



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
MUSEU PARAENSE EMÍLIO GOELDI
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOLOGIA
CURSO DE DOUTORADO EM ZOOLOGIA**

**GENÉTICA DE POPULAÇÕES DE PIRARUCUS
(*Arapaima gigas*) DA RESERVA MAMIRAUÁ E
CONSIDERAÇÕES SOBRE ESTRUTURA GENÉTICA
PARA A ESPÉCIE**

JULIANA ARARIPE GOMES DA SILVA

**Tese de doutorado
apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Zoologia
do Museu Paraense Emílio
Goeldi e Universidade Federal
do Pará como requisito final
para obtenção do grau de
Doutor em Zoologia.**

**Orientador: Prof. Dr. Horacio
Schneider**

**BELÉM – PA
2008**

JULIANA ARARIPE GOMES DA SILVA

**GENÉTICA DE POPULAÇÕES DE PIRARUCUS (*Arapaima
gigas*) DA RESERVA MAMIRAUÁ E CONSIDERAÇÕES SOBRE
ESTRUTURA GENÉTICA PARA A ESPÉCIE**

**Tese de doutorado
apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Zoologia
do Museu Paraense Emílio
Goeldi e Universidade Federal
do Pará como requisito final
para obtenção do grau de
Doutor em Zoologia.**

**Orientador: Prof. Dr. Horacio
Schneider**

**BELÉM - PA
2008**

JULIANA ARARIPE GOMES DA SILVA

GENÉTICA DE POPULAÇÕES DE PIRARUCUS (*Arapaima gigas*) DA RESERVA MAMIRAUÁ E CONSIDERAÇÕES SOBRE ESTRUTURA GENÉTICA PARA A ESPÉCIE

Tese aprovada como requisito para obtenção do grau de Doutor no curso de Pós-Graduação em Zoologia do Museu Paraense Emílio Goeldi e Universidade Federal do Pará pela comissão formada pelos seguintes membros:

Orientador:

Prof. Dr. Horacio Schneider
IECOS (Bragança) – UFPA (titular)

Prof. Dr. Orlando Moreira Filho
Depto Genética e Evolução UFSCar (titular)

Prof. Dr. Helder Lima de Queiroz
MPEG / Instituto Mamirauá (titular)

Prof. Dr. Marcelo Vallinoto
IECOS (Bragança) - UFPA (titular)

Dr. Jonhatan Stuart Ready
IECOS (Bragança) - UFPA (titular)

Profa. Dra. Wilséa Figueredo
IECOS (Bragança) - UFPA (suplente)

Belém, 24 de outubro de 2008

DEDICATÓRIA

**Ao meu marido Péricles
e nosso “recheio”, Rafael.**

AGRADECIMENTOS

Ao longo destes quatro anos de doutorado, muitos foram os que de, alguma forma, me ajudaram a concluir mais esta etapa profissional. Dentre tantos, sou especialmente grata a:

Ao Prof. Horacio Schneider, pela orientação e exemplo profissional dado ao longo de toda pós-graduação.

A Profa. Iracilda Sampaio por todo apoio dado durante o desenvolvimento deste trabalho e pela preciosa co-orientação.

Ao Dr. Helder Queiroz, pelas discussões sobre o pirarucu e toda ajuda junto ao Instituto Mamirauá.

Ao Péricles Sena, Prof. Marcelo Vallinoto, Profa. Wilséa Figueiredo, Eduardo Varella e Prof. Eduardo Santos pelas conversas sobre genética de populações.

Ao Péricles Sena pelas inúmeras contribuições sobre o trabalho e pelo seu amor e companheirismo.

A todos do grupo de Manejo de Pesca do Instituto Mamirauá, em especial a Caroline Arantes, Ellen Amaral, Saíde Barbosa, Nataluzo e Kelven Lopes pelas indispensáveis ajuda nas coletas dos tecidos de pirarucus.

A Simoni Santos pela ajuda na viagem de campo para coleta das amostras.

A Fernanda Atanaena pelas amostras de Tucuruí.

A Izeni Farias por fornecer amostras dos *primers* marcados.

Ao pessoal do processamento de dados do Instituto Mamirauá por me fornecer os mapas da reserva.

A Luciana Watanabe pela imprescindível ajuda nos trabalhos laboratoriais.

A Simoni Santos e Grazielle Gomes pela amizade e conversas de trabalho e “extra-profissionais” durante estes anos.

A todos do Laboratório de Genética e Biologia Molecular, não citarei nomes para não correr o risco de esquecer algum. Sou grata a TODOS.

Ao curso de Pós-Graduação do Museu Paraense Emílio Goeldi / UFPA, por colaborar com minha formação profissional. Um agradecimento especial à Dorotéa e a Anete.

A minha família, que tanto me ajudou em momentos em que precisei, em especial a Liana.

Agradeço também ao Colares e a Linda pelo apoio dado durante as estadias em Belém.

Sou grata ao CNPq pelo financiamento deste projeto através do PPG-7 e da bolsa de doutorado.

A UFPA pelo apoio logístico dado durante o trabalho.

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA	IV
AGRADECIMENTOS	V
SUMÁRIO	VII
LISTA DE FIGURAS	IX
LISTA DE TABELAS	XI
RESUMO	XIII
ABSTRACT	XIV
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 ASPECTOS GERAIS DO PIRARUCU.....	1
1.2 REPRODUÇÃO E DISPERSÃO DO PIRARUCU.....	4
1.3 A PESCA DO PIRARUCU.....	6
1.4 A RESERVA MAMIRAUÁ.....	10
1.5 LEGISLAÇÃO PESQUEIRA PARA O PIRARUCU.....	16
1.6. O MANEJO DO PIRARUCU NA RESERVA MAMIRAUÁ.....	19
1.7. ESTUDOS GENÉTICOS COM POPULAÇÕES DE PIRARUCU.....	22
1.8 OS MARCADORES MICROSSATÉLITES.....	27
1.9 OBJETIVOS.....	28
2. MATERIAL E MÉTODOS	30
2.1 ÁREA DE ESTUDO.....	30
2.2 COLETA DAS AMOSTRAS.....	30
2.3 ISOLAMENTO DO MATERIAL GENÉTICO.....	32
2.4 AMPLIFICAÇÃO DAS REGIÕES MICROSSATÉLITES.....	32
2.5 GENOTIPAGEM DOS MICROSSATÉLITES.....	34
2.6 ANÁLISES COMPUTACIONAIS.....	35
2.6.1. Caracterização das populações da Reserva Mimirauá.....	36
2.6.2. Análises populacionais.....	39
3. RESULTADOS	49
3.1. GENOTIPAGEM.....	49

3.2. CARACTERIZAÇÃO DAS POPULAÇÕES DA RDSM.....	51
3.3. ANÁLISES POPULACIONAIS.....	58
3.3.1 Ocorre mudança da diversidade genética dos pirarucus a cada ano?	58
3.3.2 Os pirarucus do setor Jarauá são geneticamente semelhantes?	62
3.3.3 Existe diferença genética entre os pirarucus do Jarauá e do Maraã?	62
3.3.4 Existe diferença genética entre os pirarucus de Mimirauá e os de Santarém e Tucuruí?	64
4. DISCUSSÃO	69
4.1. CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DOS PIRARUCUS DA RDSM...	69
4.2. O MANEJO DOS PIRARUCUS NA RESERVA MAMIRAUÁ.....	75
4.3 ASPECTOS POPULACIONAIS DOS PIRARUCUS DA RDSM	82
4.4 ESTRUTURA POPULACIONAL DE PIRARUCUS DA RDSM, SANTARÉM E TUCURUÍ.....	84
5. CONCLUSÕES	90
6. REFERÊNCIAS	92

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Exemplos adultos de pirarucu (<i>Arapaima gigas</i>) (Fotos: A - www.mamiraua.org.br ; B - Kelven Lopes).....	2
Figura 2: Mapa de distribuição de <i>Arapaima gigas</i> . Modificado de Hrbek <i>et al.</i> (2005).....	3
Figura 3: Principais formas de comercialização do pirarucu. A - manta salgada (www. http://come-se.blogspot.com/2008_04_01_archive.html); B - manta fresca; C - charuto (peixe eviscerado e descabeçado). Fotos B e C: Juliana Araripe e Simoni Santos.....	7
Figura 4: Principais formas de captura de pirarucus. A - pesca tradicional com arpão (www.mamiraua.org.br); B - captura com uso de redes malhadeiras (Foto: Juliana Araripe e Simoni Santos).....	11
Figura 5: Mapa mostrando a localização da RDS Mamirauá, a RDS Amanã e o PN do Jaú, formando o maior corredor de área protegida de floresta tropical do mundo (Fonte:IDSM).....	12
Figura 6: Mapa da Reserva de Desenvolvimento Sustentável Mamirauá mostrando a área focal e área subsidiária. (Fonte: IDSM).....	13
Figura 7: Mapa da área focal da Reserva Mamirauá mostrando a delimitação dos setores (Fonte:IDSM).....	14
Figura 8: Mapa do setor Jarauá mostrando os principais lagos (Fonte: IDSM).....	15
Figura 9: Imagem mostrando parte da Reserva Mamirauá durante o período seco (A) e cheio (B). A área de cor clara corresponde a ambiente alagado.....	17
Figura 10: Mapa da área focal da Reserva Mamirauá mostrando o sistema de zoneamento proposto para proteção de pirarucus (Fonte: Queiroz & Sardinha, 1999).....	21
Figura 11: Mapa com localização aproximada dos três complexos de lagos no Maraã.....	23
Figura 12: Mapa da Reserva Mamirauá mostrando a localização do Jarauá e do Maraã (Fonte: modificado de IDSM).....	31
Figura 13: Corpos d'água com mais de oito amostras genotipadas no setor Jarauá.	45

Figura 14: Imagem do Complexo Lago Preto (Maraã) durante a cheia mostrando os oito lagos analisados. LP significa Lago Preto.....	47
Figura 15: Padrões de genotipagem produzidos pelo programa <i>Fragment Profiler</i> mostrando os picos dos alelos (marcados) e picos inespecíficos (<i>stutters</i>). A-homozigoto, B-heterozigoto para alelos com mais de 2pb de diferença, C-heterozigoto para alelos com 2pb de diferença.....	50
Figura 16: Gráfico mostrando o resultado da análise bayesiana do programa <i>Structure</i> . No gráfico A os valores de $\ln P(X/K)$ e em B o valor corrigido (ΔK) para as sete populações simuladas.....	67
Figura 17: Perfil de contribuição genética de cada estoque considerando $K=2$ para cada indivíduo analisado das populações do Jarauá, Maraã, Santarém e Tucuruí. A cor verde representa um estoque e a vermelha outro.	68
Figura 18: Gráficos de densidade de pirarucus no Setor Jarauá (A) e no Complexo Lago Preto – Maraã (B) segundo Arantes <i>et al.</i> (2006) (retirado de IDSM, 2008).....	77
Figura 19: Perfil do ambiente de várzea mostrando a dinâmica de dispersão dos pirarucus durante a seca (A e C) e cheia (B). Adaptado de Ayres (2006).....	79

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Locos microssatélites analisados indicando a repetição, seqüência dos iniciadores, fluorescência, tamanho e número de alelos caracterizados por Farias <i>et al.</i> (2003).....	33
Tabela 2: Parâmetros e programas utilizados para responder às perguntas e o número de indivíduos e procedência usados em cada banco de dados.	41
Tabela 3: Número de alelos encontrados para cada loco nas populações de pirarucus caracterizadas. Total de alelos se refere ao número total de alelos identificados em Mamirauá, Santarém e Tucuruí. A percentagem total de alelos para cada população foi calculada a partir do total de alelos descritos (54 alelos).	52
Tabela 4: Riqueza alélica (R_a) estimada para as populações de pirarucus do Jarauá, Maraã, RDSM (Jarauá + Maraã), Santarém e Tucuruí.....	53
Tabela 5: Freqüências alélicas, alelos exclusivos e alelos novos para as populações de pirarucus do setor Jarauá, Maraã, Santarém e Tucuruí. A percentagem dos alelos mais freqüentes para cada loco em cada população foi sombreada. Os alelos indicados com negrito e asterisco (*) são alelos novos.	54
Tabela 6: Freqüências de alelos raros (AR) e alelos exclusivos (AE) identificados nas populações de pirarucus de Jarauá, Maraã, Santarém e Tucuruí.....	56
Tabela 7: Índices de heterozigosidade observada (H_o) e esperada (H_e) para as populações de pirarucus do Jarauá, Maraã e RDSM (Jarauá + Maraã).....	57
Tabela 8: Número de alelos (N_a) e riqueza alélica (R_a) para a população de pirarucus do setor Jarauá nos anos de 2002 a 2006.....	60
Tabela 9: Freqüências alélicas e alelos exclusivos para as populações de pirarucus do setor Jarauá coletadas entre os anos de 2002 e 2006. Em destaque (sombreado), os alelos mais freqüentes para cada loco em cada ano.	61
Tabela 10: Matriz de diferenciação genética (F_{st}) (abaixo da diagonal) e da distância geográfica em quilômetros (acima da diagonal) entre 15 lagos do setor Jarauá. A última coluna mostra a distância geográfica entre os lagos do Jarauá e o Complexo Lago Preto (Maraã). Os valores em negrito e asterisco (*) correspondem a F_{st} significativa ($p < 0,05$).....	63

- Tabela 11:** Índices de fixação F_{st} (abaixo da diagonal) e distância geográfica em quilômetros (acima da diagonal) estimados entre as populações de pirarucus do Jarauá, Maraã, Santarém e Tucuruí. Todos os valores de F_{st} foram significantes. **66**
- Tabela 12:** Caracterizações e estudos populacionais com peixes usando marcadores microssatélites mostrando o número de indivíduos analisados (N), número de locos, médias de heterozigosidade observada (H_o) e esperada (H_e), número médio de alelos por locos e fonte..... **72**
- Tabela 13:** Número de pirarucus contados, cota disponível, autorizada e número de pirarucus capturados a cada ano no setor Jarauá. A cota disponível corresponde a 30% do total de pirarucus adultos do ano anterior. Adaptado de Viana *et al.*, 2007 e IDSM, 2008..... **76**

RESUMO

O pirarucu (*Arapaima gigas*) é um importante recurso pesqueiro da região amazônica, que vem sendo explorado desde o século XIX, havendo indícios de diminuição do tamanho populacional em algumas localidades ao longo da sua distribuição. O manejo da pesca vem sendo uma das estratégias adotadas para manter essa atividade pesqueira associada a conservação da espécie. Neste trabalho avaliamos aspectos populacionais de pirarucus de duas localidades da Reserva Mamirauá (Jarauá e Maraã), e comparamos estas com as populações já analisadas de Santarém e Tucuruí, verificando suas variabilidade e estrutura genética. Para isso foram utilizados sete locos microsatélites genotipados para 463 pirarucus da Reserva Mamirauá coletados ao longo de cinco anos. Nossos resultados encontraram uma maior diversidade genética para esta população em comparação as encontradas em Santarém e Tucuruí. As análises indicam que o manejo está sendo ecologicamente eficiente, não tendo havido alterações significantes ao longo dos cinco anos de estudo. A migração lateral, associada a um possível padrão de retorno ao lago sem fidelidade espacial, parece ter grande importância na homogeneização genética local. Entretanto, este fator é espacialmente limitado, sendo observada uma pequena diferenciação entre os pirarucus do Jarauá e do Maraã. Entre localidades mais distantes, a diferenciação é maior, apesar de somente a distância não ser capaz de explicar esse fenômeno. Acreditamos que a diminuição populacional em localidades intermediárias, provavelmente causada por sobre-pesca, pode estar influenciando a conectividade ao longo dos pontos estudados.

ABSTRACT

The pirarucu (*Arapaima gigas*) is an important fishing resource in the Amazon which has been exploited since the XIXth century. There are indications of a decrease in population size in some parts of its distribution. Management is one of the strategies adopted to maintain fishing activity associated to the conservation of the species. We evaluate aspects of pirarucu populations in two places in the Mamirauá Reserve (Jarauá and Maraã), and compare these populations with those of Santarém and Tucuruí, analyzing their genetic variability and structure. In order to achieve this, seven microsatellite loci were genotyped for 463 pirarucus from Mamirauá Reserve collected along five years. Our results show a greater genetic diversity for this population in comparison to populations from Santarém and Tucuruí. Analyses indicate that management has been ecologically efficient, since there were no significant change in genetic diversity over the five years of study. Lateral migration, associated with a possible standardized return to lakes without spacial fidelity seems to have great importance for local genetic admixture. However, this admixture is limited in space, with a small degree of genetic differentiation seem between pirarucus from Jarauá and Maraã. When including more distant localities to the analysis, the differentiation is greater though geographic distance cannot explain all of this. We believe that a population decline in intermediate localities, probably caused by overexploiting is influencing the connectivity among the localities studied.

1. INTRODUÇÃO

1.1 ASPECTOS GERAIS DO PIRARUCU

O pirarucu (*Arapaima gigas* Cuvier, 1817) é um dos mais importantes recursos pesqueiros na região amazônica, apresentando uma grande biomassa e agregando um alto valor de mercado nas principais cidades da região norte do Brasil (**Figura 1**). Única espécie representante do gênero *Arapaima*, é tradicionalmente classificada como pertencente à família Osteoglossidae (Nelson, 1994), composta por duas subfamílias: Osteoglossinae, incluindo *Osteoglossum* e *Scleropages* e Heteritidinae, composta por *Heterotis* e *Arapaima*. Mais recentemente, Ferraris Jr. (2003) classificou-o em uma família própria (Arapaimidae) composta exclusivamente por *Arapaima gigas*.

Atualmente este peixe pode ser encontrado em toda a bacia amazônica, havendo ainda registro de sua ocorrência no Rio Essequibo (Guiana), assim como de fósseis na bacia do rio Magdalena (Colômbia) (**Figura 2**). Reconhecido como o maior peixe de escamas do mundo (Nelson, 1994), esta espécie chega a atingir mais de 3 metros de comprimento e pesar mais de 200 Kg na natureza. Os principais itens da sua dieta são outros peixes além de alguns invertebrados, tais como insetos, crustáceos e moluscos (Queiroz, 2000). A língua óssea característica, que denomina a família, atua juntamente com duas placas bucais ósseas laterais e uma palatina matando a presa antes da deglutição (Neves, 1995).

Um outro aspecto importante a respeito da biologia desta espécie diz respeito à sua respiração. Durante toda a vida, o pirarucu apresenta dois



A



B

Figura 1: Exemplos adultos de pirarucu (*Arapaima gigas*) (Fotos: A - www.mamiraua.org.br; B - Kelven Lopes).

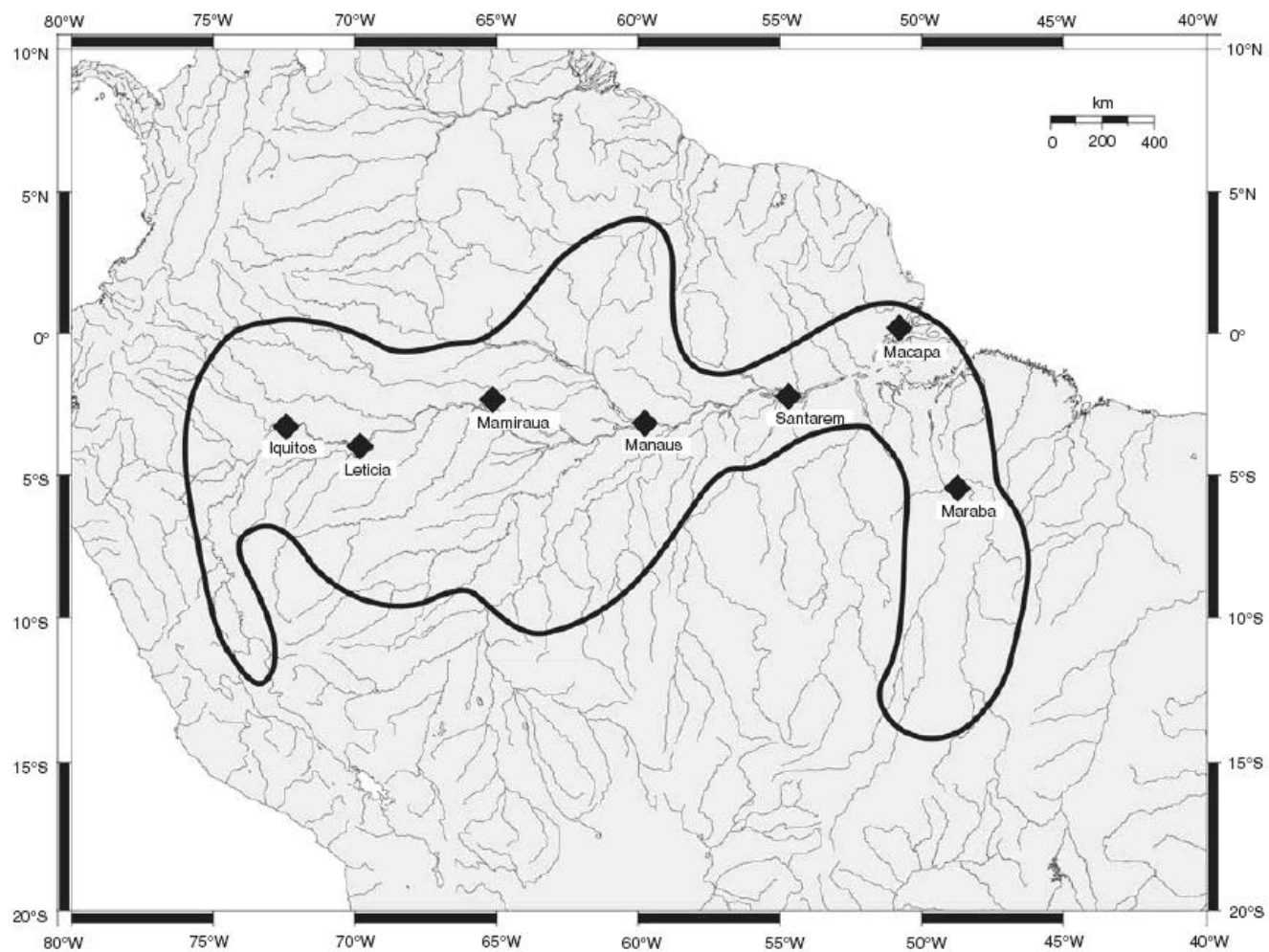


Figura 2: Mapa de distribuição de *Arapaima gigas*. Modificado de Hrbek *et al.* (2005).

sistemas de obtenção de oxigênio: a respiração branquial característica dos peixes, menos importante para esta espécie, e uma bexiga natatória altamente vascularizada, que captura ar atmosférico (Sawaya, 1946). Esta adaptação respiratória parece ter grande importância ecológica, tendo em vista que o ambiente em que este vive apresenta uma baixa oxigenação da água. Na Reserva Mamirauá (AM) este valor pode chegar a menos de 10% de oxigênio dissolvido em águas de suas várzeas com profundidade superior a 4 metros (Henderson, 1999).

Nos últimos anos esta espécie tem despertado grande interesse para aqüicultura, principalmente por sua grande biomassa. Alguns aspectos têm reforçado o grande potencial do pirarucu em estações de pisciculturas, tais como o rápido crescimento, uma vez que a espécie atinge cerca de 10 Kg no primeiro ano de cultivo, e a rusticidade característica da espécie, que se desenvolve bem em tanques cimentados ou açudes, dispensando sistemas de aeração (Imbiriba, 2001). Além disso, a espécie apresenta um elevado rendimento de carcaça (57%) associado a uma alta capacidade de produção de carne (4.560 Kg/ha/ano). Estes parâmetros superam outros cultivos, tais como bovino (52% e 203 Kg/ha/ano) e bubalino (50% e 225 Kg/ha/ano) (Imbiriba *et al.*, 1994).

1.2 REPRODUÇÃO E DISPERSÃO DO PIRARUCU

Aspectos relacionados à reprodução e dispersão de uma espécie são de grande importância para estudos de dinâmica populacional. No caso do pirarucu, estes dois são intimamente relacionados. Lowe-McConnell (1987) cita

dois tipos de migração desempenhados por peixes de planícies alagadas: a longitudinal e a lateral. O deslocamento longitudinal, aqui referido como migração, foi pouco estudado no pirarucu, o qual é tradicionalmente classificado como sedentário. Queiroz (2000) encontrou uma dispersão média de 13,7 Km/ano para pirarucus recapturados de 0,5 a 18 meses após a marcação, entretanto, estes dados são preliminares devido a pequena recaptura descrita pelo autor. A distância em linha reta entre o ponto de soltura e de recaptura variou de 3,9 a 64,2 Km. Por outro lado, este autor relata ainda a recuperação de dois indivíduos cinco anos após a marcação somente a 400 m do local de soltura.

Recentemente, Castello (2008a) descreveu em detalhes o padrão de deslocamento lateral desta espécie. Os padrões sazonais de deslocamento desenvolvidos pelo pirarucu são intimamente relacionados à suas atividades reprodutivas, que se iniciam ainda no período seco, quando os reprodutores encontram-se principalmente nos lagos, ressacas e canos. Uma vez que o volume destes corpos d'água encontra-se reduzido, a densidade desse peixe é bastante alta, facilitando o pareamento dos casais. Neste período, as gônadas já estão desenvolvidas e inicia-se o comportamento de cômte do par, os quais juntos constroem o ninho. Estes ninhos têm em média 50 cm de diâmetro e 16 cm de profundidade e são cavados principalmente em substratos arenosos nas bordas dos lagos e ressacas durante o início da enchente (Castello, 2008b). A fêmea então coloca uma grande quantidade de ovos e o macho em seguida os fecunda, cuidando do ninho até a eclosão dos ovos. As larvas permanecem no ninho até a completa absorção do vitelo, o que dura aproximadamente cinco

dias (Neves, 1995). Os alevinos são gregários, nadando próximo à cabeça do macho. Em ambientes de várzea, quando o nível das águas começa a subir, os machos, juntamente com os filhotes, migram para as florestas alagadas, onde este cuida dos filhotes por aproximadamente três meses. A inundação de áreas antes secas proporciona benefícios para esta espécie, tais como farta disponibilidade alimentar, tanto para o adulto como para os juvenis, assim como proteção pela vegetação submersa da restinga e chavascal. Quando o nível das águas começa a baixar, o pirarucu macho se separa dos juvenis, e todos, gradualmente, retornam para as porções mais baixas da várzea. Desta forma todo o ciclo anual é reiniciado. A maturidade sexual para esta espécie é atingida com aproximadamente cinco anos de idade, quando este mede cerca de 1,60 m de comprimento total (Lopes, 2005; Queiroz & Sardinha, 1999).

1.3 A PESCA DO PIRARUCU

A pesca do pirarucu tem sido uma atividade de grande importância para a região amazônica desde o século XVII, onde este peixe vem sendo comercializado sob a forma de mantas salgadas, salmoradas ou ainda *in natura* (carne fresca) (Veríssimo, 1895). A atual comercialização de pirarucus frescos normalmente é feita entre os barcos compradores e os pescadores (ou associações de pescadores), que os negociam na forma de mantas filetadas ou o animal eviscerado (descabeçado ou não) conhecido popularmente como charuto. A **Figura 3** mostra a preparação de pirarucus nas formas de manta e charuto.



A



B



C

Figura 3: Principais formas de comercialização do pirarucu. A - manta salgada ([www. http://come-se.blogspot.com/2008_04_01_archive.html](http://come-se.blogspot.com/2008_04_01_archive.html)); B - manta fresca; C - charuto (peixe eviscerado e descabeçado). Fotos B e C: Juliana Araripe e Simoni Santos.

A grande exploração deste recurso próximo às grandes cidades da região amazônica, como Belém, Santarém e Manaus, tem levado a uma notável diminuição do estoque, o qual na década de 70 tornou-se comercialmente extinto próximo a alguns centros urbanos amazônicos (Goulding, 1980; Bayley & Petrete Jr., 1989). Infelizmente, não existem dados seriados que ilustrem seguramente a quantidade deste recurso pescado ao longo dos anos na bacia amazônica, somente sendo disponíveis dados pontuais. Existem evidências de que no final do século XIX foram desembarcadas em Belém uma média de 1.300 toneladas de pirarucu por ano (Veríssimo, 1895). Poucas décadas depois, os dados apontam para desembarques menos significativos neste mesmo porto, de forma que em meados do século XX foi relatado desembarque de 300 toneladas anuais (Menezes, 1951). Esta diminuição pode ser reflexo da pesca excessiva que foi historicamente exercida sobre esta espécie.

Mesmo dentro de áreas em que a pressão de pesca foi historicamente menos significativa, como a Reserva Mamirauá, muitos habitantes locais afirmam ter percebido uma diminuição na produção deste peixe. Se isto é um fato, pode estar relacionada à ampla utilização de equipamentos de pesca de baixa seletividade, como a malhadeira (Queiroz & Sardinha, 1999). Contudo, o acompanhamento da captura de pirarucus dentro da área focal da Reserva Mamirauá durante três anos consecutivos também sugeriu que esta população poderia está sendo submetida à sobrepesca (Queiroz & Sardinha, 1999).

Estas evidências, apesar de incipientes, sugerem que medidas devam ser adotadas, visando a perpetuação deste recurso. A partir da publicação da

Instrução Normativa de 21 de maio de 2004 (MMA-IBAMA), o pirarucu foi considerado espécie sobre-explorada ou ameaçada de sobre-exploração. Este documento determinava ainda que fosse elaborado um plano de gestão para esta espécie em um prazo máximo de cinco anos.

Algumas características biológicas do pirarucu interferem diretamente na vulnerabilidade da espécie. Enquanto por um lado a respiração aérea obrigatória facilita sua visualização e captura, o ambiente preferencialmente utilizado por ele dificulta o acesso de embarcações de grande porte que fazem a pesca comercial. Uma vez que prefere ambiente com pouca correnteza e pouca profundidade, esta espécie é pouco encontrada na porção central da calha dos grandes rios (Castello, 2008a). Este autor demonstrou a preferência deste peixe por ambientes de águas “paradas”, tais como as encontradas nas várzeas. Este ambiente, por conta de sua fisionomia, naturalmente impede o acesso de barcos grandes, limitando assim a exploração deste recurso.

A pesca desenvolvida em ambiente de várzea é feita com embarcações de pequeno porte, com o uso do arpão comumente associado ao uso de redes malhadeiras (Barthem, 1999). É comum se espalhar redes ao redor da área a ser explorada, as quais impedem a saída do pirarucu destes corpos d’água e facilitam sua captura. Os pescadores se distribuem em canoas ao longo do lago, aguardando o momento em que estes peixes sobem à superfície para respirar ar atmosférico, quando são então arpoados. É freqüente também a captura de pirarucus emaranhados nas redes, de onde são prontamente retirados e abatidos. A **Figura 4** ilustra a pesca do pirarucu utilizando estas duas estratégias de pesca.

1.4 A RESERVA MAMIRAUÁ

A Reserva de Desenvolvimento Sustentável Mamirauá (RDSDM) foi a primeira unidade de conservação integrante desta categoria no Brasil. Juntamente com a Reserva de Desenvolvimento Sustentável Amanã (RDSA) e o Parque Nacional do Jaú, formam a maior área protegida de floresta tropical do mundo (**Figura 5**). Localizada no alto Amazonas, próximo a cidade de Tefé (AM), a Reserva Mamirauá é delimitada pelos rios Solimões e Japurá, os quais confluem na porção ao sul da reserva, e ao norte pelo rio Auati-paraná (**Figura 6**). Desde sua implementação, a reserva foi dividida em área focal, onde foram desenvolvidos os estudos pilotos, e área subsidiária, a qual abrange aproximadamente 85% do total da reserva.

A área focal da Reserva Mamirauá (**Figura 7**) é composta por setores, os quais foram delimitados considerando-se aspectos sócio-econômicos, hidrológicos e ecológicos do local. O manejo do pirarucu é atualmente desenvolvido em dois setores da área focal (Jarauá e Tijuaca) e nos lagos próximos à cidade de Maraã, na área subsidiária da reserva. O setor Jarauá (**Figura 8**) é o que apresenta maior área, com aproximadamente 563 Km² e cerca de 60% dos lagos de toda área focal (Queiroz, 1999). Seu comprimento é de aproximadamente 40 Km em linha reta, e, durante o período da cheia, todos seus corpos d'água são de alguma forma conectados.



A



B

Figura 4: Principais formas de captura de pirarucus. A - pesca tradicional com arpão (www.mamiraua.org.br); B - captura com uso de redes malhadeiras (Foto: Juliana Araripe e Simoni Santos).

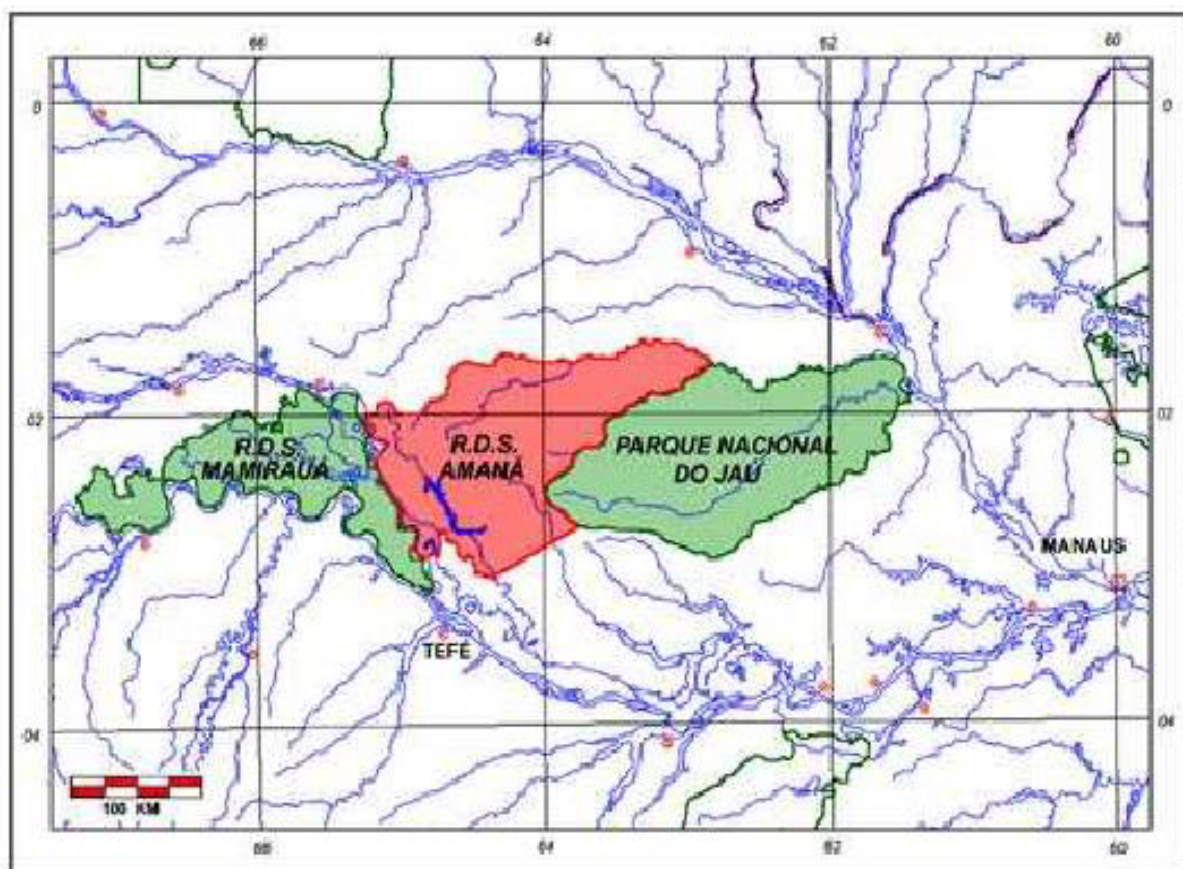


Figura 5: Mapa mostrando a localização da RDS Mamirauá, a RDS Amanã e o PN do Jaú, formando o maior corredor de área protegida de floresta tropical do mundo (Fonte:IDSM).

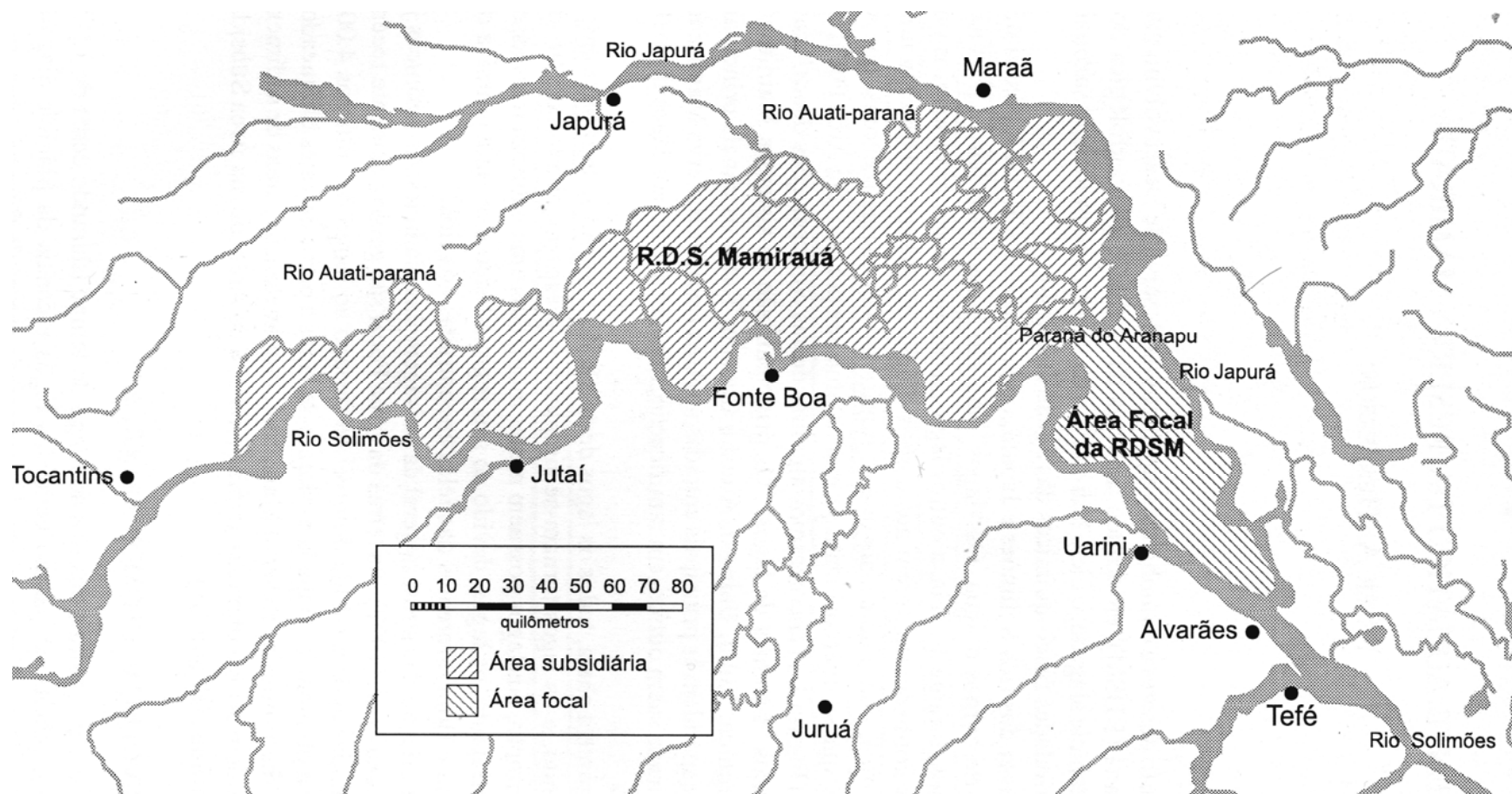


Figura 6: Mapa da Reserva de Desenvolvimento Sustentável Mamirauá mostrando a área focal e área subsidiária. (Fonte: IDSM)

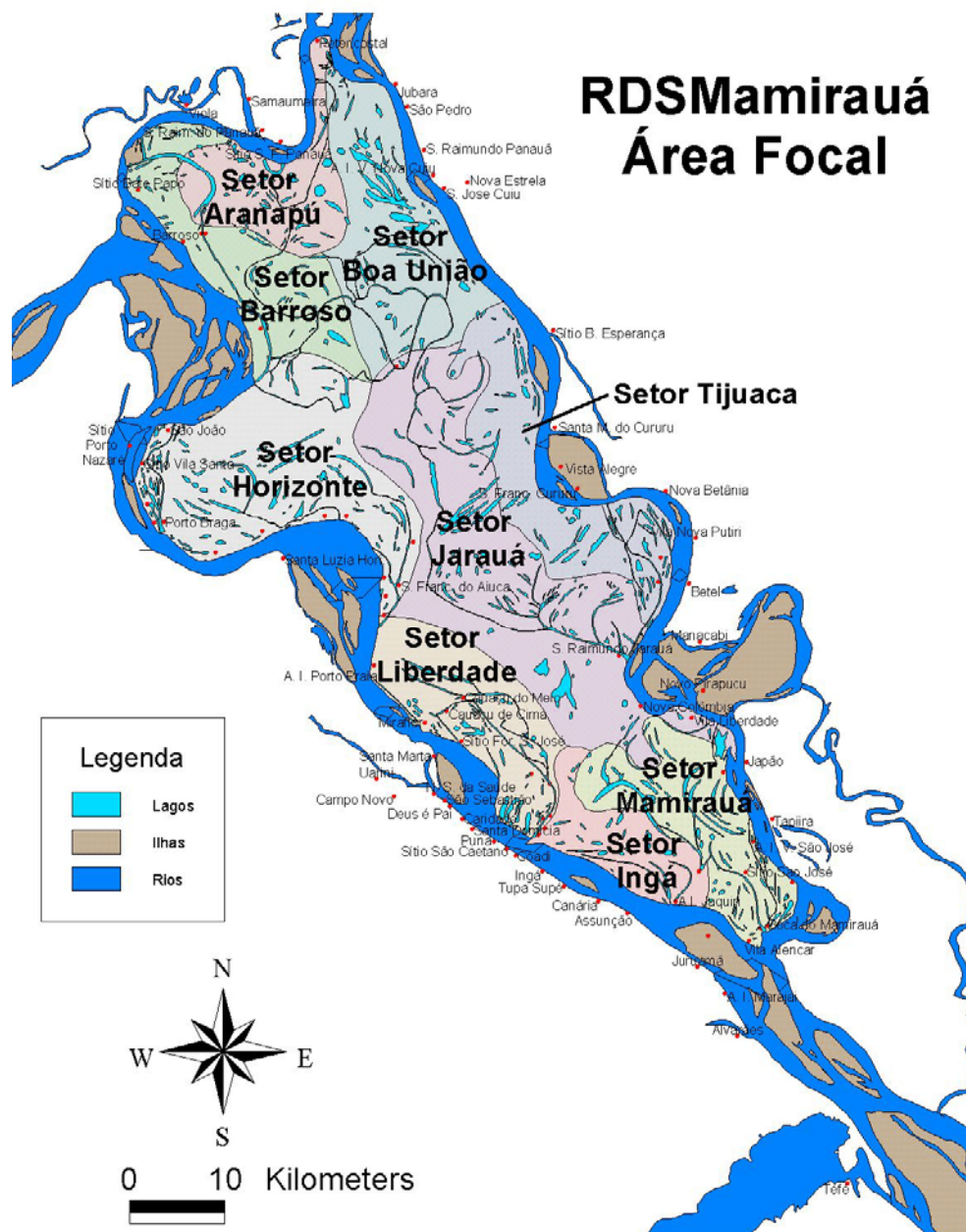


Figura 7: Mapa da área focal da Reserva Mimirauá mostrando a delimitação dos setores (Fonte:IDSM).

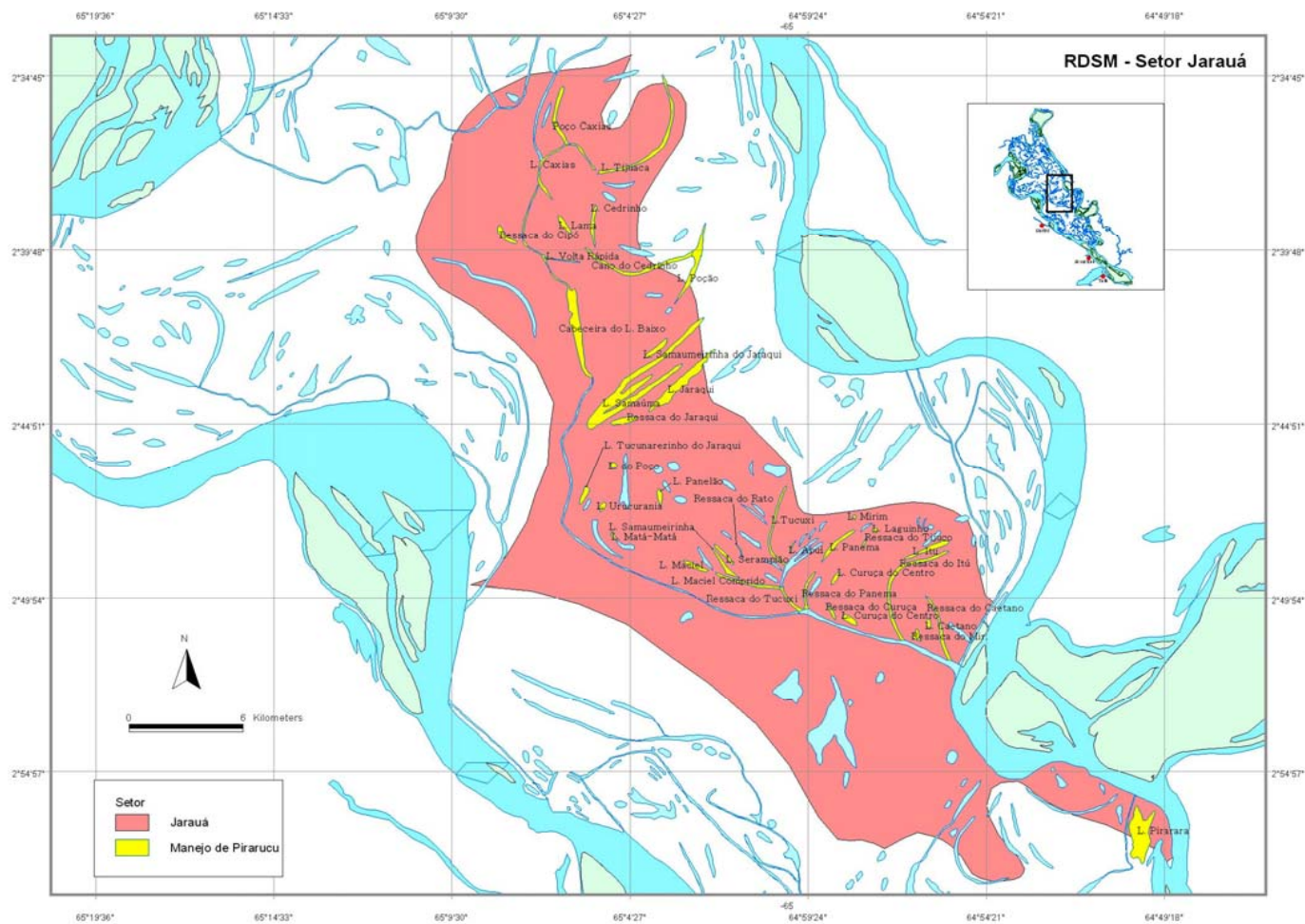


Figura 8: Mapa do setor Jarauá mostrando os principais lagos (Fonte: IDSM).

A Reserva Mamirauá possui cerca de 1.124.000 hectares cobertos por florestas e outras formações vegetais sazonalmente inundadas (Mamirauá, 1996). A várzea tem destaque dentre os diferentes ambientes por apresentar íntima relação com a dinâmica das águas. A amplitude anual do alagamento neste ecossistema varia entre 10 e 11 m (Henderson, 1999), que costuma levar a uma grande conectividade entre os corpos d'água durante o período da cheia. A **Figura 9** mostra a diferença de área alagada entre as estações seca e cheia. Estes corpos d'água da reserva formam um grande mosaico de ambientes, sendo que um dos mais comuns são os "lagos". É importante ressaltar que os ambientes tradicionalmente denominados "lagos" na Reserva Mamirauá não são lagos verdadeiros, uma vez que estabelecem conexão com outros "lagos", canais ou rios durante a cheia (Henderson, 1999).

1.5 LEGISLAÇÃO PESQUEIRA PARA O PIRARUCU

A pesca do pirarucu é regulada por uma série de normas implementadas pelo Instituto Brasileiro de Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA). A primeira delas foi publicada em 20 de dezembro de 1989, estipulando um tamanho mínimo de captura e comercialização de pirarucus para 1,5 m. Esta medida vem sendo aplicada até os dias atuais, apesar de estudos recentes terem mostrado que o tamanho médio em que os indivíduos iniciam o ciclo reprodutivo é ligeiramente superior ao estabelecido em lei (1,58 m segundo Lopes, 2005 e 1,63 m segundo Queiroz & Sardinha, 1999). Os dados de pirarucus abatidos na Reserva Mamirauá entre os anos de 1993 e 1995 indicam que grande parte destes eram menores que 1,50 m, refletindo o

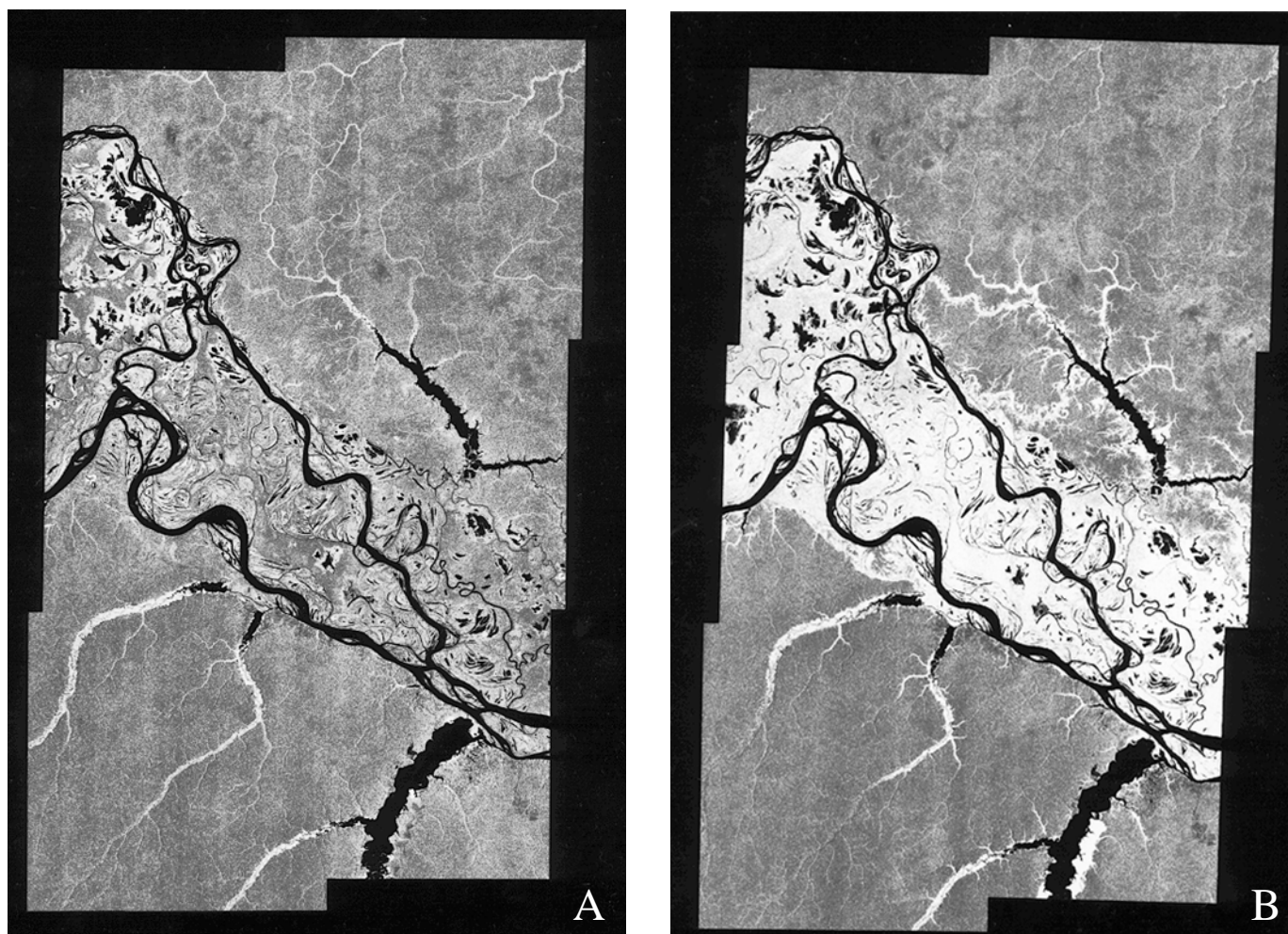


Figura 9: Imagem mostrando parte da Reserva Mamirauá durante o período seco (A) e cheio (B). A área de cor clara corresponde a ambiente alagado.

notável descumprimento destas leis (Queiroz & Sardinha, 1999). Martinelli & Petreire Jr (1999) verificaram, através da correlação entre o tamanho total e o comprimento do osso da língua, que os pirarucus comercializados nos mercados de Santarém e Manaus variavam de 1,10 a 1,35 m de comprimento total, sendo também, menores que o permitido.

Uma segunda portaria (publicada em 4 de março de 1990) determinou o período de defeso entre 01 de dezembro e 31 de maio na bacia amazônica, e entre 01 de outubro e 31 de março nas bacias Araguaia-Tocantins. Este período de proibição da pesca é uma medida efetiva que protege o recurso durante o período de reprodução. Em ambiente de várzea, esta é complementada pela dificuldade natural de acesso à floresta alagada, onde os pirarucus se refugiam durante maior parte do período reprodutivo. Apesar de ser uma medida importante para a conservação deste recurso, falhas no sistema de fiscalização fazem com que esta não seja efetivamente obedecida.

Em 15 de fevereiro de 1993 foi publicada uma terceira portaria, que proíbe a comercialização de mantas de pirarucu salgadas com comprimento inferior a um metro. Este tamanho mínimo de manta necessita, entretanto ser revisto. Segundo Queiroz & Sardinha (1999), mantas secas menores que 1,15 m, assim como mantas frescas ou salmoradas menores que 1,26 m, são provenientes de pirarucus de tamanho inferior ao mínimo permitido por lei (1,50 m).

Além destas normas federais, algumas estaduais foram baixadas, tais como a portaria que proibia a captura e comercialização do pirarucu no estado do Amazonas. A comercialização era permitida somente para animais oriundos

de estações de pisciculturas ou provenientes de sistema de manejo. Esta restrição causou um impacto negativo na renda dos comunitários na Reserva Mamirauá, uma vez que o pirarucu representava cerca de 40% da produção total de pescado para consumo e venda (Queiroz & Sardinha, 1999). Neste contexto, a idéia de desenvolver um manejo comunitário desta espécie surgiu como uma opção para minimizar esse problema (Viana *et al.*, 2007).

1.6 O MANEJO DO PIRARUCU NA RESERVA MAMIRAUÁ

O manejo dos pirarucus na Reserva Mamirauá foi implementado inicialmente no setor Jarauá (em 1999) e posteriormente ampliada para o setor Tijuaca (2001) e Maraã (2002) e para o setor Coraci (2002) na Reserva Amanã (Viana *et al.*, 2007). Além das normas federais que regulam a pesca do pirarucu, o manejo desta espécie dentro da Reserva Mamirauá baseia-se ainda em outras medidas. Uma importante atividade que vem sendo desenvolvida é a estimativa da quantidade de pirarucus a serem pescados a cada ano. Este número é obtido a partir de uma contagem prévia, realizada por pescadores capacitados, tendo sido esta técnica certificada por Castello (2004). A contagem se baseia na necessidade que a espécie tem de captar ar atmosférico a cada 20 minutos, aproximadamente. Desta forma, pescadores experientes são capazes de contar quantos pirarucus habitam o lago no momento em que o peixe emerge (boiada), diferenciando ainda indivíduos adultos (maiores que 1,5 m) e juvenis (de 1 a 1,5 m). Segundo Castello, (2004), o método de contagem mostrou-se eficiente, com uma alta confiabilidade e baixo custo.

Com a disponibilidade desta importante ferramenta para o monitoramento da espécie, foi estipulada a partir de 2000 uma cota de pesca anual correspondendo a aproximadamente 30% do total de adultos contados nos principais lagos do Jarauá. Desde então, anualmente é feita a solicitação de autorização de pesca ao IBAMA com base neste valor, a qual é normalmente atendida (Viana *et al.*, 2007). O acompanhamento da densidade de pirarucus nos setores manejados indica que este nível de pressão de pesca está permitindo a recuperação da população, sendo observado um significativo aumento na quantidade destes peixes nos lagos da reserva (Arantes *et al.*, 2006).

Uma estratégia utilizada no início do manejo foi o rodízio dos lagos de pesca. O sistema de zoneamento proposto no plano de manejo da Reserva Mamirauá previa a existência de duas grandes zonas de proteção permanente dentro da área focal, as quais eram circundadas por zonas de uso sustentável (**Figura 10**). A proposta inicial de manejo nos lagos do setor Jarauá foi baseada no uso descontínuo de 31 dos 133 lagos existentes na sua área de uso. Após a implementação do método de contagem, este rodízio deixou de ser o princípio básico do manejo e o uso dos lagos começou a considerar outros critérios, tais como a quantidade de peixes e a facilidade de acesso aos corpos d'água.

Nos anos de 2001 e 2002, o manejo de pirarucus foi ampliado para outras áreas da reserva, incluindo a colônia de pescadores de Maraã. Os lagos explorados por estes últimos são divididos em três complexos: o Lago Preto, o

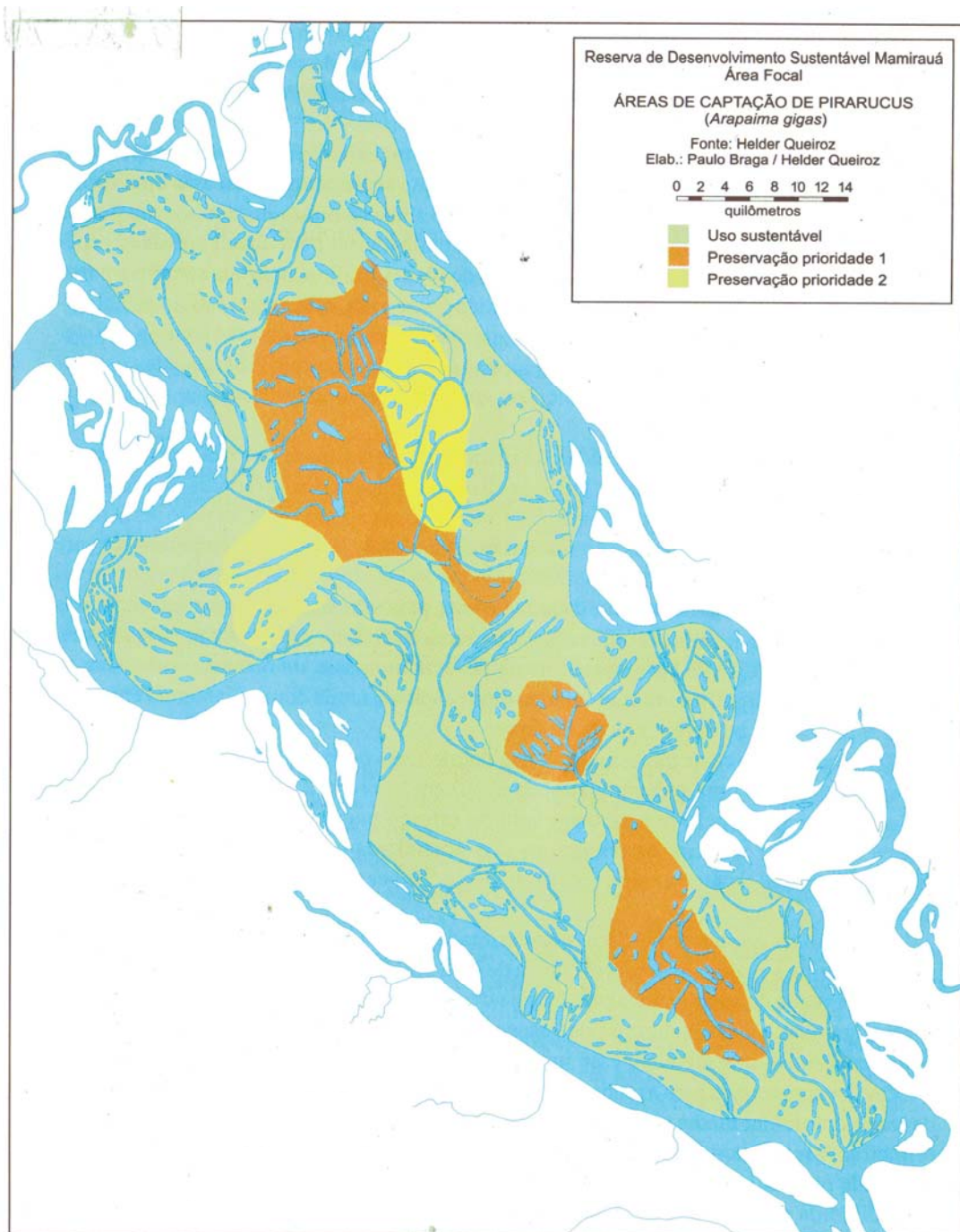


Figura 10: Mapa da área focal da Reserva Mamirauá mostrando o sistema de zoneamento proposto para proteção de pirarucus (Fonte: Queiroz & Sardinha, 1999).

Itaúba e o Tigre. Inicialmente somente o Complexo Lago Preto era manejado, mas a partir de 2005 teve início a pesca nos outros dois complexos (**Figura 11**). O complexo Lago Preto ocupa uma área menor que o Jarauá (aproximadamente 18,5 Km²), mas com uma grande biomassa de pirarucus. Arantes *et al.* (2006) comparou a densidade de pirarucus adultos em quatro localidades da Reserva Mamirauá e Amanã, e encontrou para o ano de 2005 no Jarauá uma densidade de 12,63 ind./Km², enquanto a do Maraã foi de 1067,36 ind./Km².

1.7 ESTUDOS GENÉTICOS COM POPULAÇÕES DE PIRARUCU

Com a ampla utilização de ferramentas genéticas, uma série de estudos foram desenvolvidos nos últimos anos fornecendo informações sobre aspectos gerais do pirarucu. Entretanto, a maioria destes objetivou caracterizar populações, sem que fossem feitas inferências populacionais sobre os mesmo. O primeiro trabalho usando marcadores moleculares foi publicado por Farias *et al.* (2003), os quais desenvolveram 14 iniciadores microssatélites para *Arapaima gigas*. O grau de informação destes locos foi testado em 15 indivíduos oriundos de Santarém (PA), tendo, segundo os autores, apresentado um alto grau de heterozigosidade e número de alelos variando de dois a oito dentro desta pequena amostragem populacional. Estes resultados mostravam que os locos microssatélites descritos tinham bom nível de informação para estudos populacionais.

No mesmo ano e também usando marcadores genéticos, Marques (2003) caracterizou uma população de pirarucus da bacia Araguaia-Tocantins

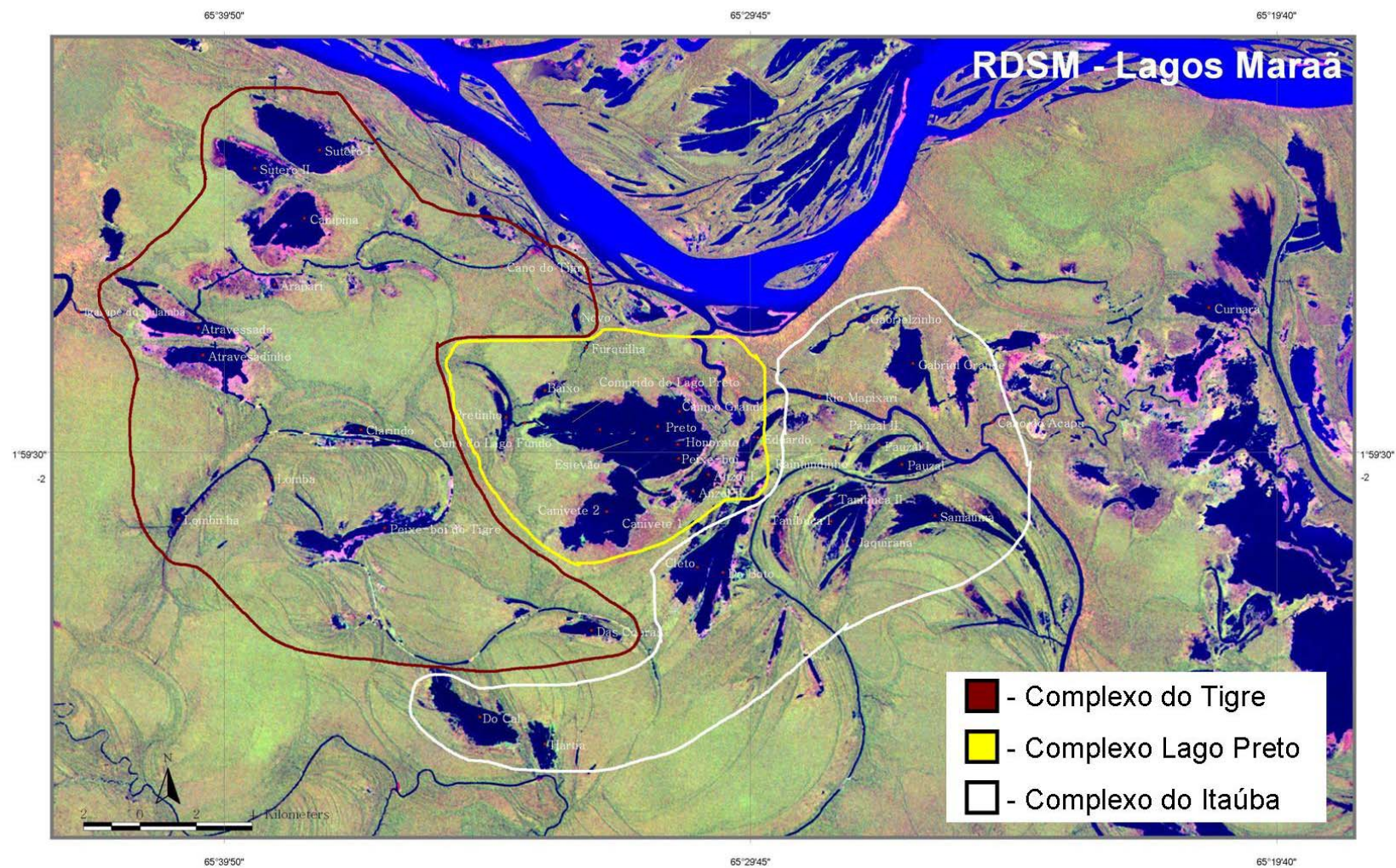


Figura 11: Mapa com localização aproximada dos três complexos de lagos no Maraã.

através de RAPD e citogenética. Os dados moleculares indicavam que as 25 amostras faziam parte de uma única população com significativa variabilidade intra-populacional. A caracterização citogenética da espécie também foi realizada, tendo sido encontrado um número diplóide de 56 ($2n=56$) (Marques *et al.* 2006). Os autores destacam que não foram observadas diferenciações cromossômicas associadas ao sexo.

Hrbek *et al.* (2005) seqüenciaram 2.347 pb do genoma mitocondrial, incluindo parte do NADH1 e da ATPase de 139 pirarucus. As amostras foram coletadas ao longo da distribuição da espécie, totalizando 8 localidades. Foram identificados 34 haplótipos com 44 sítios segregantes. Os dois haplótipos mais freqüentes estavam distribuídos na maioria das localidades amostradas, mas uma alta freqüência de haplótipos raros ou únicos também foi detectada. A comparação entre as populações (F_{st} par-a-par) estimada para estas amostras encontrou diferenciação significativa entre a maioria das localidades, com grande diferenciação entre as mesmas (0,23 a 0,96), sugerindo restrito fluxo gênico entre as localidades. O teste de Mantel mostrou que a distância geográfica somente não é capaz de explicar a diferenciação encontrada ($r = -0,047$, $p = 0,55$). Por outro lado, as análises de clados próximos (*Nested Clade Analysis* – NCA) suportam a hipótese de que as amostras compõem uma população panmítica com fluxo gênico limitado pela distância. Esta última hipótese é apoiada pelos autores, os quais acreditam que a grande diferenciação entre as localidades é um artefato da pressão antrópica sofrida pela espécie próximo aos grandes centros.

Uma análise de autocorrelação espacial com dados de seqüências de DNA mitocondrial e genotipagem usando 14 locos microssatélites foi realizada por Hrbek *et al.* (2007). Estes autores utilizaram os mesmos indivíduos de um trabalho anterior do grupo (Hrbek *et al.*, 2005), com exceção da população de Madre de Dios. Neste estudo eles concluíram que *Arapaima* forma uma população contínua, com grande fluxo gênico entre as localidades. Os dados de microssatélites apóiam a hipótese de isolamento por distância através de Mantel, o que não foi suportado pelos dados de seqüência. As análises de autocorrelação espacial mostram que o fluxo gênico é significativamente limitado entre localidades com mais de 2.500 Km de distância.

Verificando a estrutura genética de pirarucus do médio Amazonas, Hamoy (2006) genotipou oito locos microssatélites para 190 indivíduos de lagos próximos à cidade de Óbidos (PA). Os resultados indicaram uma grande diversidade genética, além de ausência de estruturação e intenso fluxo gênico entre os diferentes lagos amostrados nesta região. A genotipagem desenvolvida utilizou sistema multiplex, na qual foram amplificados oito locos em uma única reação de PCR (Hamoy *et al.*, 2008).

Outros estudos foram desenvolvidos objetivando caracterizar diferentes populações de pirarucus com marcadores microssatélites. Souza (2006) genotipou sete locos para 38 indivíduos coletados nas proximidades da cidade de Tucuruí (PA), tendo encontrado 22 alelos. Um dos locos analisados (m16) não foi informativo para esta população. O número de alelos por locos para esta população foi menor que o descrito por Farias *et al.* (2003) para pirarucus de Santarém.

Seguindo metodologia semelhante, Watanabe (2007) caracterizou 96 pirarucus de duas populações da Reserva Mamirauá através de sete locos microssatélites. Todos os locos foram polimórficos, tendo sido encontrado um total de 49 alelos. Os índices de variabilidades encontrados para esta população foram maiores que os descritos para Tucuruí e Santarém. Para esta amostra, a diferenciação foi baixa, apesar de significativa entre o estoque do Jarauá e do Maraã ($F_{st} = 0,035$, $p < 0,05$) e a AMOVA indicou que 94,4% de toda a variação é encontrada dentro da população da reserva como um todo.

A população de pirarucus de Santarém foi novamente alvo de caracterização genética usando marcadores microssatélites no trabalho de Carvalho (2008). Este autor analisou 60 indivíduos genotipando os mesmos locos que Souza (2006) e Watanabe (2008). Foram identificados nesta população 34 alelos, sendo 11 deles foram maiores ou menores que os descritos por Farias *et al.* (2003). A heterozigosidade média encontrada neste estudo ($H = 0,553$) foi menor que o estimado anteriormente para pirarucus da mesma região.

Recentemente foi descrito o genoma mitocondrial completo do pirarucu (Hrbek & Farias, 2008). Os autores encontraram uma organização dos genes semelhante aos de outros vertebrados, mas com uma região controle menor. A composição desta região foi semelhante ao descrito para outros peixes da ordem Osteoglossiformes. O conhecimento da seqüência de bases que compõem o DNA mitocondrial desta espécie facilitará o desenvolvimento de novos estudos que utilizem esta ferramenta, como em estudos populacionais, filogeográficos e filogenéticos.

1.8 OS MARCADORES MICROSSATÉLITES

Nas últimas décadas, observou-se um crescente interesse pela utilização de ferramentas genéticas em estudos de biologia da conservação, especialmente para espécies submetidas a algum tipo de ameaça, sendo os microssatélites um dos mais utilizados (Salgueiro *et al.*, 2003; Farias *et al.*, 2003; Morgan *et al.*, 2008; Lorenzen *et al.*, 2008). Estes marcadores moleculares são regiões amplamente distribuídas no genoma nuclear que contém repetições em seqüência de um a seis nucleotídeos. Por apresentarem alto poder discriminante e alto grau de informação, são os marcadores mais indicados para estudos populacionais e de identificação forense (Oliveira *et al.* 2006). Além de serem amplamente utilizados para verificar os níveis de variabilidade genética de populações naturais, os microssatélites também vêm sendo cada vez mais aplicados para aquicultura, especialmente para caracterizar estoques, indicar melhores reprodutores em programas de reprodução e na busca de características quantitativas de interesse (Chistiakov *et al.*, 2006).

O grande poder informativo destes marcadores deve-se ao fato de eles serem codominantes, multialélicos e apresentarem uma alta taxa de mutação. Marcadores codominantes, permitem identificar os dois alelos presentes em cada loco de um indivíduo diplóide. Associado a isso, em uma população podemos encontrar regiões com diferentes números de repetições em diferentes indivíduos, isto é, vários alelos. O fato de ser multialélico e altamente variável, devido a sua alta taxa de mutação (10^{-2} a 10^{-6} nucleotídeos / locos / geração), faz com que esse tipo de marcador

tenha alto grau de discriminação, sendo capaz de diferenciar indivíduos (Oliveira *et al.* 2006).

Outra grande vantagem do uso de microssatélites é a praticidade laboratorial, na qual os fragmentos contendo as repetições são obtidos através de PCR. A substituição dos isótopos radioativos por fluorescências na marcação dos iniciadores também contribuiu para a ampla disseminação desta técnica. A associação de fluorescências diferentes com a genotipagem de locos com alelos de tamanhos diferentes permite que sejam desenvolvidos sistemas multiplex, diminuindo o tempo e os custos de obtenção dos resultados.

O maior limitante para a aplicação desta técnica ainda é o desenvolvimento dos iniciadores que flanqueiam as repetições. Apesar do desenvolvimento de novas estratégias para descrição dos *primers*, a técnica tradicional que se baseia no desenvolvimento de biblioteca genômica ainda vem sendo amplamente utilizada. Esta prática, além de exigir grande esforço laboratorial e mão de obra especializada, apresenta um elevado custo e com baixa produtividade (Zane *et al.*, 2002). Apesar de mais rápida e simples do que a criação de bibliotecas, a etapa de identificação dos alelos também requer pessoal treinado e recursos financeiros significativos para custear os reagentes utilizados nesta etapa.

1.9 OBJETIVOS

Apesar de a maioria dos estudos genéticos já desenvolvidos com pirarucus usarem amostras da Reserva Mamirauá, nenhum deles analisou as

implicações das estratégias de manejo em suas populações, assim como aspectos de sua dinâmica populacional. Contudo, a implementação de medidas que visem a manutenção destes estoques devem obrigatoriamente ser baseadas em estudos científicos. Tendo em vista a escassez destas informações, buscamos através deste estudo esclarecer questões importantes que possam vir a auxiliar no direcionamento das estratégias de manejo deste peixe na Reserva Mamirauá. Estas populações da Reserva Mamirauá foram comparadas com pirarucus procedentes de Santarém e Tucuruí (PA). Com base nestas informações, nossos objetivos foram:

1. Caracterizar geneticamente as populações de pirarucus da Reserva Mamirauá.
2. Estimar e comparar a variabilidade genética dos pirarucus da Reserva Mamirauá e compará-las com as de indivíduos de Santarém e Tucuruí.
3. Verificar se a pesca anual manejada esta causando alterações significantes nas freqüências alélicas da população.
4. Comparar os índices de diversidade genética para pirarucus de diferentes lagos do setor Jarauá.
5. Comparar os índices de variabilidade genética entre os pirarucus do setor Jarauá e do Maraã.
6. Verificar se ocorre estruturação genética entre as populações de pirarucus do Jarauá, Maraã, Santarém e Tucuruí.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 ÁREA DE ESTUDO

Para realização deste trabalho foram analisadas amostras de pirarucus coletadas no setor Jarauá (área focal da RDS Mamirauá) e no conjunto de lagos que compõem o Complexo Lago Preto (área subsidiária – município de Maraã) (**Figura 12**). Estas duas localidades destacam-se no manejo do pirarucu, concentrando a maior quantidade de peixes capturados anualmente no interior da Reserva. O setor Jarauá está localizado na porção central da área focal da Reserva, apresentando grande extensão latitudinal e com maior número de lagos. O Complexo Lago Preto consiste de um agrupamento de lagos próximos que se conectam durante o período de cheia e está localizado na área subsidiária da Reserva. Estes dois pontos distam aproximadamente 105 Km em linha reta e 135 Km acompanhando a calha principal do Rio Japurá.

2.2 COLETA DAS AMOSTRAS

Foram coletados tecidos musculares de aproximadamente 1.800 pirarucus capturados por pescadores da Reserva Mamirauá entre os anos de 2002 a 2006. A rotina de pesca deste peixe na reserva inclui a passagem por uma “base de apoio”, onde é realizada a pesagem, medição e contagem dos indivíduos capturados, os quais são acondicionados nas caixas de gelo dos barcos dos compradores. Neste momento, foram retiradas pequenas amostras de tecido muscular dos indivíduos pescados, as quais foram colocadas em tubos com álcool para fixação. Informações a respeito da procedência de cada

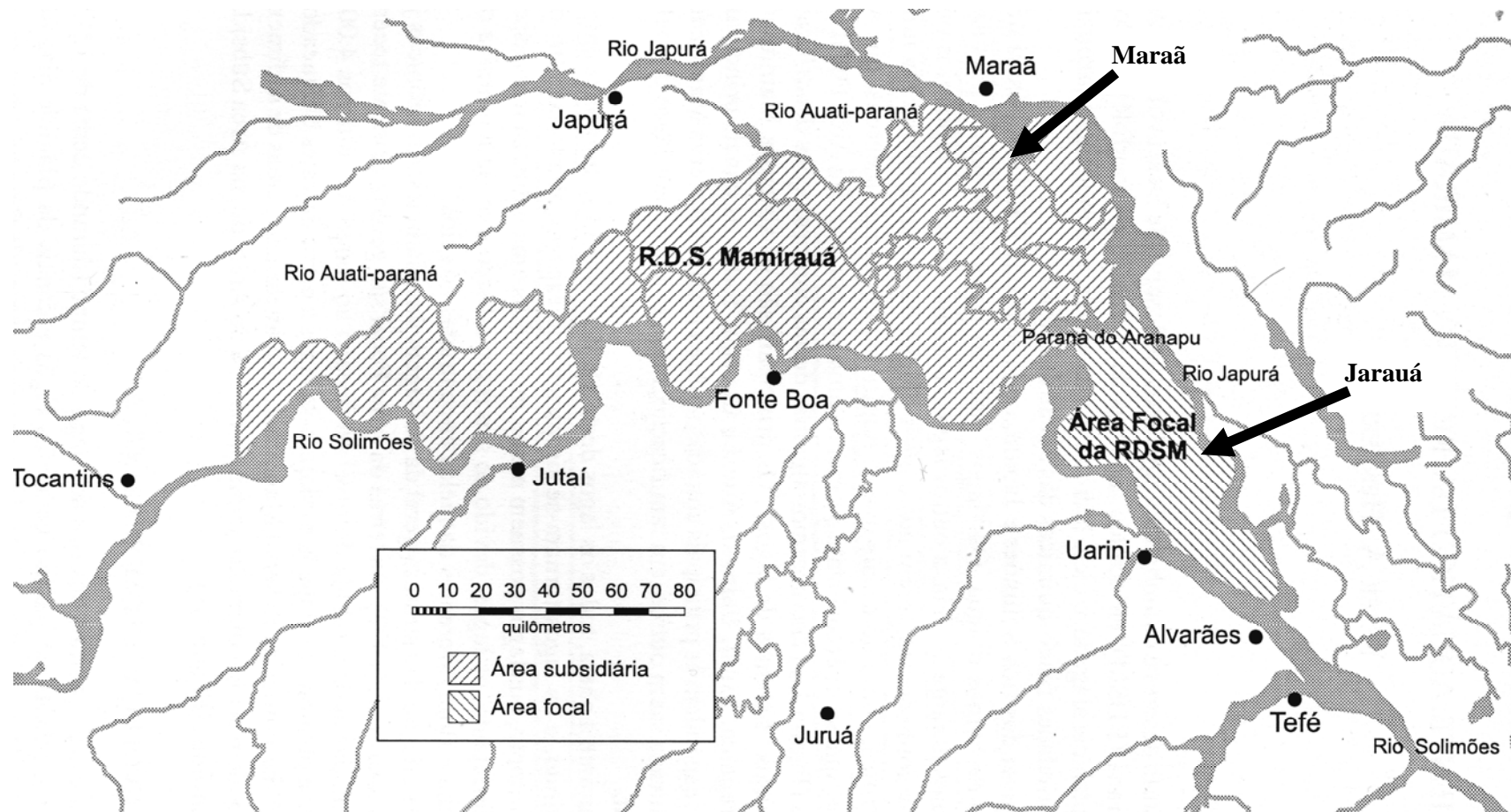


Figura 12: Mapa da Reserva Mamirauá mostrando a localização do Jarauá e do Maraã (Fonte: modificado de IDSM).

indivíduo, número do lacre (quando houve), assim como dados morfológicos dos mesmos também foram registrados em fichas de campo. Uma vez que todas as amostras foram retiradas de indivíduos abatidos, foi descartada qualquer possibilidade de reamostragem. Já no Laboratório de Genética e Biologia Molecular do Campus de Bragança (UFPA), as amostras foram tombadas e receberam uma identificação única correspondente a seu registro na Coleção de Tecidos de Pirarucus.

2.3 ISOLAMENTO DO MATERIAL GENÉTICO

Foi realizado o isolamento do DNA de 463 pirarucus coletados na Reserva Mamirauá através do protocolo sugerido por Sambrook *et al.* (1989) utilizando fenol-clorofórmio e Proteinase K. Para visualização da integridade e quantificação foi realizada uma eletroforese submarina em gel de agarose 1%. A partir da intensidade da banda, as amostras foram diluídas para aproximadamente 5 ng/ μ l e estocadas em freezer até sua utilização na reação de amplificação.

2.4 AMPLIFICAÇÃO DAS REGIÕES MICROSSATÉLITES

Para amplificação da região genômica contendo as repetições microssatélites foi utilizada a técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) em um volume final de 10 μ l. Foram amplificados sete locos (m7, m20, m4, m15, m2, m16, m26) desenvolvidos por Farias *et al.* (2003), os quais são descritos na **Tabela 1**. Os iniciadores *forward* foram previamente marcados com fluorescências (6-FAM, HEX ou NED). Em uma placa de 96 amostras, foi

Tabela 1: Locos microssatélites analisados indicando a repetição, seqüência dos iniciadores, fluorescência, tamanho e número de alelos caracterizados por Farias *et al.* (2003).

<i>Locos</i>	<i>Repetição</i>	<i>Seqüência Iniciador</i>	<i>Fluorescência</i>	<i>Tamanho</i>	<i>Nº Alelos</i>
m7	(CT) ₂₉	F- CCTCTACTTCCTCAACCAGC R- CAGCACGGTGAATATCTGTG	HEX	277-299	6
m20	(CA) ₁₂	F- GGAATGAGCAGGTTTCCCAG R- CTCCCTCTTCTGACATGACG	6-FAM	263-267	3
m4	(CT) ₂₂	F- TTTCCCGGACGAGAGAAGT R- TGTACCAAAGTGATGGAGAG	6-FAM	275-283	3
m15	(CA) ₁₉	F- GGCCTACATCAAGCACTTAA R- TTAAGTGGGTTGAGTTTTGAC	HEX	226-244	5
m2	(CA) ₂₂	F- AGCTCTCAGTACTGATGCTG R- CCGATCATCTGTTTGCTCTG	HEX	295-323	7
m16	(CA) ₁₉	F- CTCCTGGGCATCATGGGTAG R- TCTGTGTCTCCAGGCAACAG	NED	247-273	6
m26	(CA) ₁₄	F- ACAGGGACCAGTAAGTGGCC R- TGCCATAAGCACCGGGTAGG	6-FAM	213-217	3

adicionada a cada poço 1,5 µl de uma solução de dNTP (200 mM de cada nucleotídeo), 1 µl de tampão 10X da *Taq* (100 mM Tris-HCl, 500 mM KCl), 0,5 µl de MgCl₂ (50 mM), 0,5 µl de cada iniciador (2 pmol), 0,25 µl de *Taq*, 1 µl de DNA (5 ng/µl) e 4,75 µl de água destilada estéril. O programa de amplificação para todos os locos consistiu de uma desnaturação inicial de 94 °C por 2 minutos, seguidos de 35 ciclos de 94 °C por 10 segundos, 58 °C por 10 segundos, 72°C por 30 segundos e uma extensão final de 72°C por 60 minutos. Ao final da amplificação os produtos foram visualizados em gel de agarose 1% e diluídos de acordo com a intensidade da banda visualizada após eletroforese.

2.5 GENOTIPAGEM DOS MICROSSATÉLITES

Foi preparada uma solução com 0,25 µl do ET-Rox 550 (Amersham Biosciences), 7,75 µl do tampão de corrida (Tween 20 0,1%) e 2 µl do PCR diluído para cada amostra a ser genotipada. Esta reação foi submetida a um choque térmico, centrifugada e injetada no seqüenciador automático MegaBace 1000 por 80 minutos a 10 KV. O ET-Rox 550 foi utilizado com referência para identificação dos tamanhos dos fragmentos amplificados. Após o término da corrida, os padrões de picos foram analisados pelo programa Fragment Profiler 1.2 (Amersham Biosciences). Neste programa foi configurado um filtro de picos (*peak filter*) para cada loco, indicando o tamanho mínimo e máximo dos alelos, o número de bases da unidade de repetição e a fluorescência utilizada. Foram acrescentados 10 pares de bases a menos e a mais do que o tamanho do menor e maior alelo descrito por Farias *et al.* (2003) para cada loco. Isto permitiu que

novos alelos que não tenham sido identificados na caracterização de Farias *et al.* (2003) pudessem ser detectados pelo programa.

Outra ferramenta utilizada foi a construção de *bins* para cada alelo, os quais aumentam a confiabilidade na identificação destes em corridas eletroforéticas diferentes. Estes *bins* são exibidos como uma barra na qual o pico deve estar inserido para que seja considerado como representante de determinado alelo. Foi criada uma planilha de dados do Microsoft Excel contendo a identificação de todos os pirarucus genotipados e os alelos encontrados para cada loco, sendo esta posteriormente usada na conversão dos dados para os formatos específicos dos programas de análises populacionais.

2.6 ANÁLISES COMPUTACIONAIS

Após a montagem de um banco de dados para os sete locos de todos os indivíduos analisados foi realizada a verificação dos erros de genotipagem mais freqüentes no programa MicroChecker (van Oosterhout *et al.*, 2004) usando a correção de Bonferroni. Os erros verificados foram: dominância de alelos pequenos, alelos nulos e identificação errônea dos alelos pela presença de *stutters* (picos inespecíficos adjacentes ao pico do alelo). A dominância de alelos pequenos pode ocorrer pela amplificação mais fácil de alelos de pequeno tamanho em relação ao outro de maior tamanho durante a reação da PCR, levando a uma baixa freqüência de alelos de maior tamanho. Isso gera um padrão visual dos picos que pode dificultar a identificação de indivíduos heterozigotos. Já alelos nulos ocorrem quando, por uma mutação no sítio de

ligação do iniciador, um alelo não é amplificado, levando a detecção de um falso homozigoto ou a ausência de alelos detectados para o indivíduo. Os *stutters* são produtos de “deslizes” durante a amplificação da região microssatélite, sendo mais comuns nos locos dinucleotídeos, que podem causar dúvidas na identificação dos verdadeiros alelos.

A análise dos dados gerados com as genotipagens foi dividida em dois tópicos: No primeiro foi realizada uma caracterização genética dos pirarucus da Reserva Mamirauá, enquanto no segundo foi feita uma comparação em diferentes níveis dos estoques populacionais da reserva e entre a reserva e outras localidades. Como estas análises enfocam questões diferentes, utilizando inclusive programas específicos, a descrição da metodologia aplicada em cada uma destas análises foi descrita separadamente.

2.6.1 Caracterização das populações da Reserva Mamirauá

Os dados analisados por Watanabe (2007), assim como de Souza (2006) e Carvalho (2008) usaram os mesmos parâmetros para identificação dos alelos (filtro de picos e *bins*) que os do presente trabalho. Isso garante que os alelos identificados em uma população podem ser seguramente comparados ao descritos em outra. Para os dados de genotipagem gerados por Farias *et al.* (2003), Hamoy (2006) e Hrbek *et al.* (2007) não sabemos quais alelos foram encontrados em cada população, sendo disponíveis apenas os índices derivados a partir destas informações. Desta forma, alguns aspectos da caracterização das populações analisadas por Souza (2006), Watanabe (2007) e Carvalho (2008) serão comparados aos do presente estudo.

A diversidade genética de uma população é estimada através de uma série de parâmetros descritivos os quais as caracterizam. Para esta análise, os 98 indivíduos caracterizados por Watanabe (2007) foram incorporados aos nossos, sendo o total de pirarucus organizado em três grupos: Jarauá com 314 indivíduos, Maraã com 149 indivíduos e a Reserva Mamirauá (juntando as amostras dos dois setores) com 463 indivíduos.

Os parâmetros de diversidade genética estimados foram:

Número de alelos (Na): O número absoluto de alelos detectados na população, o qual foi obtido a partir da contagem direta destes em cada população analisada. Este é um parâmetro que indica a variabilidade da população, sendo dependente do número amostral. Utilizamos o programa Fstat (Goutet, 2002) para contabilizar o número destes alelos amostrados para cada loco. Foi calculado ainda o número médio de alelos por loco para cada população caracterizada.

Riqueza alélica (Ra): A riqueza alélica é uma medida de variabilidade corrigida a partir do número absoluto de alelos. Petit *et al.* (1998) destacaram a grande importância deste parâmetro para a genética de conservação após a correção do efeito dos tamanhos amostrais através da técnica de rarefação. Desta forma este índice pode ser usado na comparação entre estudos populacionais que tenham utilizados diferentes números de indivíduos em suas análises. Usamos as medidas de riqueza alélica corrigida obtida no programa Fstat (Goudet, 2002), a qual considera sempre a população com menor número de indivíduos genotipados como referência.

Freqüência alélica: Para cada sistema estudado foram construídas tabelas com as freqüências dos alelos para cada população analisada. A comparação entre as freqüências alélicas de diferentes populações é um importante parâmetro utilizado em estudos genéticos (Santos, 1999), tendo sido as mesmas determinadas no programa GenePop v 1.2 (Raymond & Rousset, 1995).

Alelos Novos: Quando Farias *et al.* (2003) desenvolveram os locos microssatélites para pirarucus, fizeram a caracterização usando 15 indivíduos procedentes de Santarém (PA). Uma vez que analisamos uma grande quantidade de pirarucus de outra localidade, era esperado que novos alelos fora do intervalo de tamanho descrito inicialmente fossem encontrados. A detecção desses alelos novos foi feita através da comparação entre os alelos identificados em nossas análises e a faixa de tamanho descrita por Farias *et al.* (2003).

Locos Polimórficos, Alelos Raros (AR) e Alelos exclusivos (AE): Segundo definição de Hartl & Clark (1997) locos polimórficos são aqueles em que o alelo mais comum tem freqüência menor que 95%, enquanto alelos raros são aqueles que apresentam freqüência menor que 0,5% na população. Já os alelos exclusivos ou privados são aqueles encontrados somente em uma das populações, podendo ser informativos na verificação de estruturação populacional. Estes parâmetros foram obtidos através da observação das freqüências alélicas produzidas pelo programa GenePop v 1.2 (Raymond & Rousset, 1995).

Heterozigosidade Observada (H_o) e Esperada (H_e): Estes níveis de heterozigosidade são calculados através da frequência observada de genótipos heterozigotos e pela estimativa destes de acordo com as frequências alélicas, respectivamente. É uma das medidas mais utilizadas para estimar a variabilidade genética de população, além de determinar se os locos estão em equilíbrio de Hardy-Weinberg. A estimativa da frequência de heterozigotos observada e esperada em uma população e a verificação se as mesmas estavam em equilíbrio foram feitas através do Teste Exato de Fisher no programa Arlequin 3.01 (Excoffier *et al.*, 2005).

Desequilíbrio de Ligação: O teste de desequilíbrio de ligação verifica se os locos analisados estão ligados, isto é, se alelos estão sendo repassados juntos como resultado da proximidade física entre os marcadores. Alguns aspectos populacionais exercem grande influência neste teste, tais como a estruturação populacional (Ohta, 1982). Para verificar se os locos estão ligados, usamos além das 463 amostras da Reserva Mamirauá, 60 de Santarém e 38 de Tucuruí. Este teste foi realizado no programa Arlequin 3.01 (Excoffier *et al.*, 2005) o qual estima a ligação através do teste da razão da *likelihood*.

6.2. Análises populacionais

Para inferências populacionais foram montados bancos de dados específicos para cada questão a ser respondida. Utilizamos além das 463 amostras de pirarucus da Reserva Mamirauá, 60 indivíduos oriundos de duas localidades próximas a Santarém disponibilizados por Carvalho (2008) e 38

indivíduos de Tucuruí (Souza, 2006). Para responder às questões de abordagem populacional, analisamos bancos de dados específicos usando os parâmetros descritos abaixo. A **Tabela 2** sintetiza as perguntas, amostras, parâmetros e programas utilizados para respondê-las.

Amova: A Análise de Variância Molecular foi aplicada para verificar como é distribuída a variabilidade dentro da estrutura previamente simulada. Este parâmetro indica a percentagem da variabilidade nos diferentes níveis de estruturação, tendo sido analisada no Arlequin 3.01 (Excoffier *et al.*, 2005).

Fst: Este índice de fixação proposto por Wright (1921) indica o grau de diferenciação entre as populações analisadas. Valores próximos a 1 significam grande diferença e valores próximos a 0, grande similaridade entre as populações. Entretanto, segundo Hatl & Clarck (1997), populações naturais não costumam atingir valores próximos a 1, mesmo quando apresentam considerável estruturação. Consideramos a classificação sugerida por Wright (1978) para os valores de Fst o qual propõe a seguinte divisão: diferenciação pequena (Fst menores que 0,05), moderada (0,05 a 0,15), grande (0,15 a 0,25) e muito grande (maior que 0,25). Outros índices, tais como o Rst e o Dst também são freqüentemente utilizados. Balloux & Lugon-Moulin (2002) destacam, entretanto, que Fst baixo (menores que 0,05) podem significar diferenciação genética importante, citando o exemplo empírico onde o Rst estimado foi de 0,98 enquanto o Fst foi somente 0,19 (Balloux *et al.* 2000). O Fst foi calculado no Arlequin 3.01 com nível de significância de 95% ($p=0,05$).

Estrutura populacional: No programa Structure 2.2 (Pritchard *et al.*, 2000; Falush *et al.*, 2003) foi calculada a probabilidade *a posteriori* do número

Tabela 2: Parâmetros e programas utilizados para responder às perguntas e o número de indivíduos e procedência usados em cada banco de dados.

Pergunta	Número de Indivíduos - Procedência	Parâmetros	Programa
1. Ocorre mudança na diversidade genética dos pirarucus a cada ano?	65 ind. – Jarauá 2002 56 ind. – Jarauá 2003 93 ind. – Jarauá 2004 54 ind. – Jarauá 2005 46 ind. – Jarauá 2006	Número de alelos Riqueza alélica Frequência alélica Alelos exclusivos Fst AMOVA	Genepop Fstat Genepop Genepop Arlequin Arlequin
2. Os pirarucus do setor Jarauá são geneticamente semelhantes?	223 ind. – procedentes de 15 lagos do Jarauá (cada lagos com pelo menos 8 indivíduos genotipados)	Frequência alélica Fst Teste de Mantel Número de migrantes	Genepop Arlequin Arlequin Arlequin GeneClass
3. Existe diferença genética entre os pirarucus do Jarauá e do Maraã?	314 ind. – Jarauá (42 lagos) 149 ind. – Maraã (Complexo Lago Preto)	Riqueza alélica Frequência alélica Alelos raros Alelos exclusivos AMOVA Fst Teste de Mantel Número de migrantes	Fstat Genepop Genepop Genepop Arlequin Arlequin Arlequin GeneClass
4. Existe diferença genética entre os pirarucus de Mamirauá e os de Santarém e Tucuruí?	463 ind. - Reserva Mamirauá 60 ind. - Santarém 38 ind. - Tucuruí	Número de alelos Riqueza alélica Frequência alélica Alelos raros Alelos exclusivos AMOVA Fst Análise Bayesiana Teste de Mantel Número de migrantes	Genepop Fstat Genepop Genepop Genepop Arlequin Arlequin Structure Arlequin GeneClass

de populações presentes no total de pirarucus amostrados (N=561) através de estatística bayesiana. A vantagem desta análise é que a mesma dispensa uma prévia estruturação a ser testada. A corrida foi feita com um *burn-in* de 50.000 seguida de 1.000.000 réplicas de Cadeia Markoviana de Monte Carlo (MCMC). O número de populações (K) simuladas foi de 1 a 7 e a média da probabilidade foi calculada através de 10 corridas independentes. Usamos o modelo de ancestralidade com mistura entre as populações (*Admixture*) e frequência alélica correlacionada (AFC). Segundo Prichard *et. al.* (2007), este programa mostrou-se hábil a detectar um pequeno número de populações (K) com grande diferenciação, mas os autores chamam atenção para a interpretação dos valores de logaritmo natural gerados, os quais tendem a aumentar com o K (número de populações testadas). Esta possibilidade de super-estimativa foi minimizada através da correção sugerida por Evanno *et. al.* (2005) denominada ΔK . Estes autores destacam entretanto que essa correção não é adequada para bancos de dados de uma única população (K=1). Utilizamos para determinar o número de populações entre as amostras por nós analisadas os valores corrigidos de ΔK .

Distância geográfica: Para calcular a distância geográfica entre as localidades amostradas na várzea usamos a distância em linha reta estimada pelo programa *Alelles in Space 1.0* (Miller, 2005) através das coordenadas geográficas destes pontos. Neste tipo de ambiente anualmente alagado, o aumento do nível da água permite a conexão entre os lagos através das áreas inundadas e, portanto, a menor distância entre estes é uma reta. Já para estimar as distâncias entre as localidades da Reserva Mamirauá, Santarém e

Tucuruí utilizamos o programa Global Mapper v.8.01, sendo a distância medida seguindo a calha principal dos rios Amazonas e Tocantins.

Teste de Mantel: Para verificar se a diferenciação encontrada para cada par de populações pode ser explicada pela distância geográfica, usamos o teste de Mantel. Este correlacionou uma matriz de divergência genética (F_{st} par-a-par) e uma matriz de distância geográfica, verificando sua significância. Para localidades inseridas predominantemente no ambiente de várzea (dentro do Jarauá e entre Jarauá e Maraã) utilizamos o teste disponível no programa Alleles in Space 1.0 (Miller, 2005), considerando a distância em linha reta entre os pontos. Para testar essa correlação utilizando amostras ao longo da distribuição da espécie (entre a Reserva, Santarém e Tucuruí) utilizamos o programa Arlequin 3.01 (Excoffier *et al.*, 2005).

Número de migrantes: A estimativa do número de indivíduos migrantes entre as populações de pirarucus foi obtida no programa GeneClass 2.01 (Piry *et al.*, 2004) usando os parâmetros sugeridos pelos autores. Esta medida indica quantos indivíduos dentre o total analisado é um provável emigrante baseando-se na frequência dos alelos nas populações. O valor corresponde ao total de indivíduos, dentre os analisados, que provavelmente pertencem a um estoque mas foram coletados em outro.

As questões referentes a aspectos populacionais do pirarucu são descritas abaixo, destacando o banco de dados montado e os parâmetros utilizados para respondê-las.

1) Ocorre mudança da diversidade genética dos pirarucus a cada ano?

A constante exploração exercida sobre um estoque pesqueiro pode levar à alterações em sua diversidade genética. Apesar de haver indícios de que a cota utilizada esta sendo capaz de manter a viabilidade do manejo, até o momento não foram desenvolvidos estudos específicos a respeito do nível de impacto causado pela pesca manejada de pirarucus na Reserva Mamirauá. Para verificar se ocorreram mudanças significativas nos parâmetros descritivos que caracterizam os pirarucus nos diferentes anos amostrados, utilizamos 314 indivíduos coletados no setor Jarauá, sendo 65 capturados no ano de 2002, 56 em 2003, 93 em 2004, 54 em 2005 e 46 em 2006. A diferenciação foi testada tratando cada ano como um estoque. Para comparar os diferentes anos usamos o número absoluto, a riqueza e frequência alélica, a presença de alelos exclusivos, AMOVA e índices de diferenciação genética (F_{st}).

2) Os pirarucus do setor Jarauá são geneticamente semelhantes?

Uma vez que o pirarucu não apresenta grandes padrões de migração e o setor Jarauá tem grande extensão norte-sul (cerca de 40 Km), buscamos verificar se ocorre uma diferenciação genética entre os lagos associada a distância geográfica. Nesta análise comparamos amostras de 15 lagos do setor Jarauá com no mínimo oito indivíduos genotipados, totalizando 223 amostras (**Figura 13**). Os testes usados para comparar os lagos foram F_{st} e Mantel, que verificaram se existe diferenciação entre eles e se esta diferenciação pode ser atribuída a distância geográfica. As distâncias entre os lagos foram calculadas em linha reta, uma vez que durante a cheia ocorre uma grande

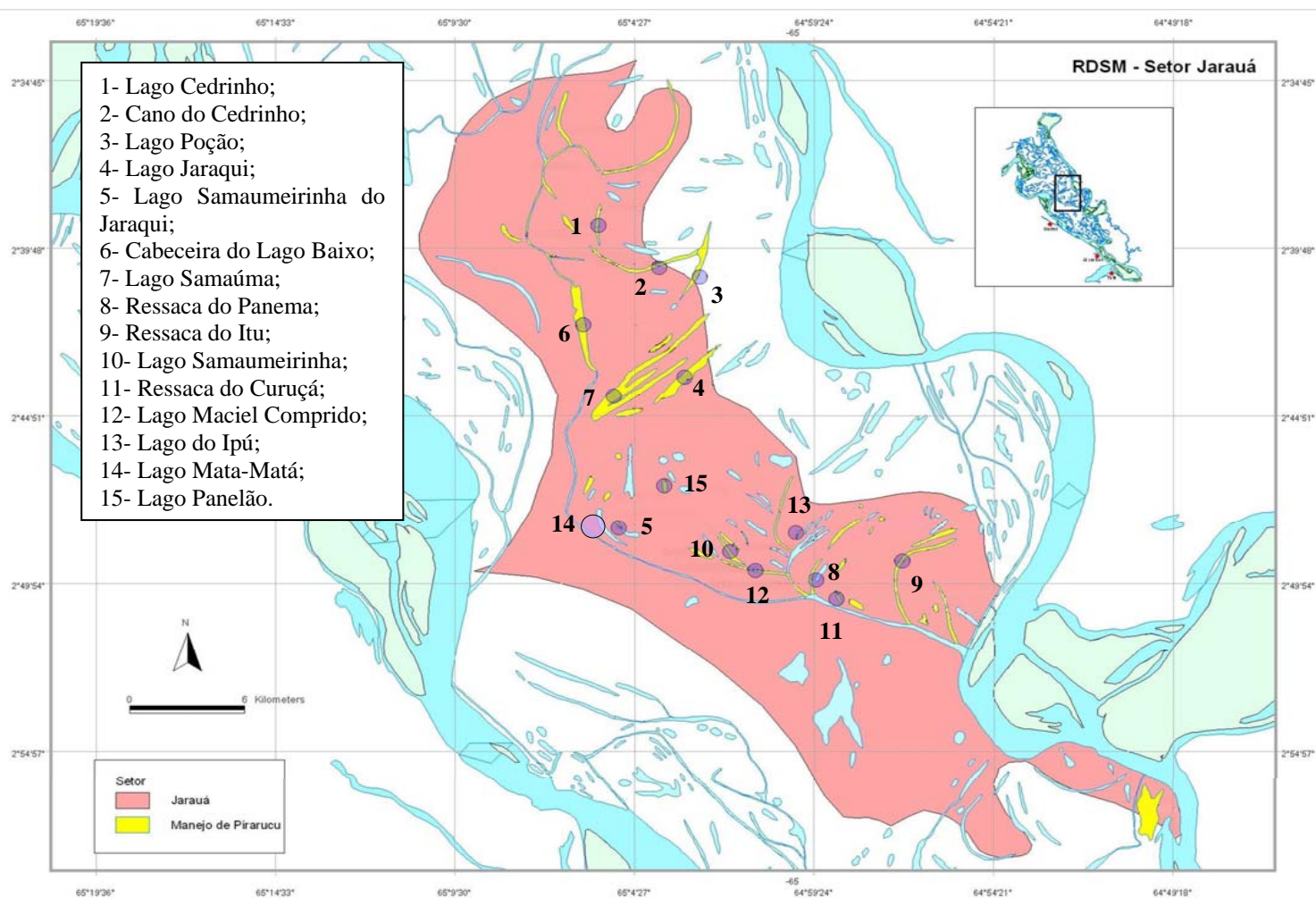


Figura 13: Corpos d'água com mais de oito amostras genotipadas no setor Jarauá.

conectividade entre os mesmos. Foi verificado ainda se os alelos mais frequentes em cada lago são compartilhados, indicando assim um fluxo genético entre os mesmos, além da estimativa do número de migrante entre estes.

3) Existe diferença genética entre os pirarucus do Jarauá e do Maraã?

Uma vez que foi testado o efeito da distância na diferenciação dos pirarucus de diferentes lagos do Jarauá, é importante verificar se este estoque é geneticamente semelhante àquele do Complexo Lago Preto (Maraã). Esta informação pode direcionar de forma eficaz as estratégias de manejo aplicadas na Reserva Mamirauá, definindo se é válido considerar as duas populações da mesma forma ou manejá-las de forma individualizada. Para fazer essa comparação utilizamos características descritivas para 314 pirarucus coletados em 42 lagos distribuídos pelo setor Jarauá e 149 indivíduos oriundos do Complexo Lago Preto. Os parâmetros comparados entre as populações foram riqueza e frequência alélica, distribuição de alelos raros e alelos exclusivos. A diferenciação entre as mesmas foi testada através de AMOVA e F_{st} tendo sido ainda estimado o número de migrantes entre as duas localidades.

Testamos a correlação de Mantel usando um ponto representando o conjunto de lagos que compõem o Complexo Lago Preto no Maraã em relação aos 15 lagos com mais de oito amostras genotipadas do setor Jarauá. A grande proximidade e conectividade entre os lagos do Complexo Lago Preto permitiu a utilização de um único ponto, representado pelas coordenadas do Lago Preto (**Figura 14**). Já no setor Jarauá, os lagos são, em média, mais

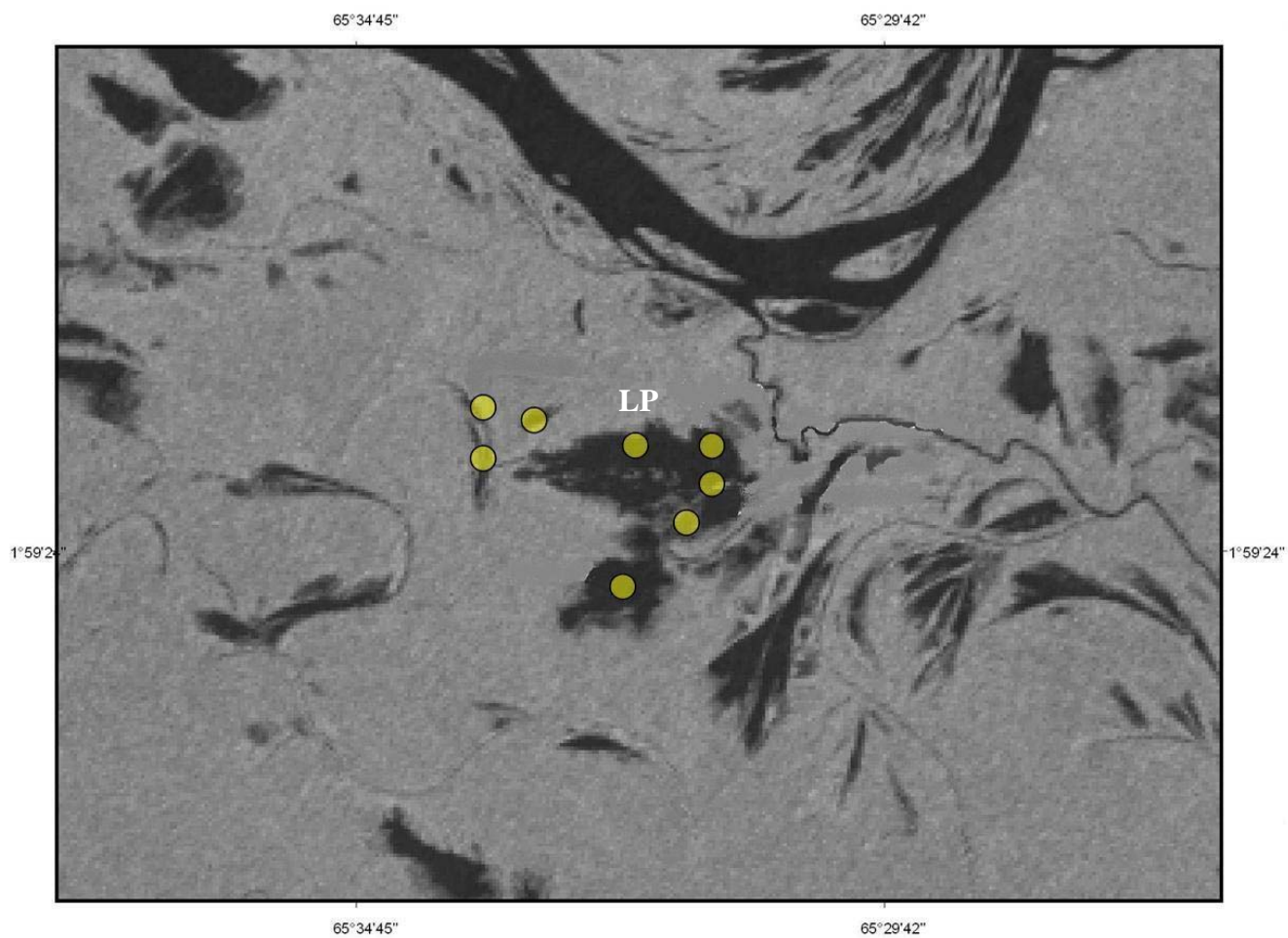


Figura 14: Imagem do Complexo Lago Preto (Maraã) durante a cheia mostrando os oito lagos analisados. LP significa Lago Preto.

distantes, e durante o período seco a conexão entre os mesmos fica restrita a poucos corpos d'água, tendo sido por isso analisados os 15 lagos como unidades independentes. As distâncias geográficas entre os lagos do Jarauá e o Maraã foram calculadas em linha reta.

4) Existe diferença genética entre os pirarucus de Mamirauá e os de Santarém e Tucuruí?

A Reserva Mamirauá esta inserida em uma área de várzea na porção central da bacia amazônica e apresenta características particulares com relação a outras áreas ao longo da distribuição do pirarucu. Aspectos tais como a pressão de pesca exercida sobre o recurso, o tipo de ambiente no qual o lago esta inserido e a distância são exemplos de fatores que podem levar a uma diferenciação entre os estoques. Para verificar se esta estruturação ocorre analisamos os parâmetros descritivos (número de alelos, frequência alélica, alelos raros e alelos exclusivos) para 463 pirarucus da Reserva Mamirauá (314 do Jarauá e 149 do Maraã) e comparamos com os descritos para 60 indivíduos de Santarém e 38 de Tucuruí. A diferenciação entre estas populações foi ainda avaliada através de AMOVA, Fst e Análise Bayesiana. O teste de Mantel também foi usado para verificar se esta possível diferenciação pode ser atribuída à distância geográfica entre as mesmas, a qual foi estimada acompanhando a calha principal dos rios que ligam os mesmos. Foi ainda estimado o número de migrantes entre as mesmas.

3. RESULTADOS

3.1 GENOTIPAGEM

Durante a identificação dos alelos foram detectados picos inespecíficos (*stutters*) na maioria dos locos, sendo que estes não comprometeram a confiabilidade da genotipagem, uma vez que o padrão se repetia sempre com *stutters* menores que os alelos (*stutters* à esquerda). A **Figura 15** mostra os padrões de picos encontrados para indivíduos homozigotos (A), heterozigotos para alelos com mais de 2pb de diferença (B) e heterozigotos para alelos com 2pb de diferença (C). A identificação deste último é facilitada pela comparação da altura dos picos, sendo que o pico referente ao alelo de menor tamanho tem sempre uma maior intensidade devido à fusão deste com o *stutter* do segundo alelo. A presença destes produtos inespecíficos é bastante comum em microsatélites, principalmente em dinucleotídeos, sendo um artefato da reação de amplificação do loco.

O MicroChecker sugeriu uma identificação errônea de *stutters* como alelos para o loco m16 na população de Jarauá, e m20 e m2 para a de Tucuruí. Esta indicação ocorreu devido a uma alta frequência de indivíduos heterozigotos para alelos que diferiam em 2pb. Entretanto, os locos m20 e m16 apresentaram padrões constantes de *stutters* em relação aos alelos em todas as corridas, o que facilitaram a identificação dos alelos em cada indivíduo. Além disto, amostras de pirarucus de outras populações também confirmaram a identificação destes alelos, sem que este tipo de erro tenha sido sugerido. Já o loco m2 só apresenta três alelos na população de Tucuruí, sendo que os dois mais frequentes diferem em 2pb e por isso apresentaram alta

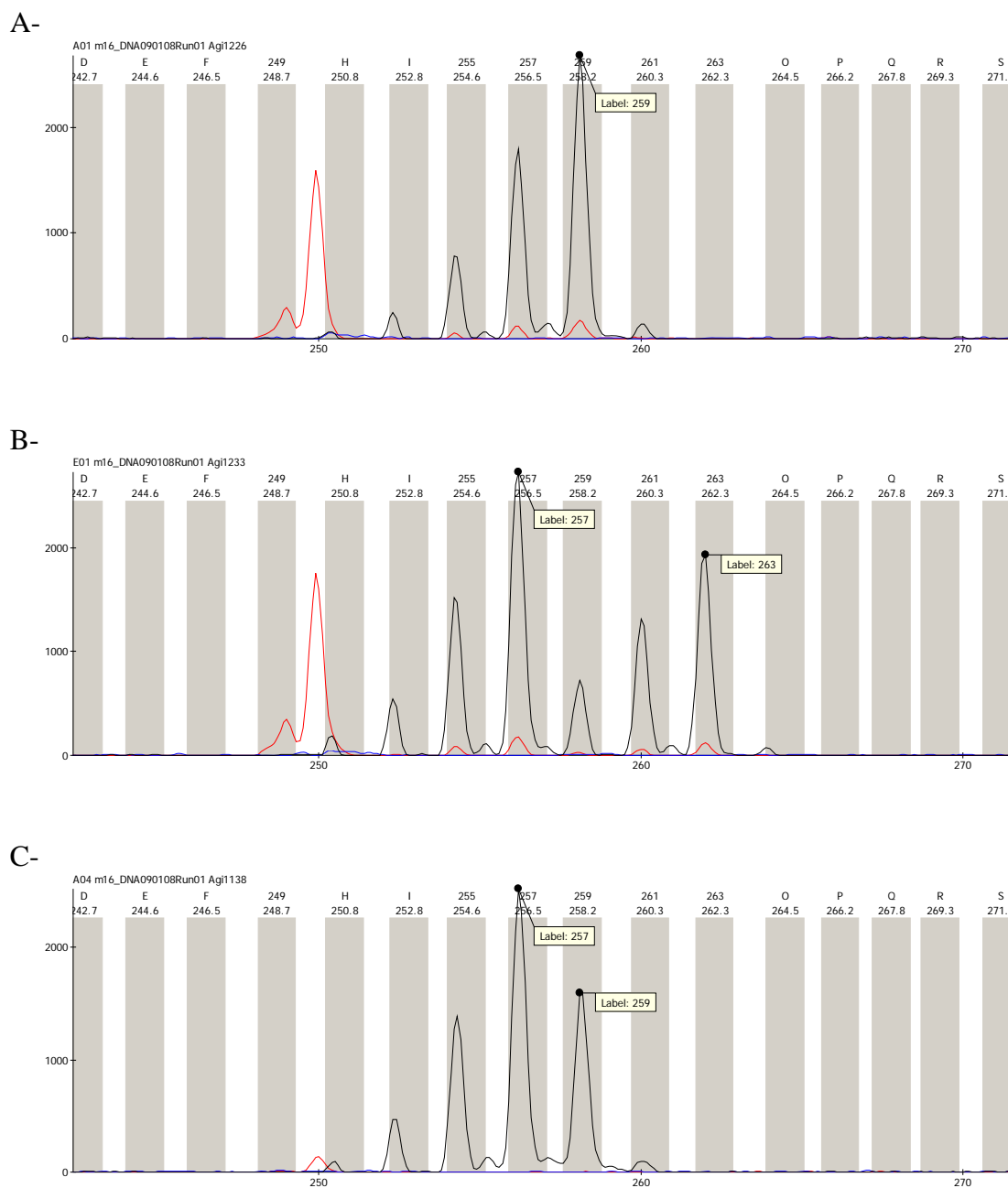


Figura 15: Padrões de genotipagem produzidos pelo programa *Fragment Profiler* mostrando os picos dos alelos (marcados) e picos inespecíficos (*stutters*). A-homozigoto, B-heterozigoto para alelos com mais de 2pb de diferença, C-heterozigoto para alelos com 2pb de diferença.

heterozigossidade. Para nenhum dos sete locos analisados foi sugerido o fenômeno de dominância de alelos pequenos. Desta forma, optamos por usar os sete marcadores para todas as populações estudadas.

3.2 CARACTERIZAÇÃO DAS POPULAÇÕES DA RDSM

Após a genotipagem, foram identificados nas duas populações de pirarucus da Reserva Mamirauá um total de 50 alelos para os sete locos analisados, com uma variação de 3 a 12 alelos por loco (**Tabela 3**). Quando complementamos com os dados analisados por Carvalho (2008) e Souza (2006) para as populações de Santarém e Tucuruí, encontramos um total de 54 alelos, sendo que a reserva abriga 93% desta diversidade, com 83% no setor Jarauá e 72% no Maraã. O número médio de alelos por loco variou de 3,14 (Tucuruí) a 7,14 (Reserva Mamirauá).

A estimativa de riqueza alélica, também indicou maior variabilidade para a população da Reserva Mamirauá (**Tabela 4**), a qual apresentou em média 5,325 alelos por loco, enquanto Santarém e Tucuruí apresentaram 4,628 e 3,120 alelos por loco, respectivamente. Dentro da reserva, encontramos uma riqueza alélica superior nos pirarucus do Jarauá. Os demais marcadores apresentaram pequenas diferenças entre as duas populações comparadas.

A frequência dos alelos nas populações é mostrada em uma tabela comparando as diferentes populações onde foi destacada a percentagem do alelo mais frequente em cada um delas (**Tabela 5**). Todos os sete locos utilizados foram polimórficos para todas as populações analisadas, com

Tabela 3: Número de alelos encontrados para cada loco nas populações de pirarucus caracterizadas. Total de alelos se refere ao número total de alelos identificados em Mimirauá, Santarém e Tucuruí. A percentagem total de alelos para cada população foi calculada a partir do total de alelos descritos (54 alelos).

<i>Locos</i>	<i>Total de alelos</i>	<i>Número de alelos</i>				
		<i>Jarauá (n=314)</i>	<i>Maraã (n=149)</i>	<i>RDSM (n=463)</i>	<i>Santarém¹ (n=60)</i>	<i>Tucuruí² (n=38)</i>
m7	12	10	8	11	6	5
m20	4	4	3	4	4	3
m4	4	3	3	3	4	2
m15	11	8	8	9	4	5
m2	12	12	7	12	9	3
m16	6	5	5	6	5	2
m26	5	3	5	5	2	2
TOTAL	54	45	39	50	34	22
Média		6,43	5,57	7,14	4,86	3,14
% alelos		83%	72%	93%	63%	41%

¹ Carvalho (2008); ² Souza (2006)

Tabela 4: Riqueza alélica (Ra) estimada para as populações de pirarucus do Jarauá, Maraã, RDSM (Jarauá + Maraã), Santarém¹ e Tucuruí².

<i>Locos</i>	<i>Riqueza alélica</i>				
	Jarauá	Maraã	RDSM	Santarém¹	Tucuruí²
m7	7,258	7,240	8,025	5,770	4,996
m20	3,261	2,418	3,108	3,623	3,000
m4	2,997	2,952	2,992	3,785	2,000
m15	6,404	5,960	6,717	3,636	4,842
m2	8,535	5,173	7,875	8,604	3,000
m16	4,764	4,918	5,421	4,978	2,000
m26	2,996	3,135	3,134	2,000	2,000
Média	5,174	4,542	5,325	4,628	3,120

¹ Carvalho (2008); ² Souza (2005).

Tabela 5: Frequências alélicas, alelos exclusivos e alelos novos para as populações de pirarucus do setor Jarauá, Maraã, Santarém e Tucuruí. A percentagem dos alelos mais frequentes para cada loco em cada população foi sombreada. Os alelos indicados com negrito e asterisco (*) são alelos novos.

Locos	Alelos	Frequências				Alelos Exclusivos
		Jarauá	Maraã	Santarém	Tucuruí	
m7	273	0.0069	0.0000	0.0000	0.0000	JARAUÁ
	281	0.2810	0.3275	0.2453	0.1351	
	283	0.0466	0.0070	0.0000	0.0000	
	287	0.0000	0.0000	0.0000	0.2838	TUCURUÍ
	289	0.0328	0.0000	0.0755	0.0270	
	295	0.0017	0.0317	0.0000	0.0000	
	297	0.3034	0.2570	0.5943	0.5270	JARAUÁ
	299	0.0897	0.1444	0.0472	0.0270	
	301*	0.2190	0.1549	0.0189	0.0000	
	303*	0.0172	0.0493	0.0000	0.0000	
	305*	0.0017	0.0000	0.0000	0.0000	
	307*	0.0000	0.0282	0.0189	0.0000	
	m20	265	0.5339	0.3378	0.4554	
267		0.0419	0.0068	0.0536	0.2237	
269*		0.4194	0.6554	0.4821	0.3289	
271*		0.0048	0.0000	0.0089	0.0000	
m4		279	0.1026	0.2399	0.4741	0.4167
	281	0.0000	0.0000	0.0172	0.0000	
	285*	0.8205	0.7230	0.4828	0.5833	
	287*	0.0769	0.0372	0.0259	0.0000	
	m15	228	0.0000	0.0034	0.0000	0.0000
230		0.0430	0.0172	0.0000	0.0000	
232		0.3328	0.1690	0.4455	0.3947	
234		0.0080	0.0655	0.0818	0.3158	TUCURUÍ
236		0.0000	0.0000	0.0000	0.0132	
240		0.0287	0.0000	0.0091	0.0000	
242		0.0860	0.0483	0.0000	0.0000	TUCURUÍ
246*		0.0000	0.0000	0.0000	0.0132	
248*		0.4745	0.6793	0.4636	0.2632	
250*		0.0223	0.0069	0.0000	0.0000	
252*		0.0048	0.0103	0.0000	0.0000	
m2	299	0.1860	0.3697	0.0678	0.0000	JARAUÁ
	301	0.0116	0.0141	0.0508	0.0000	
	305	0.0199	0.0000	0.0000	0.0000	
	313	0.2542	0.3697	0.4407	0.6892	
	315	0.0033	0.0000	0.0169	0.1351	
	317	0.0947	0.1162	0.1186	0.0000	
	321	0.0050	0.0035	0.0000	0.0000	
	323	0.3488	0.1232	0.0169	0.1757	
	325*	0.0150	0.0000	0.1102	0.0000	
	327*	0.0233	0.0035	0.1525	0.0000	
	329*	0.0349	0.0000	0.0254	0.0000	
	333*	0.0033	0.0000	0.0000	0.0000	
	m16	249	0.0000	0.0503	0.1750	
255		0.4061	0.5537	0.0417	0.0286	
257		0.0685	0.1711	0.6250	0.9714	
259		0.4618	0.1913	0.1167	0.0000	
261		0.0223	0.0336	0.0417	0.0000	
263		0.0414	0.0000	0.0000	0.0000	
m26		205*	0.0000	0.0034	0.0000	0.0000
	207*	0.0000	0.0034	0.0000	0.0000	
	215	0.2834	0.2838	0.5517	0.3571	MARAÃ
	217	0.0732	0.0135	0.0000	0.0000	
	219*	0.6433	0.6959	0.4483	0.6429	

exceção do loco m16 para os pirarucus de Tucuruí, onde o alelo 257 foi encontrado com frequência de 97,1%. A identificação de quatro alelos raros nas populações de Jarauá e cinco na de Maraã também foi confirmada, como ilustrado na **Tabela 6**. Foram identificados alelos exclusivos em todas as populações analisadas, totalizando 12 alelos que estão presentes em apenas uma das populações. Alguns deste foram muito frequentes, como o alelo 287 do loco m7, que correspondeu a 28,4% dos alelos identificados para os pirarucus de Tucuruí. Assim como a distribuição e frequência dos alelos em uma população, a presença de alelos exclusivos é uma importante característica usada na determinação de estruturação populacional, podendo indicar o grau de conectividade entre os estoques. Foram detectados 19 alelos novos, ou seja, fora do intervalo de tamanhos descritos por Farias *et al.* (2003), sendo estes destacados na **Tabela 5**.

A heterozigosidade observada e esperada para as populações do Jarauá, Maraã e da Reserva (Jarauá e Maraã juntas) é mostrada na **Tabela 7**. A frequência de heterozigotos observada para os pirarucus da reserva foi de 0,572, tendo variado de 0,365 a 0,773 entre os locos. Quando os dois estoques da reserva foram analisados individualmente, foi identificada uma heterozigosidade ligeiramente maior na população do Maraã, a qual variou de 0,486 a 0,817.

Alguns locos apresentaram desvio do equilíbrio de Hardy-Weinberg. No Jarauá, três locos tiveram deficiência de heterozigotos (m7, m2 e m16), tendo o mesmo sido observado no grupo de todos os pirarucus genotipados da reserva. A população do Maraã teve um excesso de heterozigotos para os locos m7 e

Tabela 6: Freqüências de alelos raros (AR) e alelos exclusivos (AE) identificados nas populações de pirarucus de Jarauá, Maraã, Santarém e Tucuruí

<i>População</i>	<i>Locos</i>	<i>Alelos</i>	<i>Categoria</i>	<i>Freqüência</i>
Jarauá	m7	273	AE	0,7%
		295	AR	0,2%
		305	AE-AR	0,2%
	m2	305	AE	2,0%
		315	AR	0,3%
		333	AE-AR	0,3%
m16	263	AE	4,1%	
Maraã	m15	228	AE-AR	0,3%
	m2	321	AR	0,4%
		327	AR	0,4%
	m26	205	AE-AR	0,3%
		207	AE-AR	0,3%
Santarém	m4	281	AE	1,7%
Tucuruí	m7	287	AE	28,4%
	m15	236	AE	1,3%
		246	AE	1,3%

Tabela 7: Índices de heterozigosidade observada (Ho) e esperada (He) para as populações de pirarucus do Jarauá, Maraã e RDSM (Jarauá + Maraã).

LOCOS	HETEROZIGOSIDADE					
	Jarauá		Maraã		RDSM	
	Ho	He	Ho	He	Ho	He
m7	0.752*	0.771	0.817**	0.780	0.773**	0.777
m20	0.472	0.538	0.527	0.458	0.489	0.533
m4	0.308	0.313	0.486	0.425	0.365	0.354
m15	0.653	0.654	0.524	0.505	0.612	0.623
m2	0.718*	0.769	0.739	0.700	0.725*	0.768
m16	0.548*	0.616	0.550**	0.631	0.549**	0.643
m26	0.500	0.503	0.480**	0.441	0.494**	0.483
MÉDIA	0.564	0,595	0.589	0,563	0.572	0,597

*valores significantes ($p < 0,05$); ** valores altamente significantes ($p < 0,01$)

m26, sendo este último também observado em excesso quando analisamos todas as amostras da reserva. Somente o loco m16 apresentou um padrão constante para os três agrupamentos, sendo encontrado menor frequência de heterozigotos que o esperado. Estas diferenças entre os padrões de excesso ou deficiência na heterozigosidade para diferentes locos de uma mesma localidade pode ser um reflexo das diferentes taxas de evolução destes.

O teste de desequilíbrio de ligação usando todas as amostras mostrou que todos os locos apresentavam algum tipo de ligação, exceto o m20 com os m4 e m26. Nei & Li (1973) verificaram que processos demográficos tais como estruturação e migração têm grande influência sobre os resultados deste teste podendo criar um desequilíbrio de ligação. O banco de dados utilizado para esta análise foi composto por 561 pirarucus genotipados, sem qualquer separação por procedência das amostras. Além da estruturação populacional que provavelmente existe dentro do universo amostrado, a possível migração entre os estoques também pode ajudar a explicar este resultado.

3.3 ANÁLISES POPULACIONAIS

3.3.1- Ocorre mudança da diversidade genética dos pirarucus a cada ano?

A pressão de pesca exercida de forma contínua sobre um estoque pesqueiro pode levar a uma diminuição na sua variabilidade genética. Entretanto, o manejo tende a minimizar esse efeito, uma vez que a pesca segue um modelo particular de exploração. No caso dos pirarucus do setor Jarauá, monitorados durante cinco anos, os parâmetros avaliados demonstraram não haver grandes diferenças entre os períodos monitorados. O

número absoluto de alelos e a riqueza alélica estimada detectaram uma pequena variação entre os cinco anos como mostrado na **Tabela 8**. Os resultados de AMOVA indicaram que toda a variação é encontrada dentro do total de indivíduos analisados (99,99%) e o índice de fixação par-a-par (F_{st}) não foi significativo para nenhuma combinação entre os anos. Foram ainda identificados quatro alelos exclusivos, os quais tiveram baixas frequências nos anos analisados.

A comparação entre anos mostrou que os alelos mais frequentes eram compartilhados para a maioria dos locos (**Tabela 9**). Somente os locos m7, m15 e m16 mostraram diferença em pelo menos um dos anos, porém, a diferença entre o alelo mais frequente e o segundo mais frequente foi muito pequena para estes dois últimos locos. Para o m15 foi observada uma maior frequência para o alelo 248 em todos os anos, exceto 2002, onde o mais frequente foi o 232. Entretanto esta diferença foi de somente um registro deste alelo, uma vez que o alelo 232 foi amostrado 48 vezes e o alelo 248, apareceu 47 vezes entre os pirarucus coletados neste ano. Da mesma forma aconteceu com o loco m16 para as amostras de 2004. A diferença do número de observações entre os dois alelos mais frequentes foi de somente duas em um total de 186 alelos analisados (93 indivíduos). Para o loco m7, a flutuação entre os anos aconteceu alternando sempre entre os três alelos mais frequentes nos cinco anos estudados.

Para verificar o efeito de cinco anos de pesca manejada de pirarucu, comparamos os parâmetros gerados para os indivíduos capturados em 2002 e 2006. Foi confirmada a presença 6 alelos exclusivamente em 2002 (frequência

Tabela 8: Número de alelos (Na) e riqueza alélica (Ra) para a população de pirarucus do setor Jarauá nos anos de 2002 a 2006.

<i>Locos</i>	<i>2002</i>		<i>2003</i>		<i>2004</i>		<i>2005</i>		<i>2006</i>	
	Na	Ra	Na	Ra	Na	Ra	Na	Ra	Na	Ra
m7	7	6,737	9	8,194	9	7,673	7	6,817	7	6,920
m20	3	2,995	3	2,996	4	3,353	4	3,711	4	3,817
m4	3	3,000	3	3,000	3	2,995	3	3,000	3	3,000
m15	8	7,872	6	5,587	5	4,950	7	6,026	6	5,797
m20	8	7,446	10	9,267	10	8,317	10	9,227	7	7,000
m16	5	4,962	5	4,874	5	4,627	4	3,991	5	4,992
m26	3	3,000	3	2,963	3	2,995	3	3,000	3	3,000

Tabela 9: Freqüências alélicas e alelos exclusivos para as populações de pirarucus do setor Jarauá coletadas entre os anos de 2002 e 2006. Em destaque (sombreado), os alelos mais freqüentes para cada loco em cada ano.

<i>Locos</i>	<i>Alelos</i>	<i>Freqüências alélicas</i>					<i>Alelos exclusivos</i>
		2002	2003	2004	2005	2006	
m7	273	0,0000	0,0089	0,0109	0,0000	0,0125	
	281	0,2328	0,2679	0,3261	0,2841	0,2625	
	283	0,0172	0,0536	0,0489	0,0568	0,0625	
	289	0,0172	0,0357	0,0489	0,0227	0,0250	
	295	0,0000	0,0000	0,0054	0,0000	0,0000	2004
	297	0,3103	0,2589	0,2772	0,4432	0,2625	
	299	0,1293	0,0536	0,0870	0,0795	0,1000	
	301	0,2500	0,2946	0,1848	0,1023	0,2750	
	303	0,0431	0,0179	0,0109	0,0114	0,0000	
	305	0,0000	0,0089	0,0000	0,0000	0,0000	2003
m20	265	0,5703	0,5179	0,5376	0,4904	0,5444	
	267	0,0469	0,0446	0,0323	0,0577	0,0333	
	269	0,3828	0,4375	0,4247	0,4423	0,4111	
	271	0,0000	0,0000	0,0054	0,0096	0,0111	
m4	279	0,0938	0,0893	0,0968	0,1019	0,1444	
	285	0,8281	0,8393	0,8495	0,7593	0,8000	
	287	0,0781	0,0714	0,0538	0,1389	0,0556	
m15	230	0,0538	0,0089	0,0538	0,0278	0,0652	
	232	0,3692	0,3304	0,3011	0,4074	0,2609	
	234	0,0308	0,0000	0,0000	0,0093	0,0000	
	240	0,0385	0,0268	0,0323	0,0093	0,0326	
	242	0,0538	0,1161	0,1129	0,0833	0,0435	
	248	0,3615	0,4911	0,5000	0,4537	0,5870	
	250	0,0692	0,0268	0,0000	0,0093	0,0109	
	252	0,0231	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	2002
m2	299	0,1797	0,2222	0,1685	0,1667	0,2162	
	301	0,0078	0,0093	0,0054	0,0370	0,0000	
	305	0,0312	0,0185	0,0109	0,0370	0,0000	
	313	0,3047	0,2593	0,2337	0,2500	0,2162	
	315	0,0000	0,0000	0,0000	0,0093	0,0135	
	317	0,0859	0,0648	0,1196	0,0741	0,1216	
	321	0,0000	0,0185	0,0054	0,0000	0,0000	
	323	0,3359	0,3426	0,3533	0,3704	0,3378	
	325	0,0000	0,0185	0,0272	0,0093	0,0135	
	327	0,0234	0,0000	0,0435	0,0278	0,0000	
	329	0,0312	0,0278	0,0326	0,0185	0,0811	
	333	0,0000	0,0185	0,0000	0,0000	0,0000	2003
	m16	255	0,4077	0,4196	0,4462	0,4352	0,2717
257		0,0923	0,0357	0,0591	0,0741	0,0870	
259		0,4231	0,4732	0,4355	0,4537	0,5652	
261		0,0462	0,0179	0,0108	0,0000	0,0435	
263		0,0308	0,0536	0,0484	0,0370	0,0326	
m26	215	0,2462	0,3571	0,2957	0,2407	0,2717	
	217	0,1000	0,0268	0,0538	0,0926	0,1087	
	219	0,6538	0,6161	0,6505	0,6667	0,6196	

variando de 0,7 a 4%) e 4 exclusivos para o ano de 2006 (todos com aproximadamente 1,2% de frequência).

3.3.2- Os pirarucus do setor Jarauá são geneticamente semelhantes?

Os valores de F_{st} par-a-par para quinze lagos do setor Jarauá analisados mostraram que a maioria destes não apresentou divergência genética significativa (**Tabela 10**). Naqueles em que esta medida teve significância, o valor estimado de F_{st} foi baixo para a maioria das comparações (0,01 a 0,04), exceto entre os lagos Cedrinho e Jaraqui que apresentou valores moderados (0,07). Os alelos mais frequentemente observados em cada população foram os mesmos e somente dois foram identificados exclusivamente em um lago (alelo 273 para o m7 no lago Apuí e o alelo 315 no loco m2 no lago Jaraqui). Estes alelos foram exclusivos também quando analisamos todo o conjunto de lagos amostrados na Reserva Mamirauá (ver **Tabela 6**). Foram detectados cinco migrantes entre os lagos do setor Jarauá, sendo que as distâncias entre os lagos de origem e de chegada variavam entre 2,5 a 20,2 km. A correlação entre os índices de diferenciação genética (F_{st}) e as distâncias geográficas entre os lagos não foi significativa ($p=0,424$).

3.3.3- Existe diferença genética entre os pirarucus do Jarauá e do Maraã?

Os parâmetros populacionais analisados mostram que ocorre uma moderada diferenciação entre as populações de pirarucus do setor Jarauá e do Maraã. A AMOVA detectou que 4,8% de toda a variação foi observada entre estes dois estoques. O índice de diferenciação (F_{st}) entre as mesmas foi

Tabela 10: Matriz de diferenciação genética (Fst) (abaixo da diagonal) e da distância geográfica em quilômetros (acima da diagonal) entre 15 lagos do setor Jarauá. A última coluna mostra a distância geográfica entre os lagos do Jarauá e o Complexo Lago Preto (Maraã). Os valores em negrito e asterisco (*) correspondem a Fst significativa ($p < 0,05$).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
1	-	4,4	5,8	9,5	17,4	3,5	8,3	22,6	25,2	19,4	24,3	19,6	20,2	16,7	15,0	88,5
2	0.0189*	-	1,4	6,4	15,6	5,9	6,3	19,1	21,3	16,5	20,7	16,6	16,7	15,1	12,7	92,4
3	0.0472*	0.0409*	-	6,3	15,8	7,2	6,7	18,5	20,5	16,2	20,0	16,2	16,1	15,3	12,7	93,2
4	0.0727*	0.0267	-0.0043	-	9,5	8,4	2,4	13,0	15,9	10,1	14,7	10,2	10,7	9,1	6,4	98,0
5	0.0003	0.0283	0.0355	0.0592*	-	14,8	9,4	9,7	14,0	5,2	11,3	5,7	8,7	0,9	3,2	104,3
6	0.0101	0.0189	0.0204	0.0032	-0.0111	-	6,4	21,1	24,2	17,5	22,8	17,7	18,8	14,0	12,8	90,1
7	0.0352*	0.0421*	-0.0092	-0.0172	0.0172	-0.0249	-	14,7	17,8	11,2	12,4	12,4	12,4	8,9	6,8	96,4
8	0.0145	0.0381*	0.0083	0.0424*	-0.0086	0.0045	-0.0124	-	4,4	4,6	1,8	4,0	2,4	10,5	9,1	111,0
9	-0.0005	0.0101	0.0180	0.0140	-0.0160	-0.0070	-0.0039	-0.00701	-	8,9	3,1	8,3	5,7	14,8	13,1	113,7
10	0.0169*	0.0263	0.0189	0.0250	-0.0058	-0.0136	-0.0060	-0.00409	-0.0060	-	6,3	0,6	3,7	5,9	4,8	107,5
11	0.0063	-0.0050	-0.0008	0.0024	-0.0060	-0.0111	-0.0020	0.00141	-0.0206	-0.0033	-	5,8	4,0	12,2	10,9	112,8
12	0.0108	0.0202	0.0384	0.0501	-0.0097	-0.0122	-0.0007	-0.02041	-0.0061	0.0019	-0.0025	-	3,1	6,4	5,2	107,8
13	0.0206*	0.0285	0.0406	0.0272	-0.0073	0.0014	0.0148	0.02384	-0.0100	0.0084	-0.0100	0.0235	-	9,4	7,4	108,7
14	0.0144	0.0291	0.0434*	0.0402*	-0.0047	-0.0139	0.0120	0.02302*	-0.0031	0.0054	0.0119	0.0108	0.0073	-	3,2	103,4
15	0.0044	0.0218	0.0308	0.0310	-0.0173	-0.0352	-0.0053	0.00467	-0.0150	-0.0060	-0.0044	-0.0020	-0.0071	-0.0181	-	102,8
16	0.0546*	0.1097*	0.0874*	0.0981*	0.0238*	0.0449*	0.0726*	0.0652*	0.0171*	0.0460*	0.0504*	0.0782*	0.0353*	0.0470*	0.0302*	-
	1- Lago Cedrinho			5- Lago Samaumeirinha do Jaraqui			9- Ressaca do Itu			13- Lago do Apuí						
	2- Cano do Cedrinho			6- Cabeceira do Lago Baixo			10- Lago Samaumeirinha			14- Lago Matá-Matá						
	3- Lago Poção			7- Lago Samaúma			11- Ressaca do Curuçá			15- Lago Panelão						
	4- Lago Jaraqui,			8- Ressaca do Panema			12- Lago Maciel Comprido			16- Complexo Lago Preto (Maraã)						

pequeno (0,048), mas significativa ($p=0,00$). A comparação entre os alelos mais freqüentes nas duas populações mostrou diferenças para os locos m7, m20, m2 e m16 (ver **Tabela 5**), mas se considerarmos os dois alelos mais freqüentes para cada loco verificamos que estes são compartilhados entre as duas populações, exceto para o m2. Foram ainda identificados 11 alelos exclusivos para o Jarauá e 5 para o Maraã, sendo a freqüência deste entre 0,2 e 5%.

O programa GeneClass detectou a presença de sete migrantes entre as duas populações, sendo que quatro foram no sentido Maraã para Jarauá, enquanto três foram capturadas no Maraã, mas provavelmente emigraram do setor Jarauá. O teste de Mantel foi estatisticamente significativa ($p=0,001$, $r=0,10$) quando comparamos os 15 lagos com mais de oito amostras genotipadas do Jarauá com o Complexo Lago Preto (Maraã), mostrando que a ocorre diferenciação por distância entre os dois pontos da reserva.

3.3.4- Existe diferença genética entre os pirarucus de Mamirauá e os de Santarém e Tucuruí?

Os parâmetros usados para a caracterização das populações de Jarauá, Maraã, Santarém e Tucuruí já foram descritos no item 3.2. Uma vez que foi detectada uma pequena diferenciação entre as populações dentro da Reserva Mamirauá, usamos os dois pontos (Jarauá e Maraã) separadamente nesta análise. O índice de diferenciação de Wright foi significativa para todos os pares de localidades, sendo baixa entre as duas populações da reserva (0,048), como já descrito anteriormente. Santarém mostrou diferenciação moderada

com todas as outras localidades, enquanto as duas populações da reserva tiveram grande diferenciação com os pirarucus de Tucuruí (**Tabela 11**). A análise de AMOVA mostrou 10,8% de variação entre a Reserva Mamirauá, Santarém e Tucuruí, mas com maior parte desta dentro da população total de pirarucus estudados.

Os resultados de inferência Bayesiana mostram um valor de $\ln P(X/K)$ baixo para $K=1$ ($\ln P(X/K) = -9.312,72$), o qual foi crescente até o número máximo de populações simuladas ($K=7$; $-8.362,63$) (**Figura 16**). Este fenômeno foi citado no manual do programa e observado em outros estudos (Evanno *et al.* 2005; Nguyen, 2008), os quais aplicaram a correção do número de populações (ΔK) sugerida por Evanno *et al.* (2005). Os valores corrigidos apontam para duas populações ($K=2$) como nível principal de estruturação. O perfil genético de cada indivíduo analisado mostra uma grande contribuição genética do estoque formado por Santarém e Tucuruí na população de pirarucus que habita a Reserva Mamirauá (**Figura 17**).

Foram detectados sete possíveis migrantes, sendo que dois foram coletados no Jarauá e procedentes do Maraã, e outros dois que migraram no sentido inverso (do Jarauá para Maraã). Um indivíduo migrante do Maraã foi coletado em Santarém, assim como dois de Tucuruí foram detectados na população do Jarauá. O valor de significância obtida no teste de Mantel descartou a hipótese de que a diferenciação entre estes pontos pode ser atribuída somente a distância geográfica entre os mesmos ($p=0,087$), indicando que algum outro fator além da distância é responsável por esta diferenciação genética entre os pirarucus do Jarauá, Maraã, Santarém e Tucuruí.

Tabela 11: Índices de fixação F_{st} (abaixo da diagonal) e distância geográfica em quilômetros (acima da diagonal) estimados entre as populações de pirarucus do Jarauá, Maraã, Santarém e Tucuruí. Todos os valores de F_{st} foram significantes.

<i>Populações</i>	<i>F_{st} / Distância geográfica</i>			
	Jarauá	Maraã	Santarém	Tucuruí
Jarauá	-	105	1300	2150
Maraã	0,0482	-	1450	2300
Santarém	0,1344	0,1281	-	850
Tucuruí	0,1878	0,1935	0,0609	-

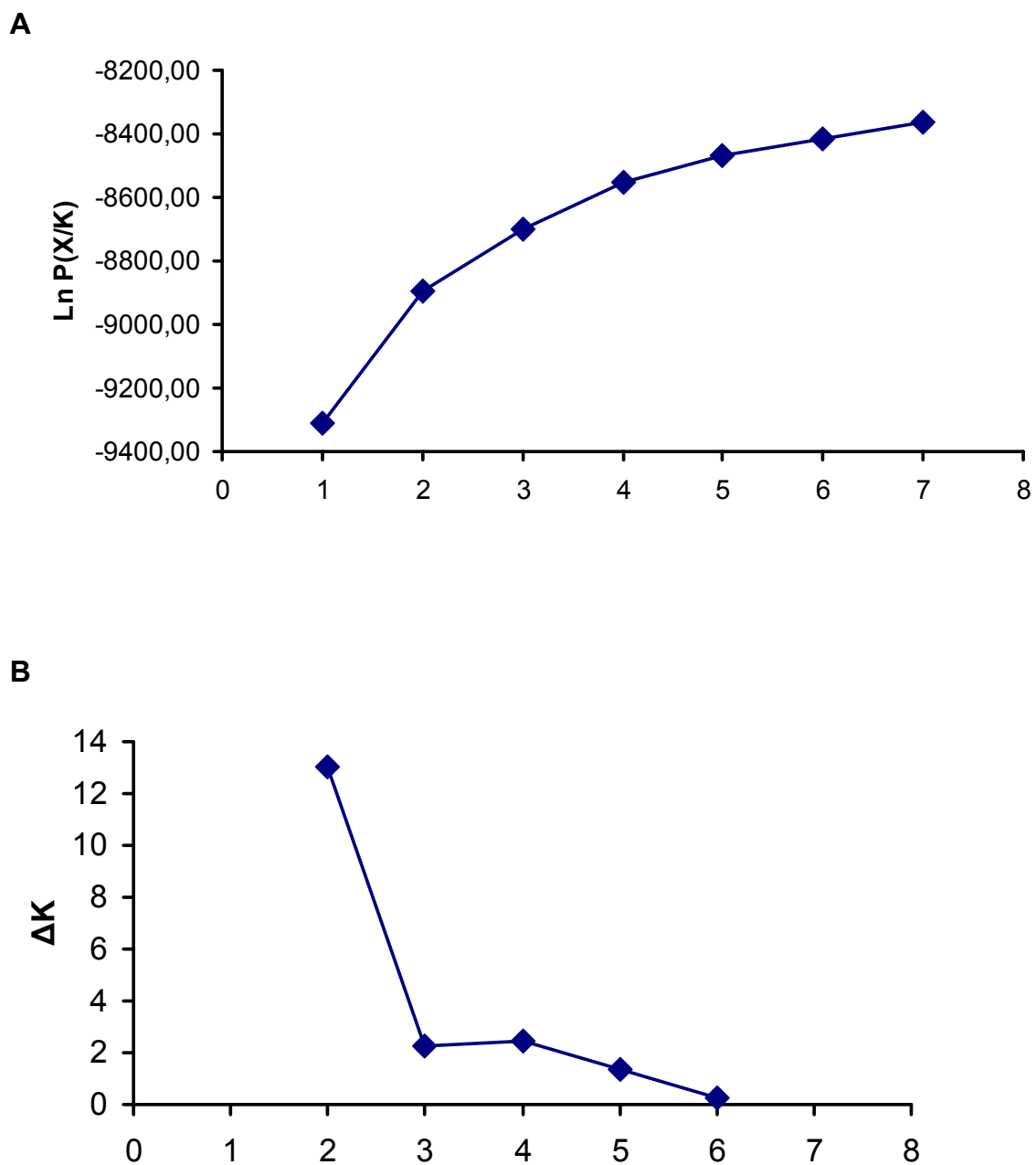


Figura 16: Gráfico mostrando o resultado da análise bayesiana do programa *Structure*. No gráfico A os valores de $\text{Ln } P(X/K)$ e em B o valor corrigido (ΔK) para as sete populações simuladas.

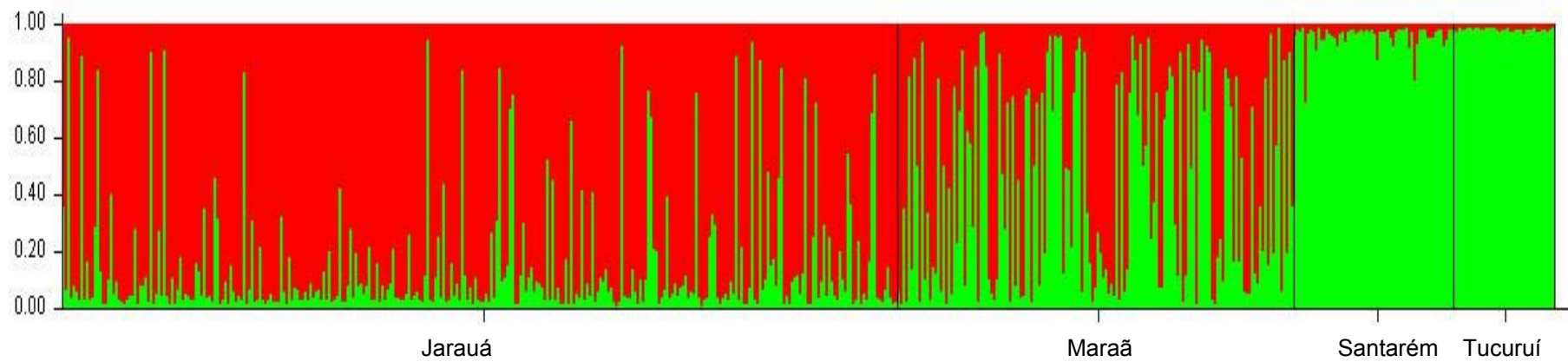


Figura 17: Perfil de contribuição genética de cada estoque considerando $K=2$ para cada indivíduo analisado das populações do Jarauá, Maraã, Santarém e Tucuruí. A cor verde representa um estoque e a vermelha outro.

DISCUSSÃO

4.1. CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DOS PIRARUCUS DA RDSM

As informações obtidas a partir da caracterização genética de uma população são de grande utilidade no monitoramento, além de estabelecer parâmetros comparáveis dentro das populações ou entre espécies. Estes parâmetros auxiliam no direcionamento de políticas apropriadas de manejo que visem a melhor manutenção deste recurso. A caracterização dos pirarucus da Reserva Mamirauá indicou a presença de mais alelos identificados nesta localidade que os encontrados em Santarém (Carvalho, 2008; Farias *et al.*, 2003) e Tucuruí (Souza, 2006). Este resultado era esperado, uma vez que a quantidade de indivíduos analisados por nosso estudo foi muito superior aos demais. Entretanto, quando comparamos os índices de riqueza alélica, a qual corrige as diferenças entre os tamanhos das amostras, essa tendência se repete, reforçando a presença de maior diversidade genética entre os pirarucus da reserva que os demais pontos comparados.

Uma vez que foram caracterizadas populações diferentes da utilizada no desenvolvimento dos marcadores microssatélites, era esperado que novos alelos fossem identificados, os quais parecem estar relacionados ao número de indivíduos analisados de cada população. Dos 19 alelos novos descritos para a espécie, somente cinco estão presentes na população menos amostrada (Tucuruí), enquanto 15 destes foram encontrados entre os pirarucus do Jarauá (população mais amostrada). Mesmo entre os exemplares de Santarém, foram identificados alelos que estavam fora da faixa de tamanho descritos por Farias *et al.* (2003). Apesar de serem de uma mesma região geográfica que os

animais usados na montagem da biblioteca genômica, o número de indivíduos analisados por Carvalho (2008) foi quatro vezes maior que os utilizados na descrição dos locos. Tais resultados reforçam a importância de uma amostragem representativa para que uma caracterização genética reflita a variabilidade de uma população.

Alguns destes alelos novos foram encontrados com uma alta frequência, inclusive entre os pirarucus de Santarém. O fato de um alelo muito freqüente não ter sido amostrado no estudo de Farias *et al.* (2003) pode ser explicado pela padronização da genotipagem. O processo de identificação dos alelos durante a caracterização depende da padronização de genotipagem adotada. Quando comparamos diferentes corridas eletroforéticas em seqüenciadores automáticos, observamos que podem ocorrer pequenas flutuações no tamanho dos fragmentos identificados. O uso de ferramentas, tais como os *bins* (barras com o intervalo de tamanho aceitável para cada alelo), auxiliam a identificação destes. Desta forma, quando comparamos corridas diferentes usando uma mesma padronização, as chances de identificação errônea dos alelos são minimizadas. Entretanto, a comparação entre alelos genotipados em estudos que tenham usado padronizações diferentes é arriscada, uma vez que os intervalos aceitáveis para identificação de determinado alelo podem ser diferentes. Desta forma um mesmo alelo pode estar sendo identificado de duas formas distintas em estudos diferentes. Por este motivo, optamos por comparar as frequências alélicas somente entre as populações caracterizadas por Souza (2006) e Carvalho (2008), as quais seguiram a mesma padronização de genotipagem utilizada por nós.

A frequência de indivíduos heterozigotos em uma população é um importante indicativo de variabilidade genética desta. Em nosso estudo encontramos uma heterozigosidade média para a Reserva Mamirauá (0,57) similar à encontrada em Santarém (0,55 e 0,57 para Carvalho 2008 e Farias *et al.* 2003, respectivamente), porém maior que a de Tucuruí (0,48) e menor que a de Óbidos (0,69) (**Tabela 12**). Outros estudos também estimaram as heterozigosidade entre diferentes populações de peixes e encontraram valores que variavam de 0,38 (*Tor douronensis*) a 0,84 (*Pagrus major*) (ver **Tabela 12**).

É interessante observar a relação entre a heterozigosidade e o número de alelos por locos. Para a maioria das espécies ilustradas, foi encontrada uma alta frequência de heterozigotos quando os locos analisados tiveram pelo menos 10 alelos por loco. O número médio de alelos por loco descritos na caracterização de Farias *et al.* (2003) foi bem abaixo deste patamar (4,3 alelos/loco). Dentre os locos descritos por estes autores, escolhemos os mais informativos, de forma que a média encontrada por nós foi de 7,1 alelos por loco. Apesar desta média ser superior à descrita na caracterização, ele ainda é inferior aos mostrados na tabela. Já quando comparamos com outros estudos que usaram os mesmos locos microssatélites, verificamos que os níveis de heterozigosidade são equivalentes. Acreditamos que o número médio de alelos por loco pode ter influenciado no índice de heterozigosidade do pirarucu que foi menor do que os estimados para outras espécies de peixes.

Comparando a heterozigosidade observada (H_o) e esperada (H_e) na população de pirarucus da reserva, encontramos uma diferença significativa para quatro dos sete marcadores. Este desequilíbrio gênico ocorreu através de

Tabela 12: Caracterizações e estudos populacionais com peixes usando marcadores microsatélites mostrando o número de indivíduos analisados (N), número de locos, médias de heterozigosidade observada (Ho) e esperada (He), número médio de alelos por locos e fonte.

<i>Espécie</i>	<i>N</i>	<i>Número de locos</i>	<i>Média de Ho</i>	<i>Média de He</i>	<i>Alelos por loco</i>	<i>Fonte</i>
<i>Arapaima gigas</i> (RDSM - AM)	463	7	0,57	0,60	7,1	Este trabalho
<i>Arapaima gigas</i> (Óbidos - PA)	32	8	0,69	0,72	8,0	Hamoy <i>et al.</i> (2008)
<i>Arapaima gigas</i> (Santarém - PA)	60	7	0,55	0,59	4,9	Carvalho (2008)
<i>Arapaima gigas</i> (Tucuruí - PA)	38	7	0,48	0,49	3,1	Souza (2006)
<i>Arapaima gigas</i> (Santarém - PA)	15	14	0,57	0,62	4,3	Farias <i>et al.</i> (2003)
<i>Arapaima gigas</i> (Santarém - PA)	15	7	0,63	0,66	4,7	Farias <i>et al.</i> (2003)*
<i>Pagrus auratus</i>	468	6	0,75	0,74	10,5	Hauser <i>et al.</i> (2002)
<i>Salmo salar</i>	175	15	0,67	0,68	10,9	Norris <i>et al.</i> (1999)
<i>Tor douronensis</i>	447	15	0,38	0,37	12,1	Nguyen (2008)
<i>Salmo salar</i>	183	5	0,79	0,83	17,6	Fontaine <i>et al.</i> (1997)
<i>Nemadactylus macropterus</i>	55	7	0,70	0,79	18,4	Burridge & Smolenski (2000)
<i>Pagrus major</i>	248	4	0,84	0,87	29,5	Perez-Enriquez <i>et al.</i> (1999)

* Dados de Farias *et al.* (2003) somente com os sete locos utilizados neste trabalho.

uma deficiência de heterozigotos para três locos e o excesso para um loco. O padrão predominante de excesso de homozigotos pode ser explicado por efeito Wahlund. Este fenômeno ocorre quando uma população subdividida é analisada como uma unidade, causando uma diminuição na frequência de heterozigotos pela limitação do fluxo gênico entre os dois estoques. Este fator pode explicar o padrão encontrado em nossas análises, uma vez que o conjunto de pirarucus que representam a Reserva Mamirauá foi composto pela junção simples dos peixes coletados no Jarauá e no Maraã, os quais apresentam uma pequena estruturação genética.

Os índices de variabilidade genética encontrado em nosso estudo mostram que os pirarucus de Mamirauá apresentam alta diversidade genética, sendo esta maior que a encontrada para populações de Santarém e Tucuruí por Carvalho (2008) e Souza (2006), respectivamente. Por outro lado, Hrbek *et al.* (2005) encontraram índices de diversidade gênica semelhantes para populações de Mamirauá ($\hat{H}=0,884$) e Marabá ($\hat{H}=0,885$), sendo esta localidade próxima a Tucuruí. O marcador genético utilizado por estes autores pode ser a causa do padrão discordante encontrado entre os dois estudos. Algumas características do DNA mitocondrial em relação aos marcadores nucleares como o microssatélite podem explicar essas diferenças. Este primeiro tipo de marcador apresenta uma herança exclusivamente materna (Beebee & Rowe, 2008) e isso leva a uma menor representatividade da população, uma vez que a linhagem paterna deixa de ser analisada. Outro aspecto relacionado a herança uniparental é que esta sofre mais efeitos da deriva genética (Beebee.& Rowe, 2008). Além disso, a taxa de mutação das

regiões seqüenciadas pelos autores é menor que a dos microssatélites (Selkoe & Toonen, 2006), o que se reflete em uma menor capacidade de detectar diferenças dentro e entre populações do que marcadores hipervariáveis como os utilizados no presente trabalho. Outro aspecto que reforça nossos resultados é que número de indivíduos analisados de Mamirauá (N=465) e de Tucuruí (N=38) são maiores que os amostrados por Hrbek *et al.* (2005) (N=33 para Mamirauá e N=13 para Marabá).

É importante ressaltar que essa alta variabilidade genética encontrada na reserva pode ser resultado de diferentes fatores, dentre eles o manejo. Outros aspectos podem e devem contribuir para que se observe nesta área uma maior diversidade genética de pirarucus do que nas demais localidades estudadas. Uma das hipóteses é que pelo fato da reserva estar inserida em uma região de baixa altitude, pode gerar uma tendência de migração de pirarucus das áreas adjacentes para dentro da reserva, a qual funciona como um refúgio durante o período seco. Este padrão pode estar acontecendo ao longo da várzea do Amazonas que é o maior ambiente de floresta alagada da Amazônia, com aproximadamente 200.000 Km² (Ayres, 2006). A região onde está inserida a Reserva Mamirauá, é uma das porções onde este ambiente apresenta maior área e pode por isso abrigar uma maior quantidade deste recurso do que outras localidades. Além disso, outros aspectos como o estado de conservação ambiental do local devem também ser considerados.

4.2. O MANEJO DOS PIRARUCUS NA RESERVA MAMIRAUÁ

Alguns estudos desenvolvidos pelo Programa de Monitoramento de Pesca (PMP) do Instituto de Desenvolvimento Sustentável Mamirauá (IDSM) têm indicado que o manejo dos pirarucus esta sendo biologicamente efetivo. A crescente tendência de aumento do tamanho da população pode ser observada através dos dados de contagens (Viana *et al.*, 2007) e densidades (Arantes *et al.*, 2006) de pirarucus na reserva como mostrado na **Tabela 13** e **Figura 18**. É evidente o aumento populacional desde a implementação do manejo, apesar de pequenas flutuações nas coletas dos dados. Algumas destas flutuações podem ser explicadas por eventos ocasionais ocorridos na região. Em 2003, foi relatada a pesca ilegal de pirarucus em um dos lagos do Jarauá, que além de reduzir o tamanho populacional, também teria levado parte dos pirarucus a se deslocarem para outros corpos d'água (Arantes *et al.*, 2006). Já no Maraã, a diminuição na densidade em 2005 pode ser explicada pelo início do manejo nos complexos Itaúba e Tigre. Desde então, novos lagos começaram a ser monitorados e conseqüentemente a área manejada aumentou, fazendo com que a densidade de pirarucus diminuísse. Considerando a ocorrência de variações na obtenção destes parâmetros, é nítida a tendência de crescimento populacional do pirarucu na reserva.

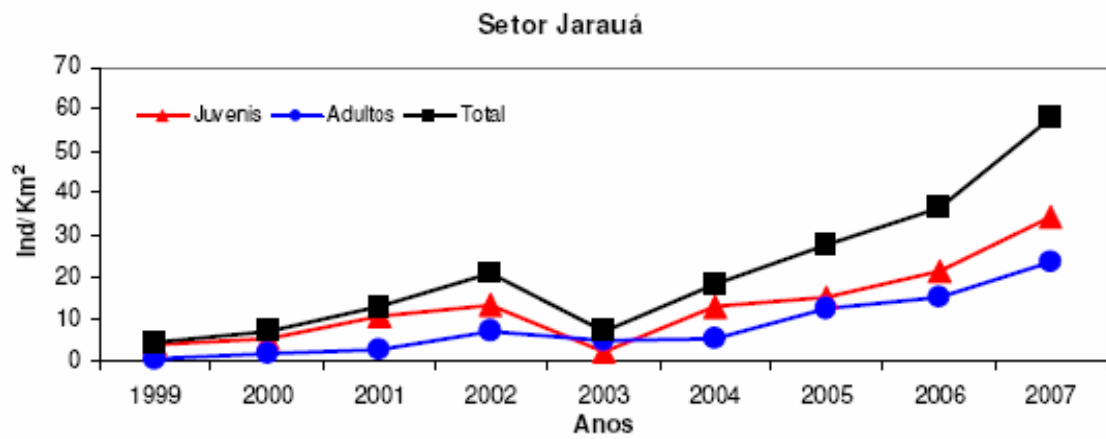
Queiroz & Sardinha (1999) analisaram aspectos demográficos de pirarucus na Reserva Mamirauá antes da implementação do manejo e sugeriram que esta população estava sendo submetida à sobrepesca, podendo ser reduzida á metade do seu tamanho em um período de seis anos. Segundo estes autores, a paralisação total da pesca naquele momento permitiria a

Tabela 13: Número de pirarucus contados, cota disponível, autorizada e número de pirarucus capturados a cada ano no setor Jarauá. A cota disponível corresponde a 30% do total de pirarucus adultos do ano anterior. Adaptado de Viana *et al.*, 2007 e IDSM, 2008.

<i>ANO</i>	<i>Juvenis</i>	<i>Adultos</i>	<i>Total</i>	<i>Cota disponível</i>	<i>Cota solicitada</i>	<i>Cota autorizada</i>	<i>Captura</i>
1999	2.149	358	2.507	-	-	-	141
2000	2.984	994	3.978	-	-	-	153
2001	5.901	1.441	7.342	298	300	200	188
2002	7.017	3.932	10.949	432	500	500	497
2003	7.296	4.327	11.623	1.180	900	900	877
2004	7.159	3.135	10.294	1.227	1.230	1.230	958
2005	8.564	7.111	15.675	940	1.230	1.230	1.205
2006	12.052	8.596	20.648	2.133	1.700	1.700	1.526
2007	19.398	13.345	32.743	2.579	1.700	1.700	1.676
2008	-	-	-	4.004	2.000	-	-

- Dados não disponíveis ou inexistentes

A



B

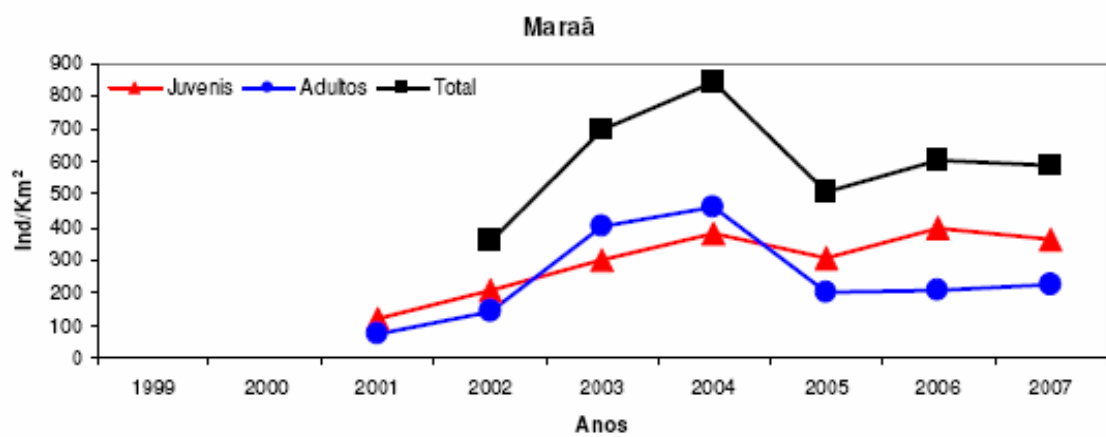


Figura 18: Gráficos de densidade de pirarucus no Setor Jarauá (A) e no Complexo Lago Preto – Maraã (B) segundo Arantes *et al.* (2006) (retirado de IDSM, 2008).

recuperação do equilíbrio populacional dentro de cinco anos. Entretanto, os dados de acompanhamento da pesca coletados pelo Programa Manejo de Pesca (PMP) demonstram que o estoque não somente se recuperou em um intervalo de tempo menor que o previsto, como também aumentou em mais de 13 vezes em nove anos.

Apesar de alguns estudos evidenciarem o crescimento populacional, nada se sabia sobre aspectos genéticos destas populações ao longo dos nove anos de manejo. A utilização de ferramentas de genética molecular vem sendo amplamente utilizada em estudos de conservação e para o monitoramento populacional de espécies de interesse econômico ou conservacionista (Nguyen, 2008; McCusker *et al.*, 2008; O'Connell & Wright, 1997). Nossos resultados indicam bons níveis de variabilidade genética dentro da Reserva Mamirauá, e permitem que sejam destacados alguns aspectos que podem estar colaborando efetivamente para isso, tais como a migração lateral e a dispersão.

O comportamento de migração lateral desempenhado pelos pirarucus tem grande importância nos níveis de variabilidade genética por possibilitar a mistura entre indivíduos de lagos diferentes. Este comportamento parece explicar o grande compartilhamento de alelos, indicando uma ausência de estruturação genética dentro do setor Jarauá. Os lagos apresentam perfis genéticos semelhantes, o que pode ser explicado pela mistura entre indivíduos durante a cheia e pelo retorno para diferentes lagos quando o nível da água começa a diminuir. A **Figura 19** ilustra a hipótese de que não existe obrigatoriamente uma fidelidade ao lago durante este retorno, a qual é apoiada

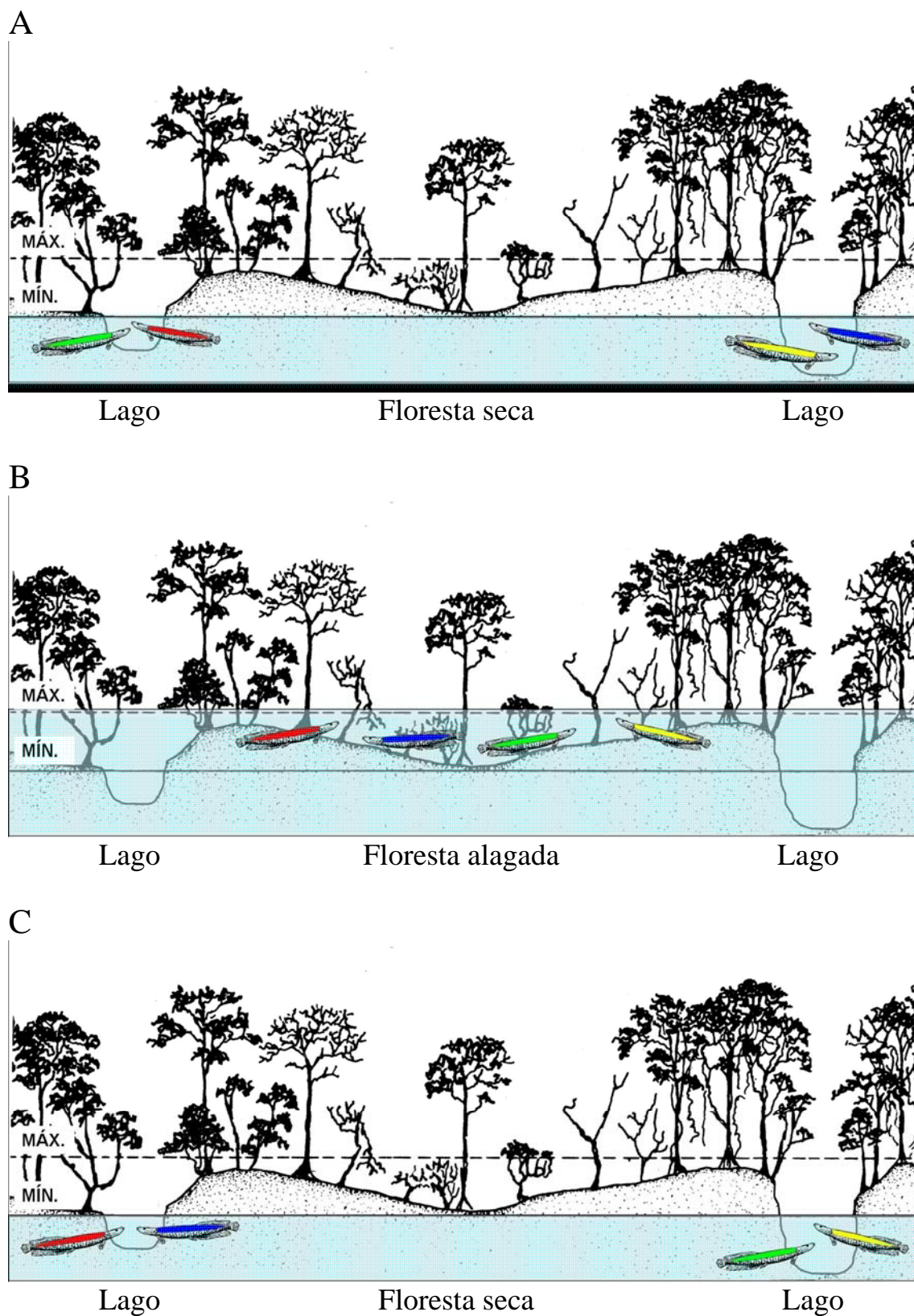


Figura 19: Perfil do ambiente de várzea mostrando a dinâmica de dispersão dos pirarucus durante a seca (A e C) e cheia (B). Adaptado de Ayres (2006).

por nossos resultados. Para que esta hipótese possa ser testada, sugerimos que sejam desenvolvidos estudos detalhados sobre a dispersão de adultos e juvenis de pirarucus usando marcação e acompanhamento remoto (GPS).

Muito pouco é conhecido sobre a dispersão do pirarucu. O estudo que incluiu aspectos de deslocamento e fidelidade ao sítio desenvolvido por Queiroz (2000) revelou uma dispersão média de 13,7 Km por ano, mas somente 10 de 147 indivíduos marcados foram recapturados entre 0,5 e 18 meses após a marcação. A distância em linha reta entre os pontos de soltura e captura variou de 3,9 a 64,2 Km para estes animais. Por outro lado, o mesmo autor relata a recuperação de dois indivíduos que foram capturados no mesmo lago em que, cinco anos antes, haviam sido marcados. Provavelmente a diferença entre estes dois padrões de dispersão observados por Queiroz (2000) é a ação antrópica exercida sobre o ambiente. O lago Serapião, onde houve a recuperação do peixe após 5 anos de soltura no mesmo local, foi pouco explorado desde 1993, quando foi iniciado o estudo de marcação. Essa pequena perturbação ambiental pode ter relação com a fidelidade deste indivíduo ao lago, enquanto os outros peixes recapturados apresentaram outro padrão de deslocamento. Estes registros corroboram nossa hipótese de que pode ou não haver a fidelidade no retorno ao lago.

Os níveis de variabilidade genética encontrados para os pirarucus da Reserva Mamirauá sugerem que a cota de pesca anualmente autorizada pelo IBAMA está dentro do perfil ideal para manutenção da espécie, podendo inclusive ser feita uma reavaliação, no sentido de permitir o aumento da quantidade máxima de pirarucus pescados. Análises de produção máxima

sustentável antes da implementação do manejo indicavam que aparentemente a quantidade de pirarucus abatidos estava próxima ou acima dos limites que o modelo sustentável estabelecia (Queiroz & Sardinha, 1999). Caso a pesca do pirarucu tivesse se mantido neste nível, os índices de variabilidade, tais como a heterozigosidade e o número de alelos, possivelmente seriam menores que os encontrados em nosso estudo. As estratégias adotadas para o manejo desta espécie permitiram que a diversidade genética deste estoque se mantivesse em níveis satisfatórios.

Nós sugerimos que estudos para estimar a capacidade máxima de retirada de pirarucus nestas áreas sejam desenvolvidos, uma vez que a cota de 30% surgiu como uma quantidade razoável que não deveria trazer danos a população, mas sem nenhuma fundamentação experimental. Realmente esta proporção atingiu sua meta, e agora pode inclusive ser reavaliada. É importante lembrar que outros aspectos além desta capacidade máxima devem ser considerados no estabelecimento desta cotas, tais como as condições logísticas dos pescadores e a comercialização. Amaral (2007) coloca a comercialização como o principal gargalo no processo de produção pesqueira da região e estas questões devem ser amplamente discutidas antes de se manter ou aumentar o número de adultos anualmente retirados.

Outro aspecto avaliado através do monitoramento genético foi o efeito temporal sobre a pesca do pirarucu. Nossos resultados de acompanhamento durante cinco anos indicam que a pesca manejada tem sido eficiente, no sentido de não levar a uma diminuição da variabilidade genética do estoque deste peixe. Alguns outros estudos foram desenvolvidos com populações de

peixes submetidas a sobre-exploração comparando parâmetros de variabilidade genética ao longo do tempo. Por exemplo, os índices de heterozigosidade e o número médio de alelos estimados para estoques de *Pagrus auratus* ao longo de 50 anos de exploração mostraram uma significativa diminuição na heterozigosidade para este recurso (Hauser *et al.*, 2002).

Os resultados das análises genéticas mostraram pequenas flutuações nas freqüências e composição alélicas entre os anos analisados, indicando que não houve significativa perda de variabilidade nestes cinco anos no Jarauá. Entretanto, o intervalo de tempo estudado é muito curto para que mudanças genéticas profundas possam ser detectadas. Nós sugerimos fortemente a continuidade do monitoramento genético, usando como referência os parâmetros gerados neste estudo. O acompanhamento genético de populações vem sendo uma importante ferramenta aplicada em espécies de importância ecológica e econômica, tais como os salmonídeos (Hansen *et al.*, 2002; Guinand & Scribner, 2003). A comparação de aspectos, tais como a heterozigosidade e o número de alelos podem ser importantes indicativos de processo populacionais, como sobrepesca e efeito gargalo de garrafa (*bottleneck*) (Chistiakov *et al.*, 2006).

4.3 ASPECTOS POPULACIONAIS DOS PIRARUCUS DA RDSM

A caracterização de amostras de pirarucus procedentes de duas localidades da Reserva Mamirauá nos permitiu verificar se existe diferenciação genética dentro desta área. Os resultados indicam uma pequena diferenciação genética entre o Jarauá e o Maraã. Este resultado corrobora o estudo

desenvolvido por Watanabe (2007), a qual encontrou um F_{st} significativo de 0,036 quando comparou pirarucus destas mesmas localidades. Segundo Balloux & Lugon-Moulin (2002), Wright destacou que a diferenciação não deve ser negligenciada mesmo se o F_{st} for menor que 0,05. Desta forma consideramos a estruturação entre os dois estoques da reserva como válida.

O fluxo gênico limitado entre duas populações leva a uma diferenciação entre as mesmas. A distância geográfica, por sua vez, é negativamente correlacionada a este fluxo, de forma que quanto maior a distância entre os estoques, menor o fluxo genético entre eles. Entretanto, o efeito que a distância exerce sobre a estruturação populacional depende também de aspectos biológicos da espécie, tais como sua capacidade migratória. Nossos resultados com os pirarucus mostram que a diferenciação genética observada entre os lagos do setor Jarauá e o Complexo Lago Preto é explicada pela distância geográfica entre estas localidades. Este resultado é coerente com o caráter supostamente sedentário da espécie em estudo. Uma vez que a espécie em estudo parece não desempenhar grandes deslocamentos longitudinais, o fluxo genético acontece ao longo da reserva de forma lenta através da dispersão dos adultos e principalmente dos juvenis durante a migração lateral. Segundo Castello (2008a), quando o nível da água começa a diminuir, o pirarucu adulto se separa dos jovens e todos migram para os canais e lagos na porção baixa da várzea. Entretanto, o padrão de dispersão desta prole também não é conhecido.

A distribuição homogênea dos alelos em pequenas distâncias, associada a diferenciação de estoques separados por distâncias maiores, pode ser

explicado por um padrão de pequena “dispersão genética” para a espécie. Esta dispersão genética é “o deslocamento dos alelos” ao longo da área de distribuição, que pode acontecer através da migração de um indivíduo ou de sua prole. Os alelos presentes em uma população podem chegar a outra através da migração de um indivíduo ou mesmo através de descendentes deste indivíduo, que carregam alguns de seus alelos. Provavelmente é através desta dispersão que ocorre a homogeneização dos pirarucus da reserva, sendo que a capacidade de dispersão é limitada no tempo e no espaço.

Como discutido anteriormente, a migração lateral é de grande importância para a homogeneização da população de pirarucus, mas seu raio de alcance parece ser limitado pelo aspecto sedentário deste peixe. Essa limitação do deslocamento efetivo para a dispersão genética é responsável pela sutil diferença detectada entre os Jarauá e o Maraã. A dispersão dos juvenis pode desta forma facilitar a homogeneização ao longo da distribuição da espécie, minimizando os efeitos do sedentarismo. Este deslocamento, associado a distribuição contínua da espécie, possibilita o fluxo gênico na reserva ao longo do tempo, mas a distância geográfica faz com que seja observada uma pequena diferenciação entre estes estoques.

4.4 ESTRUTURA POPULACIONAL DOS PIRARUCUS DA RDSM, SANTARÉM E TUCURUÍ.

O pirarucu apresenta uma grande área de distribuição, ocupando grande parte da bacia amazônica. Esta ampla ocorrência, associada a aspectos biológicos como o pequeno deslocamento e a preferência por ambientes de

águas calmas sugerem a presença de estruturação genética ao longo de sua distribuição. A comparação entre as populações de Mamirauá, Santarém e Tucuruí usando marcadores microsatélites corrobora esta hipótese.

Quando comparamos os valores de F_{st} entre as quatro populações analisadas (Jarauá, Maraã, Santarém e Tucuruí) encontramos diferentes níveis de estruturação. Como já discutido, houve uma pequena diferenciação dentro da reserva, a qual pode explicada pela distância entre os pontos amostrados. Já a diferenciação entre a população de Santarém com os demais estoques foi moderada, enquanto Tucuruí com os dois pontos da reserva apresentaram uma alta diferenciação, segundo os critérios de Hartl & Clark (1997). Este padrão obedece ao critério de distribuição geográfica dos pontos amostrados, uma vez que Santarém esta localizada entre a Reserva Mamirauá e Tucuruí. Altos e significantes valores de F_{st} também foram encontrados para o estudo utilizando regiões do DNA mitocondrial do pirarucu (Hrbek *et al.*, 2005). Os autores atribuíram esta diferenciação à sobrepesca ocorrida no passado e consideraram que a população de pirarucus ao longo da bacia comporta-se como uma população panmítica, mas com restrito fluxo gênico causando pela grande área de distribuição.

A análise Bayesiana também indicou estruturação genética entre as quatro populações amostradas. Entretanto, este método estimou a presença de duas populações no total de amostras de pirarucus analisadas ($K=2$). O perfil da composição genética de cada pirarucu analisado, considerando estes dois estoques, mostrou grande similaridade entre a população de Santarém e Tucuruí. Já os pirarucus do Jarauá e do Maraã apresentam composição

genética marcada por uma mistura entre os dois estoques. Este resultado reforça a estruturação dentro da área de distribuição da espécie, mas indica um outro padrão, onde Santarém e Tucuruí seriam semelhantes. Entretanto, estas duas localidades fazem parte de sub-bacias diferentes, já que Tucuruí é banhada por águas da bacia Araguaia-Tocantins, enquanto Santarém esta inserida na bacia Amazônica. Além disso, o principal canal hídrico ligando a população de Tucuruí com as demais populações analisadas, inclui a passagem por uma região com grande influência marinha próximo à Ilha de Marajó. Desta forma, o padrão de estrutura encontrada pela análise Bayesiana não é facilmente explicado através de aspectos biológicos e ecológicos.

O padrão de composição genética dos pirarucus da reserva mostra uma mistura entre os dois estoques identificados pelo programa Structure. A maior contribuição do estoque Santarém-Tucuruí na população da reserva corrobora a hipótese de que o pirarucu se desloca subindo o rio. Por outro lado, os dados indicam que a população do Maraã tem maior contribuição do estoque Santarém-Tucuruí que o observado no Jarauá. Este fato também não tem uma explicação biológica simples, uma vez que o Jarauá está situado entre Santarém e Maraã. Desta forma consideramos que ocorre uma estruturação entre as quatro localidades estudadas, mas com certo nível de conectividade entre as mesmas.

Alguns processos podem levar a diferenciação genética entre dois estoques populacionais. Dentre eles a diminuição do fluxo gênico é um dos mais importantes, o qual muitas vezes depende da distância entre estes estoques. Quando testamos a hipótese de diferenciação por distância para

explicar as localidades amostradas ao longo da distribuição do pirarucu, encontramos valores não significantes. Este resultado indica que a diferenciação observada não pode ser explicada somente pela distância entre as quatro populações. Para verificar se alguma das localidades estaria levando a um desvio desta correlação entre as distâncias genéticas e geográficas, testamos todas as combinações excluindo um estoque de cada vez, mas em nenhuma delas a correlação foi significativa. Os dados de seqüências de DNA mitocondrial (Hrbek *et al.*, 2005) também mostraram o mesmo padrão de estruturação não apoiado pelo modelo de diferenciação por distância segundo Mantel. Apesar disto, os autores afirmam que o isolamento por distância parece ser o mais importante fator atuante na dinâmica populacional desta espécie. Por outro lado, os resultados de Hrbek *et al.* (2007) usando o mesmo tipo de marcador por nós utilizados, mostraram significância para a correlação entre distância genética e espacial ($p=0,012$). Estes autores usaram um maior número de locos e de localidades, entretanto, o número de indivíduos analisados por nós foi quase quatro vezes maior. Nossos dados sugerem que outros aspectos populacionais além da distância estejam sendo determinantes na diferenciação entre estas populações, tais como a intensa exploração de algumas localidades.

Quando consideramos o efeito da distância sobre a sub-estruturação genética de uma população estamos indiretamente nos referindo às limitações no fluxo gênico entre estas. Como já discutido, este fluxo pode se dar através da migração, da dispersão de juvenis ou de ambos. Quando estimamos o número de possíveis migrantes entre os estoques analisados verificamos que

ocorre um fluxo entre estas localidades, mas que este é limitado. Considerando o aspecto sedentário do pirarucu, acreditamos que esta conectividade entre as populações aconteça de forma efetiva, mas gradualmente ao longo do tempo e do espaço.

Um dos fatores que pode explicar, juntamente com a distância, a diferenciação genética entre as localidades é grande pressão de pesca exercida no passado próximo as grandes cidades amazônicas. Dados de desembarque pesqueiro e relatos históricos (Menezes, 1951) apontam para uma diminuição do estoque de pirarucus nos arredores de Manaus, Santarém e Belém. Este efeito pode ter interferido no fluxo genético e, portanto, na conectividade ao longo da bacia amazônica. Outros estudos, como o desenvolvido por Hrbek *et al.* (2005) e Hrbek *et al.* (2007) já colocava a ação antrópica exercida sobre a população de pirarucus como determinante na estrutura genética da espécie. Nós achamos que a sobrepesca exercida no passado, associada ao efeito da distância, pode estar levando a esta diferenciação entre os estoques de pirarucus.

Uma análise de autocorrelação espacial com microssatélites de pirarucus mostrou uma associação entre distâncias genéticas e geográficas em distâncias menores que 2.500 Km (Hrbek *et al.*, 2007). Segundo os autores, esta distância corresponde a maior parte da área de distribuição da espécie (aproximadamente 4.000 Km). Nossos dados, por outro lado, mostram diferenciação moderada e alta em distância de 1.500 e 2.300 Km, respectivamente, e não para distâncias maiores que 2.500 Km, como estimados pela autocorrelação espacial. Nossos resultados sugerem que o

valor máximo encontrado para que ocorra significativa conexão entre os estoques está super-estimado, havendo estruturação em distâncias geográficas menores que 2.500 Km.

5. CONCLUSÕES

Através das análises populacionais de pirarucus usando marcadores microssatélites podemos concluir que:

1. Os lagos do setor Jarauá (RDSM) apresentam perfil genético semelhante.
2. A hipótese de retorno ao lago sem fidelidade obrigatória e a dispersão dos juvenis podem ser importantes fatores responsáveis pela homogeneidade entre os lagos.
3. A pesca desenvolvida ao longo de cinco anos não levou a uma alteração da variabilidade genética da população de pirarucus.
4. As estratégias adotadas no manejo dos pirarucus na Reserva Mamirauá estão sendo ecologicamente eficientes para a manutenção de sua diversidade.
5. A cota de pirarucus anualmente pescados na Reserva Mamirauá não está afetando a manutenção de sua variabilidade genética, podendo inclusive ser reavaliada.
6. Os estoques de pirarucu do setor Jarauá e do Maraã (RDSM) apresentam pequena diferenciação genética influenciada pela distância geográfica entre estas localidades.
7. Os pirarucus da Reserva Mamirauá apresentam maior variabilidade genética que as populações de Santarém e Tucuruí.
8. Ocorre diferenciação genética entre as populações da Reserva Mamirauá, Santarém e Tucuruí, sendo esta diferenciação um reflexo do efeito da distância e da sobrepesca.

9. O monitoramento genético dos pirarucus da Reserva Mampirauá mostrou ser uma importante ferramenta para o direcionamento das estratégias do manejo deste recurso pesqueiro, devendo ser continuado.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMARAL, E. S. 2007. A comunidade e o mercado: os desafios na comercialização de pirarucu manejado das Reservas Mamirauá e Amanã, Amazonas – Brasil. **Uakari** 3 (2): 7-17.
- ARANTES, C. C.; GARCEZ, D. S.; CASTELLO, L. 2006. Densidades de pirarucu (*Arapaima gigas*, Teleostei, Osteoglossidae) nas Reservas de Desenvolvimento Sustentável Mamirauá e Amanã, Amazonas, Brasil. Instituto de Desenvolvimento Sustentável Mamirauá, Amazonas. **Uakari**, 2: 37-43.
- AYRES, J. M. 1995. As matas de várzea do Mamirauá – Médio Solimões. CNPq, Soc. Civil Mamirauá. Brasília, 123 pp.
- BAYLEY, P. B. & PETRERE JR., M. 1979. Amazon fisheries: Assessment methods, current status and management option. In Dodge, D. P. (ed.). International Large River Symposium Proceedings. Canadian Special Publication of the fish Aquatic Sciences.
- BALLOUX, F.; BRÜNNER, H.; FUGON-MOULIN, N.; HAUSSER, J. & GOUDET, J. 2000. Microsatellites can be misleading: an empirical and simulation study. **Evolution**, 54:1414-1422.
- BALLOUX, F. & LUGON-MOULIN, N. 2002. The estimation of population differentiation with microsatellite markers. **Mol. Ecol.** 11: 155 -165
- BARTHEM, R. 1999. A pesca comercial no médio Solimões e sua interação com a Reserva de Desenvolvimento Sustentável Mamirauá. In: Estratégias para Manejo de Recursos Pesqueiros de Mamirauá. Eds: Queiroz, H. L. & Crampton, W. G. R. Soc. Civil Mamirauá, CNPq Brasília, p.72-107.

- BEEBEE, T. & ROWE, G. 2008. An introduction to molecular ecology. 2^o. Edition. Oxford Universtiy Press. 400pp.
- BURRIDGE, C. P. & SMOLENSKI, A. J. 2000. Microsatellite loci from the marine fish *Nemadactylus macropterus* (Perciformes: Cheilodactylidae). **Mol. Ecol.** 9(8): 1180-1181.
- CARVALHO, F. 2008. Caracterização genética de populações de pirarucus (*Arapaima gigas*) da região de Santarém, Pará, através de marcadores microsatélites. Dissertação de Mestrado-Pós-graduação em Genética e Biologia Molecular (UFPA/IEESP).
- CASTELLO, L. 2004. A method to count pirarucu *Arapaima gigas*: fishers, assessment and management. **N. Am. J. Fish. Manag.** 24 (2): 379-389.
- CASTELLO, L. 2008a. Lateral migration of *Arapaima gigas* in floodplains of the Amazon. **Ecol. Freshw. Fish** 17:38-46.
- CASTELLO, L. 2008b. Nesting habitat of *Arapaima gigas* (Schinz) in Amazonian floodplains. **J. Fish Biol.** 72:1520-1528.
- CHAPUIS, M. P. & ESTOUP, A. 2007. Microsatellite null alleles and estimation of population differentiation. **Mol. Biol. Evol.** 24(3): 621-631.
- CHISTIYAKOV, D. A.; HELLEMANS, B. & VOLKAERT, F. A. M, 1996. Microsatellites and their genomic distribution, evolution, function and applications: A review with special reference to fish genetics. **Aquiculture** 255: 1-29.

- EXCOFFIER, L.; LAVAL, G. & SCHNEIDER, S. 2005. Arlequin ver. 3.01: An integrated software package for population genetics data analysis. **Evolut. Bioinf. Online** 1:47- 50.
- EVANNO, G.; REGNAUT, S. & GOUDET, J. 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. **Mol. Ecol.** 14:2611-2620.
- FALUSH, D.; STEPHENS, M. & PRITCHARD, J. K. 2003. Inference of population structure using multilocus genotype data: linked loci and correlated allele frequencies. **Genetics** 164:1567-1587.
- FARIAS, I.P., HRBEK, T., BRINKMANN, H., SAMPAIO, I. & MEYER, A. 2003. Characterization and isolation of DNA microsatellite primers for *Arapaima gigas*, an economically important but severely over-exploited fish species of the Amazon basin. **Mol. Ecol. Notes** 3, 128-130.
- FERRARIS Jr, C. J. 2003. Checklist of the freshwater fishes of South and Central America. Reis, R. E., Kullander, S. O. & Ferraris Jr., C.J. (eds.). EDIPUCRS, Porto Alegre, Brasil.
- FONTAINE, P., M.; DODSON, J., J.; BERNATCHEZ, L. & SLETTAN, A. 1997. A genetic test of metapopulation structure in Atlantic salmon (*Salmo salar*) using microsatellites. **Can. J. Fish. Aquat. Sci.** 54: 2434-2442.
- GAGGIOTTI, O. E.; LANGE, O.; RASSMANN, K. & GLIDDONS, C. 1999. A comparison of two indirect methods for estimating average levels of gene flow using microsatellite data. **Mol. Ecol.**, 8: 1513-1520.

- GOUDET, G. J. 2002. FSTAT, a program for windows to estimate and test gene diversities and fixation índices (version 2.9.3.2). Disponível em: <http://www.unil.ch/izea/software/fstat.html>
- GOULDING, M. 1980. The fishes and the forest: Exploitations in Amazonian Natural History. University of California Press. Berkeley. 250p
- HAUSER, L.; ADCOCK, G. J.; SMITH, P. J.; RAMIREZ, B. & CARVALHO, G. R. 2002. Loss of microsatellite diversity and low effective population size in an overexploited population of New Zealand snapper (*Pagrus auratus*). **Proc. Nat. Acad. Sci** 99(18): 11742-11747.
- HAMOY, I. G. 2006. Elevado fluxo gênico e variabilidade genética em populações naturais de *Arapaima gigas* do baixo Amazonas caracterizados por microssatélites. Dissertação de Mestrado – Pós Graduação em Genética e Biologia Molecular (UFPA) 87p
- HAMOY, I. G.; SANTOS, E. J. M. & SANTOS, S. E. B. 2008. Rapid and inexpensive analysis of genetic variability in *Arapaima gigas* by PCR multiplex panel of eight microsatellites. **Genet. Mol. Res.** 7(1): 29-32.
- HARTL, F. L. & CLARK, A. G. 1997. Principle of population genetics. 3a. edition. Sinauer Association, Massachusetts. 543 pp.
- HENDERSON, P. A. 1999. O ambiente aquático na Reserva Mamirauá. In: Estratégias para Manejo de Recursos Pesqueiros de Mamirauá. Eds: Queiroz, H. L. & Crampton, W. G. R. Soc. Civil Mamirauá, CNPq Brasília, p.1-9.

- HRBEK, T. & FARIAS, I. P. 2008. Complete mitochondrial genome of the pirarucu (*Arapaima gigas*, Arapaimidae, Osteoglossiformes). **Genet. Mol. Biol.** 31(1 suppl): 293-302.
- HRBEK, T.; FARIAS, I. P.; CROSSA, M.; SAMPAIO, I.; PORTO, J. I. R. & MEYER, A. 2005. Population genetics analysis of *Arapaima gigas*, on the largest freshwater fishes of the Amazon basin: implications for its conservation. **Anim. Cons.** 8:297-308.
- HRBEK, T.; CROSSA, M. & FARIAS, I. P. 2007. Conservation strategies for *Arapaima gigas* (Schinz, 1822) and the Amazonian várzea ecosystem. **Bras. J. Biol.**, 67 (4, suppl.): 909-917.
- IDSMA, 2008. Manejo comunitário de pirarucus (*Arapaima gigas*) no Jarauá, Tijuaca e Maraã (Reserva de Desenvolvimento Sustentável Mamirauá) e setor Coraci (Reserva de Desenvolvimento Sustentável Amanã). Relatório técnico. Programa de Manejo de Pesca. 38pp.
- IMBIRIBA, E. P.; JÚNIOR, J. B. L. & DUTRA, S. 1994. Rendimento da carne de pirarucu *Arapaima gigas* (Cuvier). EMBRAPA, **Bol. Pesq.** 150. 21p
- IMBIRIBA, E. P. 2001. Potencial da criação de pirarucu, *Arapaima gigas*, em cativeiro. **Acta Amazônica**, 31 (2): 299-316.
- LI, G; HUBERT, S.; RIBES, V & HEDGECOCK, D. 2003. Characterization of 79 microsatellite markers in the pacific oyster (*Crassostrea gigas*). **Mol. Ecol. Notes.** 3 (2):228-232.

- LOPES, K. S. 2005. Ecologia reprodutiva e subsídios para o manejo da reprodução de pirarucus, *Arapaima gigas* Cuvier, 1817. Dissertação de Mestrado. Pós graduação em Ciência Animal (UFPA). 85p.
- LORENZEN, D.; ARCTANDER, P. & SIEGISMUND, H. R. 2008. High variation and very low differentiation in wide ranging plain zebra (*Equus quagga*): insights from mtDNA and microsatellites. **Mol. Ecol.** 17: 2812-2824.
- LOWE-McCONNELL, R. H. 1987. Ecological studies in tropical fish communities. Cambridge University Press. Cambridge 383pp.
- MARQUES, D. K. S. 2003. Caracterização genética do pirarucu *Arapaima gigas* (Cuvier) (Teleostei, Osteoglossidae) da bacia Tocantins-Araguaia, Estado do Mato Grosso. Tese de doutorado. Pós-Graduação em Genética e Evolução (UFSCar). 80pp.
- MARQUES, D. K.; VENERE, P. C. & GALETTI-JÚNIOR, P. M. 2006. Chromosomal characterization of the bonytongue *Arapaima gigas* (Osteoglossiformes: Arapaimidae). **Neotrop. Ichthyol.** 4(2): 215-218.
- MAMIRAUÁ, S.C. 1996. Mamirauá: Plano de manejo (síntese). Sociedade Civil Mamirauá (SCM), CNPq,/MCT, IPAAM. Manaus, AM. 96p
- MARTINELLI, N. M. C. & PETRERE Jr, M. 1999. Morphometric relationships and indirect determination of the length frequency structure of the pirarucu, *Arapaima gigas* (Cuvier), in Brazilian Amazonia. **Fish. Manag. Ecol.**, 5, 233-240.

- McCUSKER, M. R.; PATERSON, I. G. & BENTZEN, P. 2008. Microsatellite markers discriminate three species of North Atlantic wolffishes (*Anarhichas* spp). **J. Fish Biol.** 72: 375-385.
- MENEZES, R. S. 1951. Notas biológicas e econômicas sobre o pirarucu *Arapaima gigas* (Cuvier) (Actinopterygii, Arapaimidae). Serviço de Informação Agrícola – Ministério da Agricultura. Serie estudos técnicos vol.3. 152pp.
- MILLER, M. P. 2005. Alleles In Space: Computer software for the joint analysis of interindividual spatial and genetic information. **J. Hered.** 96: 722-724
- MORGAN, M. J.; HUNTER, D. PIETSCH, R.; OSBORNE, W. & KEOGH, J. S. 2008. Assessment of genetic diversity in the critically endangered Australian corroboree frogs, *Pseudophryne corroboree* and *Pseudophryne pengilleyi*, identifies four evolutionarily significant units for conservation. **Mol. Ecol.** 17: 3448-3463.
- NORRIS, A. T.; BRADLEY, D. G. & CUNNINGHAM, E. P. 1999. Microsatellite genetic variation between and within farmed and wild Atlantic salmon (*Salmo solar*) populations. **Aquaculture** 180: 247-264.
- NELSON, J.S. 1994. Fishes of the world. 3^a ed. John Wiley & Sons, Inc. New York, NY. 600p.
- NEVES, A. M. B. 1995. Conhecimento atual sobre o pirarucu, *Arapaima gigas* (Cuvier, 1817). **Bol Mus. Para. Emilio Goeldi.** (Ser. Zool.) 11(1). 56pp

- NGUYEN, T. T. T. 2008. Population structure in the highly fragmented range of *Tor douronensis* (Cyprinidae) in Sarawak, Malaysia revealed by microsatellite DNA markers. **Freshw. Biol.**, 53: 924-934.
- NEY, M. & LI, W. 1973. Linkage disequilibrium in subdivided populations. **Genetics** 75: 213-219.
- O'CONNELL, M & WRIGHT, J. M. 1997. Microsatellite DNA in fishes. **Rev. Fish Biol. Fish**, 7:331-363.
- OHTA, T. 1982. Linkage disequilibrium due to random genetic drift in finite subdivided populations. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**. 79:1940-1944.
- OLIVEIRA, E. J.; PÁDUA, J. G.; ZUCCHI, M. I.; VENCovsky, R. & VIEIRA, M. L. C. 2006. Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. **Genet. Mol. Biol.** 29 (2): 294-307.
- PEREZ-ENRIQUEZ, R.; TAKAGI, M. TANIGUCHI, N. 1999. Genetic variability and pedigree tracing of a hatchery reared sock of red sea bream (*Pagrus major*) used for stock enhancement, based on microsatellite DNA marker. **Aquaculture** 173:413-423.
- PETIT, R. J.; MOUSADIK, A. E. L. & PONS O. 1998. Identifying populations for conservation on the basis of genetic markers. **Cons. Biol.** 12(4): 844-855.
- PIRY S, ALAPETITE A, CORNUET, J. M., PAETKAU, D; BAUDOUIN, L.; ESTOUP, A. 2004 GeneClass2: A Software for Genetic Assignment and First-Generation Migrant Detection. **J. Hered.** 95:536-539.

- PRITCHARD, J. K.; STEPHENS, M. & DONNELLY, P. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. **Genetics** 155: 945-959.
- PRITCHARD, J. K.; WEN, X. & FALUSH, D. 2007. Documentation for structure software: version 2.2. Disponível em <http://pritch.bsd.uchicago.edu/software>.
- QUEIROZ, H. L. 1999. A pesca, as pescarias e os pescadores de Mamirauá. In: Estratégias para Manejo de Recursos Pesqueiros de Mamirauá. Eds: Queiroz, H. L. & Crampton, W. G. R. Soc. Civil Mamirauá, CNPq Brasília, p.37-71.
- QUEIROZ, H. L. 2000. Natural history and conservation of pirarucu, *Arapaima gigas*, at the Amazonian Várzea: Red giants in muddy waters. Tese de doutorado Post graduate Philosophy (University St. Andrews). 226p.
- QUEIROZ, H. L. & SARDINHA, A. D. 1999. A preservação e o uso sustentado dos pirarucus em Mamirauá. In: Estratégias para Manejo de Recursos Pesqueiros de Mamirauá. Eds: Queiroz, H. L. & Crampton, W. G. R. Soc. Civil Mamirauá, CNPq Brasília, p.108-141.
- RAYMOND M; ROUSSET, F. 1995. Genepop (version 1.2): population software for exact tests and ecumenicism. **J. Hered.** 86: 248-249.
- SANTOS, E. J. M. 1999. Statistical approaches and methods in population genetics using microsatellites. In: Joerg Thomas Epplen; Thomas Lubjuhn. (Org.). DNA profiling and DNA fingerprinting. Basel: Birkhaeuser. 215-228.

- SALGUEIRO, P., CARVALHO, G., COLLARES-PEREIRA, M.J. & COELHO, M.M. 2003. Microsatellite analysis of genetic population structure of the endangered cyprinid *Anaecypris hispanica* in Portugal: implications for conservation. **Biol. Conserv.** 109: 47-56.
- SAMBROOK, J., FRITSCH, E. F. & MANIATIS, T. 1989. Molecular Cloning. A Laboratory Manual. Second edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- SAWAYA, P. 1946. Sobre a biologia de algumas espécies de peixes de respiração aérea (*Lepidosiren paradoxa*, Fitz. e *Arapaima gigas* Cuv.) **Bol. Facul. Filos. Cien. Let. USP, Zoologia**, 11: 255-286.
- SELKOE, K. A. & TOONEN, R. J. 2006. Microsatellites for ecologists: a practical guide to using and evaluating microsatellite markers. **Ecol. Let.** 9: 615-629.
- SOUZA, J. O. 2006. Caracterização molecular de pirarucus (*Arapaima gigas*, Cuvier, 1829) de Tucuruí utilizando marcadores microssatélites. Trabalho de Conclusão de Curso. Ciências Biológicas, Campus de Bragança (UFPA), 30p.
- VAN OOSTERHOUT C.; HUTCHINSON, W. F.; WILLS, D. P. M. & SHIPLEY, P. 2004. MICROCHECKER: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. **Mol. Ecol. Notes** 4: 535–538
- VERISSIMO, J. 1895. A pesca na Amazônia. Monographias Brasileiras III. Livraria Classica Alves & Cia. Rio de Janeiro.

- VIANA, J. P.. ; CASTELLO, L.; DAMASCENO, J. M. B.; AMARAL, E. S. R.; ESTUPIÑAN, G. M. B.; ARANTES, C. C.; BATISTA, G. S.; GARCEZ, D. S. & PEREIRA, S. B. 2007. Manejo de pirarucus (*Arapaima gigas*) na Reserva de Desenvolvimento Sustentável Mamirauá, in: *Áreas Aquáticas Protegidas como Instrumento de Gestão Pesqueira*, Série Áreas Protegidas do Brasil, MMA (Org.), Brasília/DF, vol 4, p.239-261.
- WRIGHT, S. 1921. Systems of mating. **Genetics** 6: 111-178.
- WRIGHT, S. 1978. Evolution and the genetics of population. Vol 4. Variability within and among natural populations. University of Chicago Press, Chicago.
- WATANABE, L. A. 2007. Caracterização genética de pirarucus (*Arapaima gigas*, Cuvier, 1829) da Reserva de Desenvolvimento Sustentável Mamirauá utilizando marcadores microssatélites. Trabalho de Conclusão de Curso, Ciências Biológicas - Campus de Bragança (UFPA) 50pp.
- ZANE, L.; BARGELLONI, L. & PATARNELLO, T. 2002. Strategies for microsatellite isolation: a review. **Mol. Ecol.** 11:1-16.