



**Programa de Pós-Graduação *Latu sensu***

**Especialização em Gestão Ambiental**

*Campus Nilópolis*

Vanessa Gomes Santos

UTILIZAÇÃO DE MARCADORES MOLECULARES COMO FERRAMENTA PARA A  
CONSERVAÇÃO E GESTÃO DE RECURSOS PESQUEIROS

Nilópolis-RJ

2013

Vanessa Gomes Santos

Utilização de marcadores moleculares como ferramenta para a conservação e gestão de recursos pesqueiros

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Programa de Pós-Graduação Lato sensu em Gestão Ambiental do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro como parte dos requisitos para obtenção do grau de especialista em Gestão Ambiental.

Orientador: Prof. Dr. João José Fonseca Leal

Co-orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ana Rosa Linde Arias

Nilópolis-RJ

2013

Programa de Pós-Graduação *Latu sensu* em Gestão Ambiental

Utilização de marcadores moleculares como ferramenta para a conservação e gestão de recursos pesqueiros

Vanessa Gomes Santos

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Programa de Pós-Graduação *Latu sensu* em Gestão Ambiental do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro como parte dos requisitos para obtenção do grau de especialista em Gestão Ambiental.

Aprovada em 11 de abril de 2013

Banca examinadora

  
Dr. João José Fonseca Leal – Presidente da banca

Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro

  
Msc. Rafael Alencar Bandeira e Silva

Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro

  
Msc. Mariana Petri da Silva

Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro

## DEDICATÓRIA

Ao meu marido pelo apoio e força.

## AGRADECIMENTO

Inicialmente gostaria de agradecer a Deus pela força que tem me dado para que eu conquiste os meus objetivos e pelas pessoas que coloca em meu caminho.

Não poderia deixar de agradecer às razões da minha existência, meus pais Luiza e Joaquim, vocês são os meus maiores exemplos. Muito obrigada pelo incentivo e por sempre estarem dispostos a me ajudar e a dar a bronca necessária.

Ao meu marido, Jocelito, por estar ao meu lado a todo o momento, me incentivar a participar do programa de pós-graduação em gestão ambiental, por me ligar durante o dia para saber sobre o andamento da escrita, por às vezes acreditar mais em mim do que eu mesma e por aceitar dividir a vida comigo.

Aos meus irmãos e irmãs, sobrinhos e sobrinhas, tios e tias, avós e avôs (presentes neste mundo ou não) pelo apoio durante a minha jornada e por ajudarem na construção do que sou.

À família que escolhi para mim, minhas amigas Larissa Tebaldi, Rosane Nunes e Rychelle Medeiros, sempre posso contar com vocês para desabafar, rir, chorar e me desesperar.

Ao prof. João José por ter me orientado nesta etapa tão importante e a todos os outros professores do programa por participarem da minha formação;

À Ana Rosa Linde Arias, minha orientadora para toda a vida, sem você eu não teria tido a incrível experiência na Espanha;

A todos os colaboradores da UNIOVI, em especial a Alba Ardura por ter me acolhido no laboratório e na sua casa, deixando que eu fizesse parte da sua família, prof<sup>a</sup>. Eva Garcia por acreditar em mim, Ivan Pola e a Laura Miralles por tornarem a minha estadia no laboratório mais divertida e aos queridos Ione Ginuino, Gema Adan e Eduardo del Rosal pela colaboração nas coletas.

Aos queridos amigos de pós, Antônia Carolina, Antônio Carlos Lima Rocha, Viviane Perdomo e Vanessa Moreira por todos os momentos de descontração e desabafo. Sem vocês teria sido impossível ir à Nilópolis duas vezes por semana;

E a todos aqueles que de alguma forma somaram para tornar o meu dia mais agradável, seja com um bom dia ou com um sorriso.

Todos têm o direito ao meio ambiente ecologicamente equilibrado, bem de uso comum do povo e essencial à sadia qualidade de vida, impondo-se ao poder público e à coletividade o dever de defendê-lo e preservá-lo para as presentes e futuras gerações.

Art. 225 da Constituição da República Federativa do Brasil

GOMES, Vanessa Santos. Utilização de marcadores moleculares como ferramenta para a conservação e gestão de recursos pesqueiros. 48p. Trabalho de conclusão de curso. Programa de Pós-Graduação *Latu sensu* em Gestão Ambiental, Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro (IFRJ), Campus Nilópolis, Nilópolis, RJ, 2013.

## RESUMO

As atividades humanas estão causando mudanças ecológicas e ambientais nos ecossistemas aquáticos, contribuindo para a diminuição da biodiversidade e a perda de recursos que possuem fins sociais e comerciais. Para a realização de estratégias de gestão que direcionem a exploração sustentável dos recursos pesqueiros são necessárias ferramentas capazes de identificar os estoques. Os dados genéticos podem definir a escala espacial na qual as populações de peixes estão distribuídas e, por isso, os marcadores moleculares surgem como uma possível ferramenta na identificação de espécies e populações, na determinação das áreas a serem exploradas e no planejamento do manejo dos estoques. Este trabalho tem por finalidade a avaliação dos marcadores moleculares como ferramentas a serem utilizadas para o recolhimento das informações genéticas em populações de peixes, principalmente as exploradas economicamente, com fins conservacionistas e de gestão. As informações fornecidas pelos marcadores moleculares são de grande importância para a conservação da biodiversidade, direcionando as estratégias de gestão pesqueira, juntamente com dados biológicos e de ecologia trófica das espécies, fornecendo subsídios para o manejo dos recursos pesqueiros.

Palavras-chave: Gestão ambiental, marcadores moleculares, recursos pesqueiros.

GOMES, Vanessa Santos. Utilização de marcadores moleculares como ferramenta para a conservação e gestão de recursos pesqueiros. 48p. Trabalho de conclusão de curso. Programa de Pós-Graduação *Latu sensu* em Gestão Ambiental, Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro (IFRJ), Campus Nilópolis, Nilópolis, RJ, 2013.

### **ABSTRACT**

Human activities are causing environmental and ecological changes in aquatic ecosystems, contributing to biodiversity loss and resources loss with value social and commercial. Thus, to perform management strategies that address the sustainable exploitation of fishery resources are necessary tools to identify stocks. As genetic data can define the spatial scale at which fish populations are distributed, molecular biology emerged as a possible tool in the identification of species and populations, in determining the areas to be explored in the planning and management of stocks. Genetic data may define the spatial scale at which fish populations are distributed and, therefore, molecular markers appear as a possible tool for the identification of species and populations, in determining the areas to be explored and management planning of stocks. This study aims to evaluate the molecular markers as tools to be used for the collection of genetic information in populations of fish, especially the economically exploited for purposes of conservation and management. The information provided by molecular markers are of great importance for biodiversity conservation, directing strategies for fisheries management, along with biological data and trophic ecology of the species, supporting the management of fishery resources.

Key-words: Environmental management, molecular markers, fisheries resources.



## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Evolução histórica do volume de pesca extrativa marinha e continental no Brasil, no período de 1960 a 2007. ....	15
Figura 2: Situação de uso, pela pesca, da biodiversidade aquática no mundo. ....	18
Figura 3: Representação esquemática das funções e responsabilidades de uma autoridade de gestão pesqueira.....	19
Figura 4: A Biologia da Conservação.....	21
Figura 5: Bacia Amazônica - os círculos demarcam as zonas de coleta. ....	27
Figura 6: Curimatã - <i>Prochilodus nigricans</i> .....	28
Figura 7: Tambaqui - <i>Colossoma macropomum</i> .....	29
Figura 8: Rede de haplótipos mostrando as relações entre os 11 haplótipos de <i>P. nigricans</i> (7a) e os 12 haplótipos <i>C. macropomum</i> (7b) definidos pela variação na sequência de COI..	36

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Número de amostras analisadas para cada espécie nos sítios de coleta ao longo da Bacia Amazônica.....	30
Tabela 2: Haplótipos encontrados em <i>P. nigricans</i> e <i>C. macropomum</i> nos sítios de amostragem.....	34
Tabela 3: $F_s$ = Teste de neutralidade seletiva $F_u$ 's; $D$ = Teste de neutralidade seletiva Tajima's; $r$ = índice de <i>Raggedness</i> , valores de <i>Raggedness</i> não significativos sugerem expansão; $R_2$ = Test $R_2$ . Nível de significância: sem asterístico, não significativo. * $p < 0.05$ ; ** $p < 0.01$ ; *** $p < 0.001$ .....	35
Tabela 4: Teste para a diferença entre as populações baseado nas distâncias genéticas ( $F_{ST}$ ) com as sequências de COI para <i>P. nigricans</i> e <i>C. macropomum</i> . Os níveis de significância de $F_{ST}$ são indicados como: * $p < 0.05$ ; ** $p < 0.01$ ; *** $p < 0.001$ ; sem asterístico, não significativo.	35

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AFLP	Polimorfismo de Comprimento de Fragmentos Amplificados
COI	Citocromo <i>c</i> Oxidase I
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DNA <sub>m</sub>	Ácido desoxirribonucleico mitocondrial
DNA <sub>n</sub>	Ácido desoxirribonucleico nuclear
DPA	Departamento de Pesca e Aquicultura
FAO	Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura
F <sub>st</sub>	Índice de Fixação
GESPE	Grupo Executivo do Setor Pesqueiro
IBAMA	Instituto Brasileiro de Meio Ambiente
IUCN	União Mundial para a Conservação
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MMA	Ministério do Meio Ambiente
MPA	Ministério de Pesca e Aquicultura
PCR	Reação Cadeia Polimerase
RAPD	Polimorfismo de DNA Amplificado ao acaso
RFLP	Polimorfismo de Comprimento de Fragmentos de Restrição
SEAP	Secretaria Especial de Agricultura e Pesca
SUDEPE	Superintendência do Desenvolvimento da Pesca

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	13
2. GESTÃO DOS RECURSOS PESQUEIROS .....	14
2.1 A PESCA NO BRASIL .....	14
2.1.2 Recursos pesqueiros de água doce.....	15
2.1.3 Efeitos e Impactos do homem na pesca.....	16
2.1.4 Estratégias de gestão pesqueira .....	18
2.1.5 Biologia da conservação .....	20
2.1.5.1 Conservação genética.....	22
2.1.6 Marcadores moleculares utilizados com fins de conservação e gestão de recursos pesqueiros.....	23
3. ESTUDO DE CASO.....	26
3.1 INTRODUÇÃO.....	26
3.2 METODOLOGIA.....	27
3.2.2 Área de coleta .....	27
3.2.3 Espécies estudadas .....	28
3.2.4 Extração do DNA e análise genética.....	30
3.2.5 Sequenciamento e edição das sequências.....	31
3.2.6 Análise dos dados .....	31
3.3 RESULTADOS.....	32
3.3.2 Curimatã ( <i>Prochilodus nigricans</i> ).....	32
3.3.3 Tambaqui ( <i>Colossoma macropomum</i> ).....	33
3.4 DISCUSSÃO .....	37
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	40
REFERÊNCIAS .....	42

## 1. INTRODUÇÃO

As atividades humanas, por uma variedade de mecanismos, estão causando mudanças ecológicas e ambientais de significância global, contribuindo para a diminuição da biodiversidade (PRIMACK e RODRIGUES, 2001). Essas alterações podem ter consequências para os ecossistemas, e para os potenciais serviços oferecidos por estes à população. Os recursos pesqueiros têm sido fontes de proteína animal para a alimentação desde a antiguidade, tornando-se, em algumas regiões, a principal atividade social e econômica (DIAS NETO, 2010a). Segundo a Organização das Nações Unidas para a alimentação e Agricultura - FAO (2012a), a gestão racional dos recursos pesqueiros é indispensável para uma exploração adequada, garantindo sua conservação.

Considerando a enorme diversidade dos ambientes aquáticos, é necessária a implantação de instrumentos que direcionem as ações de gestão e conservação. Neste contexto, a biologia molecular pode atuar na identificação de espécies e populações, na determinação das áreas a serem exploradas e no planejamento do manejo dos estoques cultivados em piscicultura. Os dados genéticos podem definir a escala espacial na qual as populações de peixes serão monitoradas e geridas com propósitos de uso sustentável (MARQUES, 2002; SALGUEIRO *et al.*, 2003).

O trabalho está dividido em duas partes. Na primeira buscaremos analisar o lado teórico da questão, relacionando a problemática da gestão dos recursos pesqueiros no Brasil e como a biologia da conservação e as técnicas de biologia molecular podem ser utilizadas como ferramentas úteis para conservação e exploração dos estoques pesqueiros. Na segunda parte faremos um breve estudo de caso, onde avaliaremos a utilização de um marcador molecular e seu uso potencial na gestão dos recursos pesqueiros na região Amazônica.

## 2. GESTÃO DOS RECURSOS PESQUEIROS

### 2.1 A PESCA NO BRASIL

O Brasil possui grande potencial para a pesca. É um país costeiro, com ampla plataforma continental (com cerca de 8000 Km) e que possui doze regiões hidrográficas, lagos e reservatórios. Possuímos 8% das reservas mundiais de água potável, concentrando 18% do potencial de água de superfície do planeta (MAIA NETO, 1997). Essas características tornaram a pesca um importante meio de subsistência para as populações litorâneas. Até 1960, o esforço pesqueiro foi predominantemente artesanal e com o intuito de atender o mercado interno, a partir dessa data inicia-se a pesca industrial (GIULIETTI e ASSUMPÇÃO, 1995).

A produção pesqueira brasileira ao longo dos anos teve grande impacto dos planos de governo (DIAS NETO, 2010b).

A fase SUDEPE, de 1960 a 1989, é marcada pela criação da Superintendência do Desenvolvimento da Pesca – SUDEPE em 1962 e finaliza em 1989 quando ocorre sua extinção. Esse período é marcado pela promulgação do Decreto-Lei N° 221/67 em 1967, considerado o Código de Pesca, sua importância está relacionada ao fato de ter industrializado o setor, incluindo-a como atividade importante ao desenvolvimento do país e como tal possibilitando deduções tributárias para os investimentos na área, nos chamados “incentivos fiscais da pesca” (GIULIETTI e ASSUMPÇÃO, 1995). Esse período foi marcado pelo crescimento acentuado na captura, com a maior produção sendo atingida em 1985 (BRASIL, 2012).

O modelo adotado pela SUDEPE não obteve êxito, principalmente pelo uso inadequado de incentivos fiscais e creditícios, o pouco apoio à pesca artesanal ou de pequena escala e os escândalos de corrupção, levando ao uso inadequado dos principais recursos pesqueiros, gerando a sobrepesca (DIAS NETO, 2010b).

O Instituto Brasileiro de Meio Ambiente (IBAMA), criado em 1989, recebeu a incumbência de gerenciar a produção pesqueira no Brasil que se encontrava em crise, com uma situação de sobrepesca aguda e falta de incentivos fiscais e de crédito. Foi criado o Grupo Executivo do Setor Pesqueiro – GESPE, vinculado à Câmara de Política dos Recursos Naturais, do Conselho de Governo e secretariado pelo então Ministério da Marinha, como forma de atender aos saudosistas do modelo SUDEPE e o Departamento de Pesca e Aquicultura – DPA, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA. As atitudes do IBAMA, privilegiando ações concretas visando à recuperação dos recursos

pesqueiros em situação de sobrepesca ou ameaçados de exaustão, conseguiram reverter a queda na produção, além de recuperar parte dos estoques (DIAS NETO, 2010b).

De 1990 até o ano 2000, a produção pesqueira ficou caracterizada por um período de estabilidade. A partir do ano 2000, a produção voltou a crescer, principalmente pela recuperação de alguns estoques. A SEAP (Secretaria Especial de Agricultura e Pesca) hoje MPA (Ministério de Pesca e Aquicultura), criada em 2003, em conjunto com Ministério do Meio Ambiente (MMA) promoveram políticas públicas de gestão compartilhada que reforçaram o setor pesqueiro, alavancando a produção pesqueira no país (BRASIL, 2012).

Segundo BRASIL (2012), o Brasil produziu 1.240.813 t de pescado em 2009, somando pesca extrativa (marinha e continental) e aquicultura, que representou 0,86% da produção mundial, ocupando assim o 18º lugar no ranking geral dos produtores de pescado do mundo. Em comparação aos outros países da América do Sul, no mesmo período, o Brasil só foi ultrapassado pelo Peru e Chile, devido à grande produção do Oceano Pacífico, ocupando o terceiro lugar.

A evolução histórica do volume de pesca no Brasil pode ser observada na figura 1.

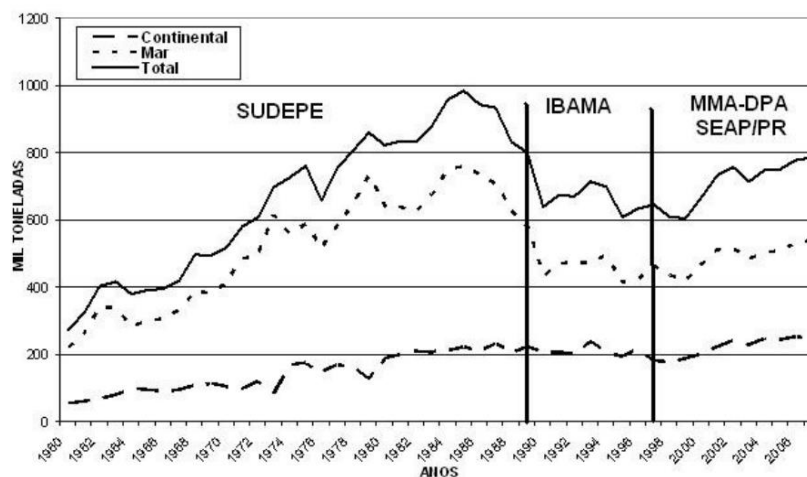


Figura 1: Evolução histórica do volume de pesca extrativa marinha e continental no Brasil, no período de 1960 a 2007 (Retirado de DIAS NETO, 2010b).

### 2.1.2 Recursos pesqueiros de água doce

Os rios, lagos, reservatórios, pântanos, áreas alagadas, entre outros, constituem o que é chamado de "águas interiores" ou "águas continentais" (FAO, 2012b). Essas águas possuem múltiplos usos, como abastecimento doméstico e industrial, construção de barragens,

mineração, sistemas de irrigação para a agricultura, além da pesca e aquicultura (COWX, 2010).

Os ecossistemas de água doce representam apenas 0,01% da água do mundo e cerca de 0,8% da superfície da Terra. Apesar disso, esta pequena fração hídrica é de grande importância por desempenhar um papel crítico no ciclo da água, no fluxo de minerais e nutrientes e, ainda, suportar pelo menos 100.000 espécies de cerca de 1,8 milhões - quase 6% de todas as espécies descritas no mundo (DUDGEON *et al.*, 2006).

Em relação aos peixes, mais de 10.000 espécies vivem em água doce, esse número representa, aproximadamente, 40% da diversidade mundial de peixes e um quarto de diversidade dos vertebrados global (LUNDBERG *et al.*, 2000).

O Brasil lidera o número de peixes de água doce, em relação ao resto do mundo, possuindo 2.122 espécies catalogadas (cerca de 21% do total), com um elevado grau de endemismos. O número de espécies nos ecossistemas aquáticos continentais é impreciso e difícil de ser estimado. As causas são variadas, desde bacias hidrográficas não inventariadas, poucos pesquisadores dedicados aos estudos de levantamento da biodiversidade, baixa infraestrutura para as amostragens, entre outros (AGOSTINHO *et al.*, 2005). As informações sobre as relações filogenéticas dos peixes, seus hábitos de reprodução, alimentação e crescimento, com a descrição taxonômica e estudos sobre ciclo de vida são limitados às espécies de maior porte e importância comercial (GEOBRASIL, 2002).

Grande parte dos recursos obtidos das águas continentais é utilizada na subsistência e/ou comercializado nos mercados locais. Recentemente, têm aumentado o comércio internacional desses produtos, por possuírem um elevado valor de mercado (FAO, 2003; FAO, 2012a). Em 2010 a produção extrativa continental do Brasil alcançou 248.911 t, 3,9% de aumento em relação ao ano anterior. A região que lidera esse cenário é a Norte, responsável por 55,7% do volume total da pesca (BRASIL, 2012).

### **2.1.3 Efeitos e Impactos do homem na pesca**

A pesca é uma atividade antrópica direcionada pela captura de um recurso biótico, renovável e limitado. Para o uso sustentável desse recurso é necessário que se considere os limites à redução no tamanho das populações de peixes, tanto pela ação da pesca propriamente dita quanto pelas ações natural e antrópica, caso esses limites sejam ultrapassados os estoques podem entrar em colapso (PENHA, 2003).



As populações humanas se fixam, tradicionalmente, nas proximidades dos ecossistemas aquáticos, tornando esses recursos e ecossistemas os mais ameaçados do mundo. Como exemplo, temos o declínio dos estoques pesqueiros em muitos locais (GEOBRASIL, 2002). Muitos fatores contribuem para a diminuição das populações e extinção de espécies, sendo difícil identificar apenas uma causa. Os principais fatores responsáveis pela ameaça aos ecossistemas aquáticos são perda e degradação de habitats, introdução de espécies exóticas, extinções secundárias, poluição química e física, mudanças climáticas e superexploração (ALLAN e FLECKER, 1993; LÉVÊQUE *et al.*, 2008).

A construção de barragens é um exemplo de modificação de habitats. Enquanto as barragens podem servir de estoque para algumas espécies de peixes, elas afetam o ciclo de vida das espécies migratórias (MAITLAND, 1995). Ao implantar projetos de grande porte, como a construção de represas, empreendimentos agrícolas ou de mineração são necessários estudos de avaliação de impacto ambiental a médio e longo prazo, que verifiquem as consequências desses empreendimentos nos recursos pesqueiros, de maneira a determinar as mudanças sociais e biológicas dos projetos em desenvolvimento (FAO, 2003).

A introdução de espécies é uma das grandes ameaças à biodiversidade do planeta, podendo ser considerada um dos principais problemas para conservação de peixes de água doce. As espécies de peixes introduzidas podem causar alterações no hábitat, como o revolvimento do fundo e alterações de transparência, na estrutura da comunidade, alterações tróficas e introdução de doenças e parasitas. Podendo culminar na extinção de espécies nativas e na perda da biodiversidade com a homogeneização da biota (VITULE, 2009).

Outro ponto importante a ser considerado nos casos de translocações de organismos e modificação de habitats é a possibilidade de hibridação. Esta pode contribuir para a extinção de muitas espécies através de meios diretos e indiretos. Apesar de o processo normal atuar na evolução e na variabilidade dos organismos, seu aumento por causas antropogênicas pode gerar grandes impactos como a exclusão das entidades genéticas nativas (ALLENDORF *et al.*, 2001).

As extinções secundárias ocorrem quando a retirada de uma espécie provoca o efeito em cascata em outras espécies relacionadas dentro da teia alimentar (BELLINGERI e BODINI, 2013).

A poluição é uma das ameaças mais visíveis à saúde ambiental dos ecossistemas aquáticos e sobrevivência da biota. A entrada de matéria orgânica gera a diminuição de oxigênio dissolvido que pode ser observada em grandes eventos de mortandade de peixes. Além da poluição por metais e poluentes orgânicos persistentes que impossibilita o consumo

desse recurso pelo homem, se mostrando um ponto importante a ser gerenciado para o uso sustentável dos recursos pesqueiros (ALLAN e FLECKER, 1993).

Os efeitos das mudanças climáticas na pesca em águas continentais são variados, desde a redução no tamanho, diversidade geográfica e biológica das populações quanto por mudanças na precipitação e ciclo da água. (BRANDER, 2007).

Os recursos pesqueiros encontram-se em exploração máxima, sobreexplotados, esgotados, ou em recuperação de colapso (Figura 2). Existem estudos que mostram que a superexploração pode gerar um processo de substituição de espécies de grande porte, longos ciclos de vida e de valor econômico elevado por outras de crescimento rápido, pequeno porte e menos desejáveis economicamente (DIAS NETO, 2010b).

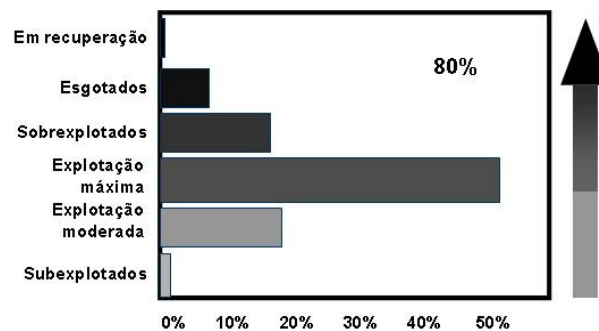


Figura 2: Situação de uso, pela pesca, da biodiversidade aquática no mundo (Retirado de DIAS NETO, 2010b).

A manutenção de um estoque pesqueiro saudável e bem gerenciado é uma das formas de garantir a produção e consumo sustentáveis.

#### 2.1.4 Estratégias de gestão pesqueira

O Brasil apresenta avanços recentes em sua legislação pesqueira, principalmente no que tange a gestão pesqueira compartilhada. O Plano Nacional de Gerenciamento Costeiro (Lei nº 7.661, de 1988), o Sistema Nacional de Unidades de Conservação (Lei nº 9985, de 2000) e o Código da Pesca (Lei nº 11.959, de 2009) são exemplos de políticas públicas brasileiras que estabelecem a necessidade da participação das comunidades locais nas tomadas de decisão, assim como da legitimação das práticas tradicionais de manejo dos recursos (KALIKOSKI et al., 2009).

Segundo a FAO (2002) o processo de gestão pesqueira pode ser descrito como um sistema integrado de recolhimento de informações, análise, planejamento, consulta, tomada de

decisão, alocação de recursos, formulação e implementação de estratégias, com a aplicação, se necessário, de regulamentos ou regras que regem as atividades de pesca. A finalidade do processo é garantir a produtividade contínua dos recursos. Assim, a gestão pesqueira envolve um conjunto complexo e amplo de tarefas (Figura 3).

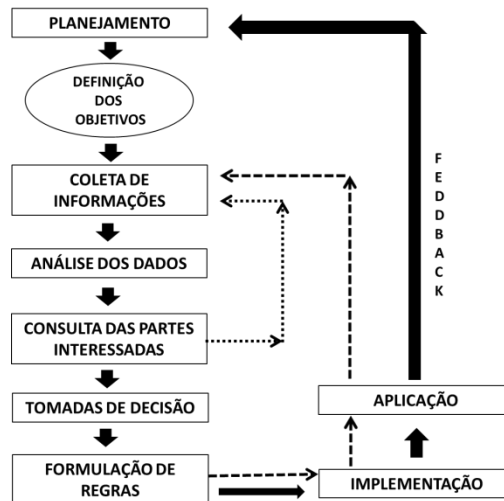


Figura 3: Representação esquemática das funções e responsabilidades de uma autoridade de gestão pesqueira (Adaptado de FAO, 2002).

O processo organizado e contínuo de avaliação de uso dos recursos pesqueiros no Brasil teve início em meados da década de 70 (BRASIL, 2006). A gestão dos recursos é essencial para a sua conservação e sustentabilidade. Para sua efetividade são necessárias as participações de várias esferas do governo e da sociedade civil. Os pescadores devem atuar dentro das normas ambientais e os infratores que violam as leis ou regulamentos devem ser responsabilizados (FAO, 2003).

Em muitos casos, a responsabilidade sobre os recursos pesqueiros apresenta entraves relacionados às fronteiras, pois os rios e lagos podem atravessar fronteiras municipais, estaduais ou nacionais. Fazendo com que populações de peixes migratórios desapareçam em regiões situadas a jusante, quando existem intervenções a montante ou a construção de represas impede o movimento dos animais nos rios. Assim, pode existir a necessidade de acordos entre governos para a gestão efetiva dos recursos (FAO, 2003).

A gestão pesqueira atual está baseada na visão ecossistêmica, em detrimento das abordagens anteriores que estavam relacionadas às populações individualmente (MOULTON e SOUZA, 2006). Os princípios do código de conduta da FAO (1995) para a pesca sustentável, do qual o Brasil é signatário, incluiu o conceito de que, a incorporação de

considerações ambientais implica em uma conservação mais eficaz do ecossistema e do seu uso sustentável.

Uma solução interessante são os estudos e gestão baseados em bacias hidrográficas. A gestão de recursos hídricos baseada no recorte territorial das bacias ganhou força no início dos anos 1990. Segundo esta vertente para que a gestão dos recursos hídricos seja efetiva, esta deve ser integrada e considerar todos os aspectos, físicos, sociais e econômicos (PORTO e PORTO, 2008).

As características genéticas da população, assim como sua distribuição, trazem informações aos gestores das pescas sobre a escala adequada da exploração do recurso através da elucidação da estrutura de estoque (DUDGEON et al., 2012). Dessa forma, a junção dos dados de genética de populações e da gestão com base em bacias hidrográficas favorece uma visão ampla do ambiente, possibilitando uma gestão ecossistêmica.

A coleta de dados sobre o ambiente é imprescindível para as políticas de gestão, além do controle na coleta e registro de informações sobre as capturas de peixe em diferentes regiões. Muitas vezes, a melhor abordagem para o monitoramento ambiental e gestão da pesca envolve estabelecer grupos locais de gestão em zonas de pesca. Estes grupos permitem que as pessoas envolvidas na atividade tenham a possibilidade de opinar na regulamentação da pesca, manter registros e tomar decisões responsáveis. Para alcançar resultados positivos as comunidades locais devem estabelecer claramente os direitos e responsabilidades para a manutenção adequada da água e zonas circundantes (FAO, 2003).

### **2.1.5 Biologia da conservação**

A biologia da conservação é uma ciência multidisciplinar que surgiu da necessidade em se tratar das ameaças constantes à diversidade biológica, considerando que nenhuma das disciplinas tradicionais são abrangentes o suficiente para tratar de um tema tão diverso (SOULÉ, 1985; HUNTER e GIBBS, 2007).

Esse ramo da ciência possui dois objetivos principais: entender os efeitos da atividade humana nas espécies, comunidades e ecossistemas e desenvolver abordagens práticas para prevenir sua extinção, e se possível, reintegrar as espécies ameaçadas ao seu ecossistema funcional (PRIMACK e RODRIGUES, 2001).

A Figura 4 mostra como os inúmeros ramos da ciência se unem na biologia da conservação com a finalidade de se buscar novas ideias e enfoques para o gerenciamento dos

recursos naturais, aplicadas à obtenção de bens e serviços de maneira sustentável para o homem. A experiência originada a partir da prática atua direcionando a pesquisa acadêmica.

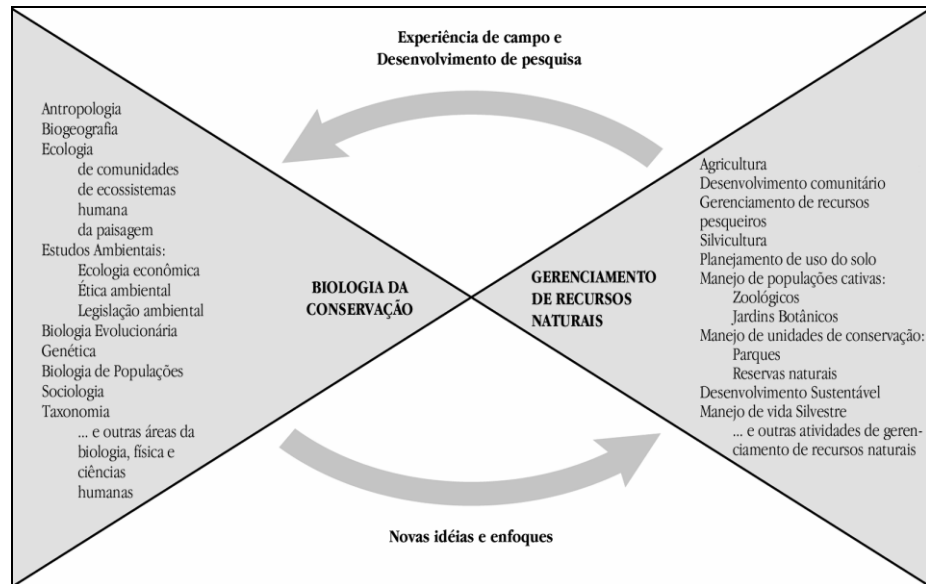


Figura 4: A Biologia da Conservação (Retirado de PRIMACK e RODRIGUES, 2001).

A Biologia da conservação têm sido, desde o seu início, tratada como uma disciplina da crise, pois as ações conservacionistas só são tomadas após o estabelecimento do problema. Segundo Rodrigues (2002) esse campo tenta fornecer respostas a questões específicas em situações reais, buscando melhores estratégias para a tomada de decisões sobre os assuntos referentes à conservação, muitas vezes, com informação limitada e em um curto espaço de tempo.

A meta principal das políticas conservacionistas é assegurar opções para as gerações presente e futura, mantendo a diversidade biológica (genética, de espécies, populacional e ecossistêmica), de forma que os recursos não sejam perturbados além dos limites (MANGEL *et al.*, 1996).

A União Mundial para a Conservação (IUCN) determina três níveis fundamentais da biodiversidade importantes a se preservar, que são: diversidade ecossistêmica, diversidade de espécies e diversidade genética. Dentre essas, a diversidade genética se mostra importante por ser fundamental para a evolução futura e para a flexibilidade adaptativa, importantes para a persistência em um ambiente dinâmico.

### 2.1.5.1 Conservação genética

A informação genética de um organismo está armazenada na molécula de ácido desoxirribonucléico (DNA) presente no núcleo de cada célula, essa molécula é composta por quatro blocos distintos chamados nucleotídeos em inúmeras combinações. A parte específica do DNA que inclui as informações da sequência de um determinado produto (proteína) é chamada de gene. A presença de diferentes alelos (variantes de um gene) implica na existência da variação genética, podendo estar representada dentro das populações pelos genótipos (diferentes combinações de alelos entre indivíduos), e entre as populações (diferenças na frequência de ocorrência dos alelos entre populações) (GRIFFITHS *et al.*, 2008).

A presença da variação genética (entre indivíduos e/ou populações) é essencial para a sobrevivência das espécies, pois as tornam naturalmente resilientes frente às alterações ambientais e doenças (CHAPIN III *et al.*, 2000). Os fatores que podem diminuir a variação genética incluem o pequeno tamanho populacional, os gargalos da população, a deriva genética, a depressão endogâmica, a seleção artificial em cativeiro e a mistura de diferentes estoques genéticos. Estes fatores podem conduzir a homozigose aumentada, a perda de variação quantitativa e a exposição de alelos recessivos deletérios (MEFFE, 1986).

A conservação genética é o campo da biologia da conservação que trata dos fatores genéticos que afetam o risco de extinção e os mecanismos de gestão necessários para minimizar esse risco, utilizando as informações originadas da genética de populações, evolucionária e qualitativa para direcionar as questões de relevância conservacionista (SWATDIPONG, 2009).

A utilização de ferramentas moleculares pode representar instrumentos valiosos para a conservação genética, esclarecendo questões demográficas e ecológicas em espécies ameaçadas ou com fins de gestão. A determinação da taxonomia pode direcionar os esforços a determinados táxons, resultando na redefinição de prioridades nos esforços conservacionistas e a compreensão dos níveis relativos de diferenciação na população e entre populações pode ajudar a concentrar os esforços em um grupo específico a ser gerido ou recuperado (HAIG, 1998).

Os estudos sobre diversidade genética não são substitutos para as avaliações ecológicas, sistemáticas, demográficas e de paisagem aquática para a preservação e recuperação de habitats. Apesar disso, os estudos genéticos são importantes para a resolução de problemas com grupos de difícil determinação taxonômica, na detecção de diversidade

dentro e entre populações geográficas, no gerenciamento do fluxo gênico e entendimento de fatores que contribuem para o fitness de uma espécie (VRIJENHOEK, 1998).

#### **2.1.6 Marcadores moleculares utilizados com fins de conservação e gestão de recursos pesqueiros**

A biologia molecular tem sido utilizada nos estudos de genética de populações. A eletroforese é a ferramenta básica para todas as técnicas de genética molecular. Essa metodologia está baseada na separação de proteínas ou DNA purificados, utilizando-se um gel (este pode ser, por exemplo, de agarose) e executando-se uma forte corrente eléctrica através deste. As diferenças encontradas entre as moléculas, tamanho e/ou carga, permitiram uma migração diferenciada através do gel gerando diferenças no posicionamento final das moléculas e fragmentos. A posição final das moléculas é determinada utilizando corantes ou sondas radioativas (HUNTER e GIBBS, 2007).

O avanço destes estudos está intimamente relacionado ao desenvolvimento da reação cadeia polimerase (PCR), juntamente com as técnicas de sequenciamento automático.

A técnica de PCR permite a amplificação do DNA *in vitro*, utilizando a reação enzimática catalisada pela enzima polimerase. O processo ocorre em três etapas: na primeira ocorre a desnaturação das fitas, normalmente por elevação da temperatura e depende de algumas características do DNA, como a proporção de bases nitrogenadas presentes; na segunda ocorre o anelamento, para a adição das bases complementares a DNA polimerase necessita de um fragmento ligado ao DNA de fita simples, este fragmento sintético é chamado de primer e é específico para a sequência que se deseja amplificar; por fim a fase de extensão ocorre com a adição dos nucleotídeos complementares a fita molde pela DNA polimerase, formando as novas fitas (INNIS et al., 1990). Uma das vantagens da PCR nos estudos de biologia da conservação é que essa técnica permite a utilização de amostras pequenas.

Esses experimentos podem ser realizados com o DNA nuclear (DNAn) ou mitocondrial (DNAm). O DNAm oferece inúmeras vantagens, em relação ao DNAn, como herança materna, genoma haplóide, ausência de recombinação, sensibilidade aos efeitos de deriva genética e alta taxa evolutiva (HILSDORF *et al.*, 2006; CAWTHORN *et al.*, 2011). No caso dos peixes, estas técnicas são vantajosas, pois podem ser utilizadas com espécimes frescos, congelados ou processados (CAWTHORN *et al.*, 2011).

Existe uma variedade de marcadores moleculares, estes são qualquer fenótipo molecular oriundo de um gene expresso ou de um segmento de DNA. Estes são aplicáveis a

variadas situações nos estudos populacionais, juntamente com as análises estatísticas permitem a realização da estimativa do grau de variabilidade genética de uma dada população e a construção de árvores filogenéticas, relacionando espécies próximas e elucidando questões de parentesco (MARQUES, 2002).

Os principais marcadores moleculares no DNA utilizados são polimorfismo de DNA amplificado ao acaso (RAPD), polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição (RFLP), polimorfismo de comprimento de fragmentos amplificados (AFLP), os microssatélites e o sequenciamento do DNA (MARQUES, 2002; HILSDORF *et al.*, 2006).

O RAPD está baseado na diferença entre indivíduos na distribuição de sítios complementares a um *prímer* curto (10 bases), de sequência aleatória. Os segmentos amplificados são desconhecidos e possuem tamanhos variados, sua visualização é realizada em gel de agarose ou acrilamida com o uso de corantes, como o brometo de etídeo. Diferentes organismos apresentarão padrões distintos das bandas no gel, com base nos sítios de anelamento do *prímer* no DNA (MARQUES, 2002).

As desvantagens do RAPD são a reprodutibilidade e a sensibilidade às mudanças nas condições da reação (CHEE *et al.*, 2011). Esse marcador é utilizado em estudos para a estimativa de variabilidade e similaridade entre populações de peixes (MARQUES, 2002).

O RFLP está baseado na diferença de corte no DNA por enzimas de restrição. Estas são endonucleases que reconhecem sequências específicas, clivando-as. Assim, os fragmentos gerados possuem tamanhos variados que são separados em gel de agarose por eletroforese. Os fragmentos separados são transferidos para uma membrana de nylon ou nitrocelulose (*Southern Blot*), hibridizados por sondas radioativas e expostos em um filme de raio X, para a visualização do padrão de distribuição das bandas geradas pela complementariedade entre as sondas e determinadas sequências do DNA digerido (MARQUES, 2002). O RFLP não pode ser aplicado diretamente no DNA nuclear, pois devido ao tamanho da molécula são gerados muitos fragmentos que dificultam a interpretação.

Essa técnica tem sido utilizada nos estudos de diversidade alélica e diferenciação de populações em DNAm. Em peixes, é possível determinar o impacto da introdução de indivíduos de cativeiro em populações naturais e filogenia (CAWTHORN *et al.*, 2011).

O AFLP associa o uso das enzimas de restrição com a amplificação das técnicas de PCR, utilizando *prímers* aleatórios. Esse método apresenta um grande número de fragmentos que podem ser lidos em um mesmo gel com boa resolução (OUBORG *et al.*, 2010).

Os microssatélites são sequências repetitivas organizadas no DNA, com tamanhos variados. Seu polimorfismo deriva principalmente da variabilidade em comprimento do que



da sua sequência primária. A variação genética de muitos *loci* é caracterizada por alta heterozigosidade e a presença de múltiplos alelos (OUBORG et al., 2010).

Além destes, também podem ser utilizadas as isoenzimas, através do estudo de um ou muitos locos e de aloenzimas (variantes alélicas). Como nem toda mutação genética gera alterações nas proteínas, os níveis de variedade podem ser subestimados. Por isso, os estudos baseados no DNA são os mais indicados para os estudos populacionais (MARQUES, 2002).

### 3. ESTUDO DE CASO

#### 3.1 INTRODUÇÃO

A fauna aquática da América do Sul é uma das mais diversas do planeta, como exemplo de região de grande biodiversidade pode-se destacar o rio Amazonas que carrega 1/6 da água doce do planeta e possui mais de 2000 espécies de peixes. A região amazônica possui o maior sistema fluvial do planeta, que se estende por mais de sete milhões de km<sup>2</sup> (ALBERT e CRAMPTON, 2010).

Essa região apresenta um grande potencial pesqueiro. A atividade pesqueira na Bacia Amazônica é caracterizada pela combinação entre a pesca de subsistência e com fins comerciais. Segundo BRASIL (2012), o Estado do Amazonas foi o maior produtor de pescado de água doce do Brasil em 2010. Sendo que as espécies que apresentaram os maiores volumes de desembarque foram: o Curimatã (28.432 t), a Piramutaba (24.607 t), o Jaraqui (16.435 t), a Pescada (14.967 t), a Dourada (14.379 t) e o Pacu (11.042 t). Essas seis espécies juntas representaram 44,1% da produção pesqueira continental do país.

ARDURA e colaboradores (2010) demonstrou que podem existir erros de etiquetagem nos mercados de peixes amazônicos, principalmente em peixes semelhantes morfológicamente. Estes equívocos podem gerar dados não reais, direcionando as estratégias de gestão baseados apenas nos dados de desembarque e morfologia ao erro.

Vários fatores podem direcionar o isolamento de uma população e por consequência a sua estrutura populacional, como barreiras físicas, processos históricos, fatores históricos, físico-químicos e biológicos, como a capacidade de dispersão dos organismos (PLANES *et al.*, 2009).

Neste contexto, os estudos genéticos baseados em marcadores moleculares possibilitam a identificação de áreas e populações únicas que representam unidades biológicas com identidade genética particular e podem ser utilizados na elaboração de programas de manejo visando a conservação da espécie e a exploração sustentável (SCHIAFFINO *et al.*, 2011; CABALLERO *et al.*, 2012).

No presente estudo objetivou-se caracterizar geneticamente as populações de *Prochilodus nigricans* (Curimatã) e *Colossoma macropomum* (Tambaqui) na Bacia Amazônica (Rios Negro, Solimões e Amazonas) e estimar sua variabilidade genética utilizando marcadores moleculares de sequências do DNA mitocondrial.

Esse trabalho é resultado do convênio entre o Laboratório de Toxicologia Ambiental da Fundação Oswaldo Cruz e do Laboratório de Genética de Recursos Naturais da Universidade de Oviedo/Espanha, intitulado “Diversidad Genética y Conservación de Recursos Pesqueros en la Amazonia”.

### 3.2 METODOLOGIA

#### 3.2.2 Área de coleta

O Rio Amazonas é formado da confluência dos Rios Solimões e Negro na cidade de Manaus-AM (Figura 5). Nesta região ocorre o encontro das águas lamacentas do Solimões com as águas negras do Rio Negro, as águas com características diferentes de velocidade, temperatura e densidade fluem lado a lado por 6 km sem se misturar. O rio Negro, com águas ácidas (pH 4,5) flui a 2 km por hora a uma temperatura de 22 ° C, enquanto que o Rio Solimões com águas de pH neutro (7,0) percola entre 4-6 km por hora a uma temperatura de 28 ° C (PIEDADE et al., 2010).

Os animais foram obtidos em diferentes pontos da bacia amazônica (Figura 5). Os pontos de coleta foram Rio Negro (Novo Airão), Rio Solimões (Tefé), confluência dos Rios Negro e Solimões (Manaus) e no Rio Amazonas (Santarém e Belém).

Foram retirados pedaços das brânquias e preservados em álcool 70%.

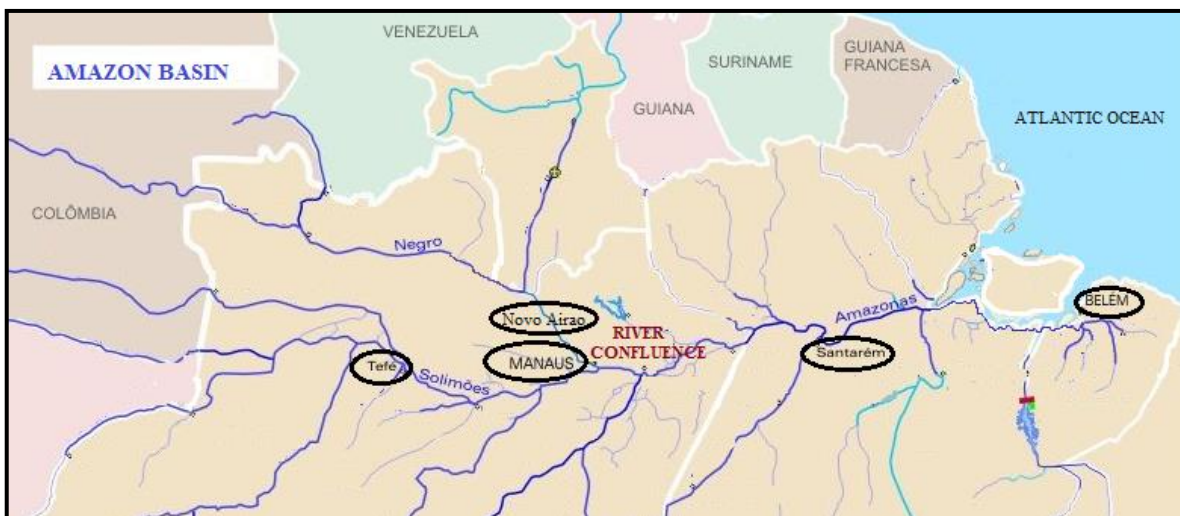


Figura 5: Bacia Amazônica - os círculos demarcam as zonas de coleta.

### 3.2.3 Espécies estudadas

Neste trabalho foram utilizadas duas espécies de peixes nativas da região Amazônica e que possuem elevado valor de mercado, Curimatã (*Prochilodus nigricans*) (Figura 6) e Tambaqui (*Colossoma macropomum*) (Figura 7).

- Curimatã (*Prochilodus nigricans* Spix e Agassiz, 1829)



Figura 6: Curimatã - *Prochilodus nigricans*. Foto do autor

A espécie *Prochilodus nigricans* (Prochilodontidae) é popularmente conhecida como Curimatã. Tem o corpo alto, de coloração cinza prateada, com faixas transversais escuras e inconspícuas no dorso; as nadadeiras caudal, dorsal e anal apresentam várias manchas escuras e claras, alternadamente. Alcança cerca de 30 cm de comprimento e 450 gramas de peso (MOTA e RUFFINO, 1997).

Esta espécie vive em águas lentas com detritos no fundo e pH neutro (6,7-7). É uma espécie iliófaga e tem como característica a formação de cardumes e a realização de longas migrações (ALDEA-GUEVARA *et al.*, 2013).

O Curimatã foi escolhido para este estudo considerando que este foi o peixe que mais contribuiu para a produção pesqueira continental brasileira em 2010, representando 44,1% da produção, juntamente com a Piramutaba, Jaraqui, Pescada, Dourada e Pacu (BRASIL, 2012).

- Tambaqui (*Colossoma macropomum* Cuvier, 1816)



Figura 7: Tambaqui - *Colossoma macropomum*. Foto do autor

A espécie *Colossoma macropomum* (Characidae) é popularmente conhecida como Tambaqui. É considerado o segundo maior peixe de escama da América do Sul, pois chega a medir 90 cm de comprimento e a pesar 30 kg. Espécie frugívora, pode viver em águas oligotróficas (pH 5-7,8), apresentam comportamento semi-migratório, fazendo migrações ascendentes durante períodos de seca (ARAÚJO-LIMA e RUFFINO, 2004).

O Tambaqui tem sido explorado comercialmente na Bacia do Rio Amazonas desde o final do século XIX. Essa é uma espécie importante para a economia regional por ser popular entre os consumidores da região amazônica graças a seu baixo teor de gordura e seu sabor consideravelmente atrativo. Essa espécie foi escolhida para esse estudo porque os dados de desembarque sugerem que o tamanho e a abundância relativa dessa espécie têm diminuído ao longo dos anos e sua coleta apresenta sinais de sobrepesca (ISAAC e RUFFINO, 1996).

Os espécimes foram obtidos nos mercados da região ou diretamente dos pescadores locais. Foram coletados 190 espécimes, sendo 114 de Curimatá e 76 de Tambaqui (Tabela 1).

Tabela 1: Número de amostras analisadas para cada espécie nos sítios de coleta ao longo da Bacia Amazônica.

Ponto de coleta	Número de amostras (n)	
	Curimatã	Tambaqui
Rio Negro	32	3
Rio Solimões	20	17
Região de confluência dos Rios Negro e Solimões	25	24
Rio Amazonas	37	32
<b>Total</b>	<b>114</b>	<b>76</b>

### 3.2.4 Extração do DNA e análise genética

O DNA mitocondrial (DNAm) foi extraído dos tecidos preservados utilizando resina Chelex<sup>®</sup> (Bio-Rad Laboratories). O tecido é introduzido em microtubos contendo 500 µL da resina Chelex (10%) e 7 µL de proteinase K (20 mg/mL), incubados a 55°C por 90 min. O DNA dissolvido na solução aquosa é mantido a 100 °C durante 20 min para inativação da enzima. Os tubos contendo o DNA são armazenados a 4 °C até o momento das análises.

O fragmentos de DNAm correspondente ao gene da citocromo *c* oxidase I (COI) foi amplificado por PCR, empregando *primers* descritos por Ward *et al.* (2005). A reação de amplificação foi realizada em um volume total de 40µL, incluindo tampão promega 1x (Madison, WI); 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>; 0,25 mM dNTPs, 20 pmol de cada primer; 20 ng da fita molde de DNA; e 1 U de DNA Taq polimerase (Promega). As condições do termociclador foram: desnaturação inicial a 95 °C por 5 min, seguidos de 35 ciclos de desnaturação a 95 °C por 20 s, anelamento a 56 °C por 20 s e extensão a 72 °C por 30 s, e por fim uma extensão final a 72 °C por 20 min.

Os produtos do PCR foram visualizados em gel de agarose 2% corados com 3 µL de brometo de etídeo (10 mg/ml). As bandas coradas foram retiradas do gel e o DNA foi purificado com o Kit para sequenciamento Eppendorf PerfectPrep Gel CleanUp<sup>®</sup>.

Os produtos amplificados e purificados foram precipitados usando o protocolo de precipitação com 2-propanol e ressuspenso em formamida.

### 3.2.5 Sequenciamento e edição das sequências

O material foi sequenciado com o analisador ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) com sistema BigDye 3.1, pela unidade de sequenciamento da Universidade de Oviedo (Espanha).

As sequências foram visualizadas e editadas empregando o software de edição e alinhamento de sequências BioEdit (HALL, 1999).

### 3.2.6 Análise dos dados

A análise da variabilidade genética permite comparar indivíduos, populações e espécies diferentes, de forma a permitir a elaboração e execução de programas de conservação e manejo adequados. Para este fim são indicados testes que estimem os índices e distribuição de polimorfismos, pois uma maior variabilidade permite maiores chances de sobrevivência, resistência a doenças e sucesso reprodutivo (FRANKHAM *et al.*, 2002).

Com este intuito, foi utilizada neste trabalho uma série de testes estatísticos capazes de indicar sobre o fluxo gênico nas populações ( $F_{st}$ ), variação genética dentro das populações ( $D$  de Tajima), polimorfismos ( $F_s$  de  $F_u$ ), mudança demográfica (distribuições par a par entre sequências de DNA e Teste de  $R_2$ ), além da distribuição e frequência de haplótipos (árvore de haplótipos).

O programa ARLEQUIN (SCHNEIDER *et al.*, 2000) foi utilizado para estimativas de valores de  $F_{st}$  (índice de fixação) e sua significância estatística entre os pares de amostras, ou seja, o significado de diferenciação entre populações, com 10.000 permutações de significância.

A forma de medir o grau de estruturação genética de uma determinada espécie, isto é, o grau de separação genética entre populações ou o nível de fluxo gênico entre as populações, pode ser estimada pelo índice estatístico  $F_{st}$  (WRIGHT, 1978), que é a probabilidade de que dois genes tomados ao acaso em duas populações diferentes sejam idênticos por origem, cuja medida avalia o quanto das diferenças entre as frequências gênicas é devida à dificuldade de fluxo gênico entre as localidades (HILSDORF *et al.*, 2006).

Para a análise da neutralidade seletiva das populações foram realizados os testes  $D$  de Tajima (TAJIMA, 1989) que avalia a variação genética dentro das populações no nível de DNA e teste  $F_s$  de  $F_u$  (FU, 1997) que se baseia no polimorfismo do DNA, levando em consideração o fator do tempo na formação dos sítios variáveis, classificando as mutações

como antigas ou recentes. Para investigar a possibilidade da mudança demográfica, as distribuições par a par entre sequências de DNA (HARPENDING, 1994) e Teste de  $R_2$  (RAMOS-ONSINS E ROZAS, 2002) foram analisados, comparando as distribuições observadas com a esperada sob um modelo de expansão de populações. Todos os testes citados foram realizados utilizando o programa ARLEQUIN (SCHNEIDER *et al.*, 2000).

Uma árvore de haplótipos - conjunto de informações genéticas de um dos dois conjuntos de cromossomos (median-joining network) (BANDELT *et al.*, 1999) foi construída para representar a genealogia intra-específica dos grande conjunto de dados de haplótipos e suas frequências relativas na população amostrada usando a rede software 4.5 (disponível em <http://www.fluxus-technology.com>), com configurações padrão.

### 3.3 RESULTADOS

#### 3.3.2 Curimatã (*Prochilodus nigricans*)

O comprimento da sequência de COI analisado foi de 608 nucleótidos. Foram encontrados dez sítios variáveis, correspondentes a 11 haplótipos (números de acesso GenBank JN032683 até JN032693). Dez dos onze haplótipos estão presentes no Rio Amazonas, dos quais sete foram exclusivos para esta área (Tabela 2).

Os testes de neutralidade seletiva das populações  $D$  e  $F_u$ 's foram significativamente negativos nesta área e com base em análises de distribuições das diferenças pareadas, o modelo de expansão rápida do crescimento da população não pôde ser rejeitado para as populações a na região do Amazonas (valores de *Raggedness* não significativos). Além disso, o teste de  $R_2$  mostra o valor mais baixo nesta região, apoiando assim a expansão da população (Tabela 3). Algo semelhante acontece em Manaus, embora os valores não sejam tão baixos neste caso (Tabela 3).

Em relação à diferenciação geográfica, valores emparelhados significativos de  $F_{st}$  (diferenciação genética significativa entre pares de população) foram obtidos apenas entre as amostras obtidas em Manaus (confluência dos Rios) e o resto de pontos de amostragem (Tabela 4).

A rede de haplótipos (Figura 7a) forneceu dois haplótipos principais que podem ser consideradas duas linhagens, H1 e H2, que estavam presentes em todos os pontos de amostragem: Novo Airão, Tefé, Manaus e Amazonas com diferentes frequências. O resto dos haplótipos foi derivado a partir deles produzindo uma rede em forma de duas estrelas e a



maioria deles são únicos no Amazonas, apenas H3 também está presente em Tefé e Novo Airao, e H11 é único em Novo Airão.

### 3.3.3 Tambaqui (*Collossoma macropomum*)

Dos 629 nucleotídeos analisados na sequência de COI para *C. macropomum*, foram encontrados oito sítios variáveis, correspondendo a 12 diferentes haplótipos (números de acesso no GenBank JN032694 até JN032704 e FJ418767). Dez deles estão presentes no Amazonas e quatro haplótipos exclusivos foram encontrados nesta área (Tabela 2).

Desvios de equilíbrio foram estatisticamente significativos para as amostras no Amazonas e Solimões para o teste Fu's. No entanto, o teste de Tajimas não foi estatisticamente significativo para todos os casos. Análises de incompatibilidade não nos permitem rejeitar um modelo de expansão recente para o crescimento da população (valores de *Raggedness* não significativos). Mais uma vez, o teste de R2 mostram o valor mais baixo no Amazonas (Tabela 3).

A rede de haplótipos apresentou uma forma complicada, com três haplótipos principais, a partir do qual todos os outros derivam por mutações consecutivas (Figura 7b). Neste caso, um haplótipo exclusivo foi encontrado em Manaus, H4 e H3 é quase exclusivamente desta área.

Nos testes *Fst* para a diferenciação genética entre as amostras fornecidas, foram observados valores significativos de *p* entre as amostras do Manaus (confluência de rios) e o resto dos pontos de amostragem (Tabela 4).

Tabela 2: Haplótipos encontrados em *P. nigricans* e *C. macropomum* nos sítios de amostragem.

	HAPLÓTIPOS	FREQUÊNCIA DOS HAPLÓTIPOS				
		Rio Negro	Rio Solimões	Confluência dos Rios	Amazonas	TOTAL
<b>CURIMATÁ</b> ( <i>Prochilodus nigricans</i> )	1	17	11	24	15	<b>67</b>
	2	12	8	1	13	<b>34</b>
	3	2	1	-	2	<b>5</b>
	4	-	-	-	1	<b>1</b>
	5	-	-	-	1	<b>1</b>
	6	-	-	-	1	<b>1</b>
	7	-	-	-	1	<b>1</b>
	8	-	-	-	1	<b>1</b>
	9	-	-	-	1	<b>1</b>
	10	-	-	-	1	<b>1</b>
	11	1	-	-	-	<b>1</b>
	<b>TOTAL</b>	<b>32</b>	<b>20</b>	<b>25</b>	<b>37</b>	<b>114</b>
	<b>Nº HAPLÓTIPOS</b>	<b>4</b>	<b>3</b>	<b>2</b>	<b>10</b>	
<b>TAMBAQUI</b> ( <i>Colossoma macropomum</i> )	1	1	5	2	6	<b>14</b>
	2	2	6	4	9	<b>21</b>
	3	-	-	17	1	<b>18</b>
	4	-	-	1	-	<b>1</b>
	5	-	3	-	5	<b>8</b>
	6	-	1	-	4	<b>5</b>
	7	-	1	-	-	<b>1</b>
	8	-	1	-	1	<b>2</b>
	9	-	-	-	3	<b>3</b>
	10	-	-	-	1	<b>1</b>
	11	-	-	-	1	<b>1</b>
	12	-	-	-	1	<b>1</b>
	<b>TOTAL</b>	<b>3</b>	<b>17</b>	<b>24</b>	<b>32</b>	<b>76</b>
<b>Nº DE HAPLÓTIPOS</b>	<b>3</b>	<b>6</b>	<b>4</b>	<b>10</b>		

Tabela 3:  $F_s$  = Teste de neutralidade seletiva Fu's;  $D$  = Teste de neutralidade seletiva Tajima's;  $r$  = índice de *Raggedness*, valores de *Raggedness* não significativos sugerem expansão;  $R_2$  = Test  $R_2$ . Nível de significância: sem asterístico, não significativo. \* $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ .

	CURIMATÃ ( <i>Prochilodus nigricans</i> )				TAMBAQUÍ ( <i>Colossoma macropomum</i> )			
	$F_s$	$D$	$r$	$R_2$ (não significativo)	$F_s$	$D$	$r$	$R_2$ (não significativo)
<b>Rio Negro</b>	-0.39709	-0.14690	0.15912*	0.1207	0.20067	0.00000	0.55556	0.4714
<b>Rio Solimões</b>	0.20373	0.23837	0.20817*	0.1698	-1.59357*	0.51516	0.07093	0.1687
<b>Confluência</b>	-1.06131*	-1.15753*	0.71200	0.1960	1.21243	0.34074	0.38194	0.1468
<b>Rio Amazonas</b>	-5.64098***	-1.44730**	0.10302	0.0555	-3.39845**	0.14808	0.04964	0.1264

Tabela 4: Teste para a diferença entre as populações baseado nas distâncias genéticas ( $F_{ST}$ ) com as sequências de COI para *P. nigricans* e *C. macropomum*. Os níveis de significância de  $F_{ST}$  são indicados como: \* $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ ; sem asterístico, não significativo.

	<b>Rio Negro</b>	<b>Rio Solimões</b>	<b>Confluência</b>	<b>Rio Amazonas</b>
CURIMATÃ ( <i>P. nigricans</i> )				
<b>Rio Negro</b>	-			
<b>Rio Solimões</b>	-0.03994	-		
<b>Confluência</b>	0.28835 ***	0.32871**	-	
<b>Rio Amazonas</b>	-0.02091	-0.03100	0.21071 ***	-
TAMBAQUI ( <i>C. macropomum</i> )				
<b>Rio Negro</b>	-			
<b>Rio Solimões</b>	-0.10914	-		
<b>Confluência</b>	0.48784*	0.41602***	-	
<b>Rio Amazonas</b>	-0.11218	-0.02501	0.38734***	-

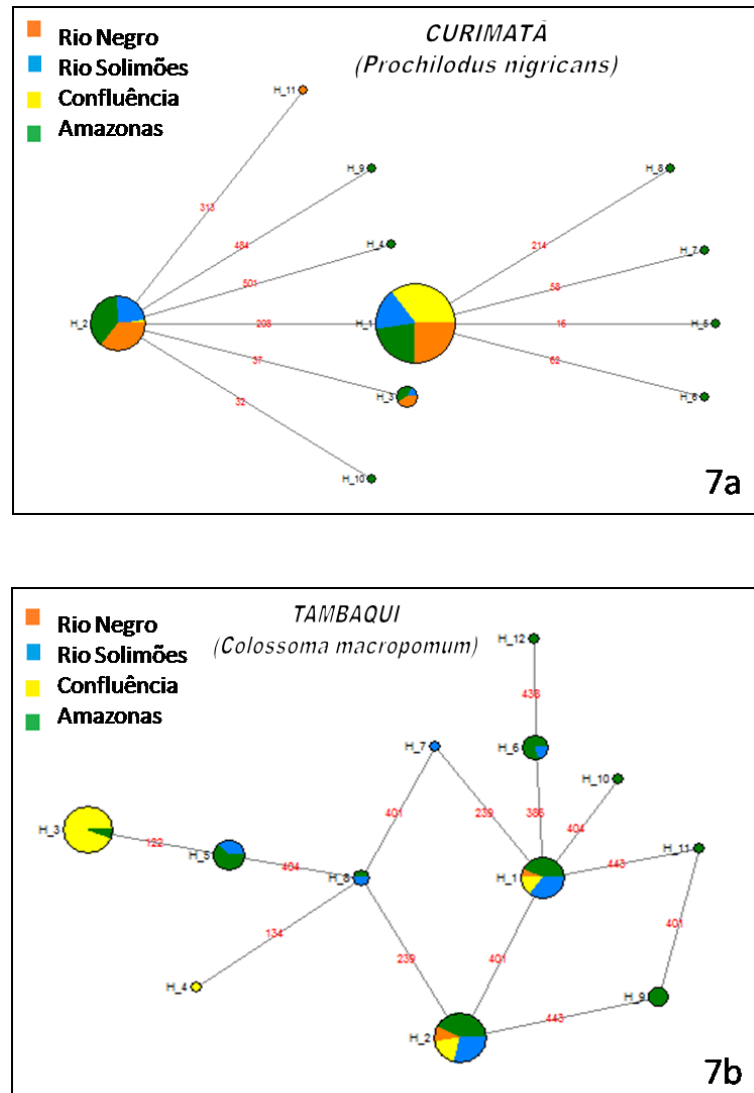


Figura 8: Rede de haplótipos mostrando as relações entre os 11 haplótipos de *P. nigricans* (7a) e os 12 haplótipos *C. macropomum* (7b) definidos pela variação na sequência de COI. H\_1, H\_2, etc, são os nomes dos haplótipos. Áreas em círculos são proporcionais à frequência de cada haplótipo. Em diferentes cores de fundo, os haplótipos de diferentes pontos da Bacia Amazônica.

### 3.4 DISCUSSÃO

Vários fatores são responsáveis pela variabilidade genética nas populações, incluindo a biologia, ciclo de vida, movimentos de dispersão, comportamento reprodutivo, processos históricos e barreiras ambientais. Com a finalidade da conservação é necessário conhecer a variabilidade genética dentro e entre populações, além do entendimento da forma como essas variações são introduzidas e como podem ser perdidas (BATISTA, 2010).

Segundo Hilsdorf e colaboradores (2006), a avaliação da estrutura genética de uma espécie distribuída dentro de uma bacia hidrográfica, determina a intensidade com que o fluxo gênico entre suas populações vem ocorrendo. Para que sejam manejadas como unidades separadas as populações naturais devem exibir diferenciação genética. Isso ocorre uma vez que o alto nível de diferenciação está relacionado a adaptações às características ambientais distintas e/ou fluxo genético limitado entre as populações (SWATDIPONG, 2009).

Os valores de  $F_{st}$  indicam a diferenciação genética entre as populações, sendo baixa para valores entre 0,00 e 0,05; intermediária entre 0,05 e 0,15; alta entre 0,15 e 0,20; e elevada acima de 0,25 (Wright, 1951). Os valores de  $F_{st}$  obtidos para *C. macropomum* e *P. nigricans* demonstraram alta variação genética na região de confluência dos Rios Negro e Solimões (Manaus) em relação aos outros sítios de coleta. Estes dados indicam diferenciação espacial, devido a diferenças encontradas entre os pontos de amostragem, sendo que a região de Manaus, confluência dos Rios Negros e Solimões, apresentou variação genética em relação às outras populações.

Os testes de neutralidade seletiva  $D$  de Tajima e  $F_s$  de Fu foram realizados a fim de verificar desvios da neutralidade nas populações avaliadas, assim como realizar inferências sobre a história demográfica das mesmas. Os valores negativos e significativos para Curimatã (*P. nigricans*) na região de confluência e no Rio Amazonas podem indicar que estes grupos sofreram expansão populacional recente. Este fato é reforçado pelos resultados no teste de  $R_2$  que mostra o valor mais baixo nesta região e os dados não significativos do índice de *Raggedness*, apoiando o modelo de expansão populacional. O mesmo não pode ser considerado para a espécie *C. macropomum*.

Batista (2010) indicou que a maioria dos casos de expansão populacional se dá em função da heterogeneidade espacial e não pelas mudanças temporais no ambiente. Assim, os eventos históricos e geomorfológicos podem explicar melhor o cenário das expansões populacionais para as espécies de peixes amazônicas do que as oscilações anuais do nível dos rios. A expansão populacional pode ser observada em diversas espécies de peixes

amazônicos, como *Nannostomus eques* (Peixe-lápis), *Serrasalmus rhombeus* (Pacu) e *Brachyplatystoma rousseauxii* (Dourada).

Da análise das redes de haplótipos podemos perceber que para o Curimatã houve dois haplótipos principais que deram origem a todos os outros. A região do Amazonas apresentou o maior número de alelos em relação aos outros pontos, além de possuir haplótipos únicos. Em relação ao Tambaqui não foi observado um padrão de distribuição dos alelos, mas a região que apresentou o maior número de eventos únicos foi à jusante.

Os dados apontam que o Tambaqui não apresenta diferentes populações dentro dos pontos de amostragem, assim podemos sugerir um cenário de panmixia com a presença de apenas um estoque genético. Esses dados são corroborados com os encontrados por Santos e colaboradores (2007) com amostragens no eixo estuário Solimões-Amazonas

Em relação ao Curimatã, observamos que na região de confluência entre os Rios Negro e Solimões e no Rio Amazonas podemos encontrar estoques distintos, com fluxo gênico restrito. Segundo Batista (2010), a diferença na composição química da água pode ser responsável pelo padrão filogeográfico observado em algumas espécies de peixes da bacia Amazônica.

Estudos com marcadores genéticos já foram utilizados para se avaliar a variabilidade genética em outras espécies amazônicas, como a Piramutaba - *Brachyplatystoma vaillantii* (FORMIGA-AQUINO, 2004), o Pirarucu - *Arapaima gigas* (HRBEK *et al.*, 2005), *Hypopygus lepturus* (SCHMITT, 2005), as arraias-de-água-doce do gênero *Potamotrygon* (RIBEIRO, 2006). a Piraíba - *Brachyplatystoma filamentosum* e a Piraíba negra - *Brachyplatystoma capapretum* (HUERGO, 2009),

A distribuição populacional varia de acordo com a espécie. A Piramutaba foi avaliada ao longo do eixo estuário-Amazonas-Solimões com sequências de região controle de DNAm e microssatélites tendo sido encontrada alta variabilidade genética com um estoque panmítico, o mesmo comportamento panmítico foi observado para o Pirarucu e para o Tambaqui (dados apresentados). Para o *Hypopygus lepturus* foi observada uma grande variabilidade genética com distribuição em clados com tal diferenciação que é possível a existência de espécies distintas, já para as arraias do gênero *Potamotrygon* foram observadas populações geneticamente estruturadas, com baixo poder de dispersão e isolamento por distância. Por fim, a Piraíba negra apresentou baixos níveis de variabilidade genética em comparação a Piraíba, esta, por sua vez, demonstrou possuir três estoques distintos relacionados ao tipo de água (branca, preta e clara) demonstrando a importância dos fatores físico-químicos na dispersão de algumas populações.

Os marcadores moleculares aliados aos estudos populacionais tem se mostrado de extrema importância tanto para a genética da conservação avaliando a existência de espécies ameaçadas de extinção, quanto para gestão dos recursos pesqueiros avaliando os riscos potenciais da sobreexploração (FRANKHAM *et al.*, 2002).

No tocante da gestão dos recursos pesqueiros na região amazônica para as espécies estudadas, podemos sugerir que os estoques de Tambaqui sejam geridos conjuntamente em toda a região amostrada, enquanto o de Curimatã necessita de uma avaliação diferenciada entre a zona de confluência entre os Rios e os outros pontos de amostragem.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Para o manejo dos estoques pesqueiros é essencial que as diferentes populações sejam caracterizadas de maneira que permita a avaliação de qual é a melhor estratégia de manejo e conservação. Dessa forma, a biologia molecular surge como uma ferramenta importante para este fim, pois a pesca pode afetar a composição e a variabilidade genética de uma espécie, refletindo nas outras relacionadas dentro do ecossistema. As políticas de manejo e conservação precisam ser elaboradas e executadas em conjunto com as regiões que participam da área de migração da espécie em questão, a fim de garantir o uso sustentável do recurso às populações futuras.

Os avanços recentes na área da biologia molecular forneceram várias metodologias para os estudos populacionais, sendo necessária a escolha da mais eficiente para cada propósito. Um conjunto de características deve ser considerado na escolha dos marcadores, a metodologia deve ser simples e de baixo custo, e são necessárias grandes quantidade de dados de genotipagem (PIORSKI *et al.*, 2008).

Dos marcadores moleculares disponíveis, as sequências de DNA tem se mostrado as escolhas preferenciais quando se trata da busca de variabilidade genética em populações naturais, em especial do DNAm. Este é escolhido por apresentar alta taxa de mutação, não possui sequências duplicadas e nem íntrons. Os trechos do DNAm mais utilizados nos estudos são COI, região controle e RNA ribossomal (GUO *et al.*, 2004). Outro marcador cujo uso está crescente são os microssatélites, estes possuem altos níveis de polimorfismos, são co-dominantes, amplamente distribuído no genoma de eucariotos, entre outras vantagens. Apesar disso, esses microssatélites apresentam complexidade metodológica e elevados custos para a síntese dos primers (OUBORG *et al.*, 2010).

A estrutura e a variabilidade genética das populações de peixes têm sido afetadas pelas mudanças ambientais atuais, e por isso a gestão de recursos pesqueiros merece atenção dos gestores e pesquisadores (ALLAN e FLECKER, 1993). Os fatores identificados como ameaças à diversidade de peixes já foram destacados.

Os aspectos genéticos em populações de peixes podem ser incorporados desde o início dos programas de gestão, a fim de maximizar a probabilidade de sobrevivência em longo prazo e a capacidade de adaptação contínua. A diversidade genética total de uma espécie consiste na diversidade genética da população e nas diferenças encontradas entre as populações. Esses dois tipos de variação devem ser mantidos para maximizar a flexibilidade adaptativa de peixes, principalmente os ameaçados de extinção (MEFFE, 2011).



O entendimento da estrutura genética populacional é um passo importante para a conservação das espécies, pois permite entender as origens e o grau de variação presente nas populações e o estabelecimento de unidades evolutivas significativas direcionando os projetos de conservação de integridade genética (HILSDORF *et al.*, 2006; PIORSKI *et al.*, 2008; NASCIMENTO, 2009).

Considerando a importância comercial dos peixes, a preocupação com sua conservação não tem fundamentação apenas ecológica, mas também econômica e social. As estratégias de conservação devem visar as possíveis ameaças de extinção e, adicionalmente, a manutenção da exploração sustentável do recurso.

Os estudos genéticos também podem ser usados como ferramenta de identificação das espécies de peixes, facilitando a importação deste recurso para o mercado internacional. Com esta finalidade o gene mitocondrial que expressa a citocromo *c* oxidase I (COI) apresenta poder discriminatório para os estudos de *barcode* na identificação de um grande número de espécies (HILSDORF *et al.*, 2006; CAWTHORN *et al.*, 2011).

Os marcadores moleculares são extremamente úteis para o desenvolvimento de planos de conservação e manejo. Os estudos sobre a biodiversidade do recurso pesqueiro em águas continentais é muito importante, uma vez que estes ambientes estão em constante impacto antrópico, e as espécies são cada vez mais exploradas como fontes de alimentos pela população humana. Assim, concluímos que os marcadores moleculares são ferramentas importantes para a identificação de unidades populacionais que necessitam de gerenciamento individual e possuem alta prioridade de conservação e devem ser usadas em conjunto com os dados da biologia e ecologia das espécies presentes na área que se deseja manejar.

## REFERÊNCIAS

AGOSTINHO, A. A.; THOMAZ, S. M.; GOMES, L. C. Conservação da biodiversidade em águas continentais do Brasil. *Megadiversidade*, v. 1, n. 1, 2005.

ALBERT, J. S.; CRAMPTON, W. G.R. The geography and ecology of diversification in neotropical freshwaters. *Nature education knowledge*. v. 3, n. 10, p. 13, 2010.

ALDEA-GUEVARA, M. I.; HARGROVE, J.; AUSTIN, J. D. Diversity and gene flow in a migratory frugivorous fish: implications for Amazonian habitat connectivity. *Conservation genetics*, fev. 2013

ALLAN, J. D.; FLECKER, A. S. Biodiversity conservation in running waters. *Bioscience*, v. 43, n. 1, p. 32-43, 1993.

ALLENDORF, F. W.; LEARY, R. F.; SPRUELL, P.; WENBURG, J. K. The problems with hybrids: setting conservation guidelines. *Trends in ecology & evolution*, v. 16, n. 11, p. 613–622, 2001.

ARAÚJO-LIMA, C. A. R. M.; RUFFINO, M. L. Migratory fishes of the Brazilian Amazon. In: Carolsfield, J. et al. (ed.). *Migratory fishes of South America*. Biology, fisheries, and conservation status. Ed. Victoria, Alaris Design, World Fisheries Trust, IDRC and World Bank, 2004. P. 233-301.

ARDURA, A.; G. POLA, I. G.; GINUINO, I.; GOMES, V.; GARCIA-VAZQUEZ, E. Application of barcoding to Amazonian commercial fish labeling. *Food research international*, v. 43, n. 5, p. 1549-1552, 2010.

BANDELT, H. J.; FORSTER, P.; RÖHL, A. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular biology and evolution*, v. 16, n. 1, p. 37-48, 1999.

BATISTA, J. S. Caracterização genética da dourada - *Brachyplatystoma rousseauxii*, Castelnau, 1855 (Siluriformes: Pimelodidae) na Amazônia por meio de marcadores moleculares mitocondriais e microssatélites: subsídios para conservação e manejo. *Tese apresentada aos Programas de Pós-Graduação do INPA como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Genética, Conservação e Biologia Evolutiva*. Manaus-AM, 2010.

BELLINGERI, M.; BODINI, A. Threshold extinction in food webs. *Theoretical Ecology*, v. 6, n. 2, p. 143-152, 2013.

BRANDER, K. M. Global fish production and climate change. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, National Academy of Sciences (ed.), v. 104, n. 50, p. 19709-19714, 2007.

BRASIL. Ministério do meio ambiente. Secretaria de qualidade ambiental nos assentamentos humanos. Programa revizee. *Avaliação do potencial sustentável de recursos vivos na zona econômica exclusiva*. Relatório executivo, 2006. 303p.

BRASIL. Ministério de pesca e aquicultura. *Boletim estatístico da pesca e aquicultura-brasil 2010*, 2012. 129p.

CABALLERO, S.; CARDEÑOSA, D.; SOLER, G.; H Y D E, J. Application of multiplex PCR approaches for shark molecular identification: feasibility and applications for fisheries management and conservation in the eastern tropical pacific. *Molecular ecology resources*, v.12, p. 233–237, 2012.

CAWTHORN, D. M.; STEINMAN, H. A.; T H U H N, R. T. Establishment of a mitochondrial DNA sequence database for the identification of fish species commercially available in south africa. *Molecular ecology resources*, v. 11, p. 979–991, 2011.

CHAPIN III, F. S. *et al.* Consequences of changing biodiversity. *Nature*, v. 405, n. 11, p. 234-242, 2000.

CHEE, S.Y.; AZIZAH, M.N.S.; DEVAKIE, M.N. Utilization of molecular markers for the conservation of blood cockles, *Anadara granosa* (arcidae). *Genetics and molecular research*, v. 10, n. 2, p. 1245-1261, 2011.

COWX, I. G. *et al.* A valoração da pesca em águas continentais. *Novos cadernos NAEA*, v. 13, n. 1, p. 71-103, 2010.

DIAS NETO, J. *Gestão do uso dos recursos pesqueiros marinhos no brasil*. Brasília: IBAMA, 2010a. 242p.

DIAS NETO, J. Pesca no Brasil e seus aspectos institucionais - um registro para o futuro. *Revista CEPSUL biodiversidade e conservação marinha*, v. 1, n. 1, p. 66-80, 2010b.

DUDGEON, D.; ARTHINGTON, A. H.; GESSNER, M. O.; KAWABATA, Z.; KNOWLER, D. J.; LÉVÊQUE, C.; NAIMAN, R. J.; PRIEUR-RICHARD, A.; SOTO, D.; STIASSNY, M. L. J.; SULLIVAN, C. A. Freshwater biodiversity: importance, threats, status and conservation challenges. *Biological Review*, v. 81, p. 163–182, 2006.

FRANKHAM, R.; BALLOU, J. R.; BRISCOE, D. A. Introduction to Conservation Genetics. Cambridge University Press. (ed.), England, 2002. 640 p.

FORMIGA-AQUINO, K. Variabilidade genética da piramutaba – *Brachyplatystoma vaillantii* (Valenciennes, 1840) (Siluriformes: Pimelodidae) no sistema Estuário Amazonas-Solimões. Dissertação apresentada aos Programas de Pós-Graduação do INPA, como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre, 2004.

GEOBRASIL. O estado dos recursos pesqueiros: pesca extrativa e aquicultura. *O estado do meio ambiente no Brasil*, p. 132-147, 2002.

GIULIETTI, N.; ASSUMPÇÃO, R. Indústria pesqueira no brasil. *Agricultura em são paulo-SP*, v. 42, n. 2, p. 95-127, 1995.

GRIFFITHS, A. J. F.; LEWONTIN, R. C. ; CARROLL, S. B.; WESSLER, S. R. Introdução a genética. Guanabara koogan (ed.), 2008. 740p.

HAIG, S. M. Molecular contributions to conservation. *Ecology*, v. 79, n.2, p. 413-425, 1998.

HALL, T. A. Bioedit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for windows 95/98/nt. *Nucleic Acids Symposium*, n. 41, p. 95-98, 1999.

HARPENDING, H. C. Signature of ancient population growth in a low-resolution mitochondrial dna mismatch distribution. *Human biology*, v. 66, n. 4, p. 591-600, 1994.

HILSDORF, A. W. S.; MARQUES, D. K. S.; RESENDE, E. K. *Genética e conservação de estoques pesqueiros de águas continentais no brasil: situação atual e perspectivas*. Corumbá: Embrapa Pantanal, 2006. 43p.

HRBEK, T.; FARIAS I. P.; CROSSA, M.; SAMPAIO, I.; PORTO, J. I. R.; MEYER, A. Population genetic analysis of *Arapaima gigas*, one of the largest freshwater fishes of the Amazon basin: implications for its conservation. *Animal conservation*, v. 8, p. 297-308, 2005.

HUERGO, G.M. Estimativa da diversidade genética da piraíba (*Brachyplatystoma filamentosum* Lichtenstein, 1919) e da piraíba negra (*B. capapretum* Lundberg & Akama, 2005), na Amazônia brasileira, inferidas através de DNA mitocondrial: subsídio para manejo e conservação. Tese apresentada para a obtenção do título de doutor, como parte das exigências do programa de pós-graduação do INPA, 2009.

HUNTER JR., M. L.; GIBBS, J. P. *Fundamentals of Conservation Biology*, 3<sup>o</sup> edição, Wiley-Blackwell (ed.), 2007. 516 p.

INNIS, M. A.; GELFAND, D. H.; SNINSKY, J. J.; WHITE, T. J. *PCR protocols: a guide to methods and applications*, 1990, 482 p.

ISSAC, V. J.; RUFFINO, M. L. Population dynamics of tambaqui, *Colossoma macropomum* Cuvier, in lower Amazon, Brazil. *Fisheries management and ecology*, v. 3, p. 315-333, 1996.

KALIKOSKI, D. C.; SEIXAS, C. S.; ALMUDI, T. Gestão compartilhada e comunitária da pesca no Brasil: Avanços e desafios. *Ambiente e Sociedade*, v. 12, n. 1, p. 151-172, 2009.

LÉVÊQUE, C.; OBERDORFF, T.; PAUGY, D.; STIASSNY, M. L. J.; TEDESCO, P. A. Global diversity of fish (Pisces) in freshwater. *Hydrobiologia*, v. 595, n. 1, p. 545-567, 2008.

LUNDBERG, G.; KOTTELAT, M.; SMITH, G. R.; STIASSNY, M. L. J.; GILL, A. C. So many fishes, so little time: an overview of recent ichthyological discovery in continental waters. *Annals of the Missouri Botanical Gardens*, v. 87, p. 26-62, 2000.

MAIA NETO, R. F. Água para o desenvolvimento sustentável. A Água em Revista, Belo Horizonte, n.9, p.21-32, 1997.

MAITLAND, P. S. The conservation of freshwater fish: past and present experience. *Biological conservation*, v. 72, p. 259-270, 1995.

MANGEL, M. *et al.* Principles for the conservation of wild living resources source. *Ecological applications*, v. 6, n. 2, p. 338-362, 1996.

MARQUES, D. K. S. *Aplicação da biologia molecular em programas de conservação de recursos pesqueiros*. Corumbá:embrapa pantanal, 2002. 22 p. Disponível em: <<http://www.cpap.embrapa.br/publicacoes/online/doc36.pdf>>. Acesso em: 11 set. 2011.

MEFFE, G. K. *Conservation genetics and the management of endangered fishes*. Fisheries. V. 11, n.1, 1986.

MOTA, S. Q.; RUFFINO, M. L. Biologia e pesca do curimatá (*Prochilodus nigricans* agassiz, 1829) (prochilodontidae) no médio amazonas. *Revista UNIMAR*, v. 19, p. 493-508, 1997.

MOULTON, T. P.; SOUZA, M. L. Conservação com base em bacias hidrográficas. *Biologia da conservação*. Ed Bergallo, H.G., Rocha, C.F.D., Alves, M.A.S. & Sluys, M.V., pp. 45-52. Ed. Universidade do estado do rio de janeiro. Rio de janeiro, RJ, Brasil, 2006.

NASCIMENTO, A. D. Mercúrio total em peixes carnívoros e variabilidade genética do pacú (*Piaractus mesopotamicus*) por meio de microssatélites – provenientes do rio Paraguai e rio Cuiabá – alto pantanal, MT. *Dissertação apresentada à universidade do estado de Mato Grosso*, como parte das exigências do programa de pós graduação em ciências ambientais para obtenção do título de mestre, 2009.

OUBORG, N. J.; PERTOLDI, C.; LOESCHCKE, V.; BIJLSMA, R.; HEDRICK, P. H. Conservation genetics in transition to conservation genomics. *Trends in Genetics*, v. 26, n. 4, p. 177-187, 2010.

ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS PARA A ALIMENTAÇÃO E A AGRICULTURA (FAO). *La pesca continental*, 2003. 17p.

ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS PARA A ALIMENTAÇÃO E A AGRICULTURA (FAO). A fishery manager's guidebook. Management measures and their application. *Fao fisheries technical paper*. Roma: cochrane, k.l. (ed.), n. 424. 2002. 231p. Disponível em: < <http://www.fao.org/docrep/005/y3427e/y3427e03.htm> >. Acesso em: 28 nov. 2012.

ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS PARA A ALIMENTAÇÃO E A AGRICULTURA (FAO). *Code of conduct for responsible fisheries*. Roma, 1995. 41p. Disponível em: < <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/005/v9878e/v9878e00.pdf> >. Acesso em: 28. Nov. 2012.

ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS PARA A ALIMENTAÇÃO E A AGRICULTURA (FAO). *El estado mundial de la pesca y la acuicultura*. Roma, 2012. 251p. Disponível em: < <http://www.fao.org/docrep/016/i2727s/i2727s00.htm> >. Acesso em: 28 nov. 2012a.

ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS PARA A ALIMENTAÇÃO E A AGRICULTURA (FAO). *Departamento de pesca y acuicultura*. Disponível em: < <http://www.fao.org/fishery/es> >. Acesso em: 28 nov. 2012b.

PENHA, J. M. F. Estrutura e estado de exploração dos estoques do Jurupoca, *hemisorubim platyrhynchos*, e do jurupensém, *sorubim* cf. *Lima*, na bacia do rio cuiabá, pantanal mato-grossense. *Tese apresentada para a obtenção do título de doutor*, como parte das exigências do programa de pós-graduação em ecologia e recursos naturais para obtenção do título de doutor em ecologia, 2003.

PIEIDADE, M. T. F.; JUNK, W.; D'ÂNGELO, S. A.; WITTMANN, F.; SCHÖNGART, J.; NASCIMENTO BARBOSA, K. M.; LOPES, A. Aquatic herbaceous plants of the Amazon floodplains: state of the art and research needed. *Acta Limnologica Brasiliensis*, v. 22, n. 2, p. 165-178, 2010.

PIORSKI, N. M.; SANCHES, A.; CARVALHO-COSTA, L.F.; HATANAKA, T.; CARRILLO-AVILA, M.; FREITAS, P. D.; GALETTI JR., P. M. Contribution of conservation genetics in assessing neotropical freshwater fish biodiversity. *Brazilian Journal of biology*, v. 68, n. 4, p. 1039-1050, 2008.

PLANES, S.; JONESC, G. P.; THORROLDD, S. R. Larval dispersal connects fish populations in a network of marine protected areas. *Pnas*, v. 106, n. 14, p. 5693-5697, 2009.

PRIMACK, R. B.; RODRIGUES, E. *Biologia da conservação*. 1.ed. Londrina: e. Rodrigues, 2001. 328p.

RAMOS-ONSINS, S. E.; ROZAS, J. Statistical properties of new neutrality tests against population growth. *Molecular biology and evolution*, v. 19, n. 12, p. 2092-2100, 2002.

Ribeiro, D. T. História evolutiva de espécies do gênero *Potamotrygon* Garman, 1877 (*Potamotrygonidae*) na Bacia Amazônica. *Dissertação apresentada ao INPA*, como parte das exigências para obtenção do título de mestre, 2006.

RODRIGUES, E. *Biologia da conservação: ciência da crise. Semina: ciências agrárias, londrina*, v. 23, n. 2, p. 261-272, 2002.

SANTOS, M. D. C. F.; RUFFINO, M. L.; FARIAS, I. P. High levels of genetic variability and panmixia of the tambaqui - *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818) in the main channel of the Amazon River. *Journal of Fish Biology*, 71a: 33-44, 2007.

SALGUEIRO, P.; CARVALHO, G.; COLLARES-PEREIRA, M. J.; COELHO, M. M. Microsatellite analysis of genetic population structure of the endangered cyprinid *anaecypris hispanica* in Portugal: implications for conservation. *Biological conservation*, v. 109, p. 47-56, 2003.

SCHIAFINO, G. M.; JUANES, F.; GARCIA-VAZQUEZ, E. Identifying unique populations in long-dispersal marine species: gulfs as priority conservation areas. *Biological conservation*, v. 144, p. 330-338, 2011.

SCHNEIDER, S.; ROESSLI, D.; EXCOFFIER, L. Arlequin: a software for population genetics data analysis. *User manual ver 2.000*. Genetics and Biometry Lab, Dept. of Anthropology, University of Geneva, Geneva, 2000.

SCHMITT, R. Filogeografia de “*Hypopygus lepturus*” Hoedeman, 1962 (Gymnotiformes: Rhamphichthyidae) ao longo do médio rio Negro, Amazônia. *Dissertação apresentada ao INPA*, como parte das exigências para obtenção do título de mestre, 2005.

SOULÉ, M. E. What is conservation biology? *Bioscience*, v. 35, n. 11 (the biological diversity crisis), p. 727-734, 1985.

SWATDIPONG, A. Conservation genetics of exploited finnish salmonid fishes. *Tese apresentada para a obtenção do título de doutor*. Department of biology; laboratory of genetics, Annales Universitatis Turkuensis, 2009.

TAJIMA, F. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics*, v. 123, p. 585-595, 1989.

VITULE, J. R. S. Introdução de peixes em ecossistemas continentais brasileiros: revisão, comentários e sugestões de ações contra o inimigo quase invisível. *Neotropical Biology and Conservation*, v. 4, n. 2, p. 111-122, 2009.

VRIJENHOEK, R. C. Conservation genetics of freshwater fish. *Journal of fish biology*, v. 53, p. 394–412, 1998.

WARD, R. D.; ZEMPLAK, T. S.; INNES, B. H. DNA Barcoding Australia’s fish species. *Proceedings of the royal society B: Biological sciences*, v. 360, p. 1847–1857, 2005.

WRIGHT, S. Evolution and the genetics of population, variability within and among natural populations. *The university of Chicago Press*, Chicago, v. 4, 590p, 1978.