.Geociências. Universidade Federal do Amazonas (UFAM), Manaus, AM, Brazil. 92pp.
- Wasko, A. P.; Galetti Jr, P.M. 2002. RAPD analysis in the neotropical fish *Brycon lundii*: genetic diversity and its implications for the conservation of the species.*Hydrobiologia* 474, 131-137.
- Wasko, A. P.; Galetti Jr, P.M.. 2003. PCR primed with minisatellite core sequences yields species-specific patterns and assessment of population variability in fishes of the genus *Brycon*.
- Wesselingh, F. P.; Salo, J. A. 2006. Mioceno perspective on the evolution of the Amazon biota.*Scripta Geology*, 133:441.
- Whitehead, P.J.P. 1985. *Clupeoid fishes of the world-* FAO fisheries synopsis No. 125, Volume 7, Part 1 suborder clupeoidei.
- Wilson, A. B.; Teugels, G. G.; Meyer, A. 2008. Marine Incursion: The Freshwater Herring of lake Tanganyika are the Product of a Marine Invasion into West Africa. *Plos One* 3(4):e 1979.
- Ximenes, A. M. 2011. *Caracterização genética preliminar do gênero Pellona nas regiões de Santarém e Abaetetuba*. Trabalho de Conclusão de Curso (TCC), Universidade Federal do Pará- Universidade Federal do Oeste do Pará, Campus de Santarém. 44pp.
- Ximenes, A.M.; Hernández-Ruz, E.J.; Machado, V.N.; Rodrigues, L.R.R.; Ritter, S.G.; Farias, I.P. 2014. Microsatellite markes for Amazon pellation *Pellona castelnaeana* (Clupeiformes: Pristigasteridae). Accepted *Genetics and Molecular Research*..