



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA
INSTITUTO SÓCIO AMBIENTAL E DOS RECURSOS HÍDRICOS
MESTRADO EM AQUICULTURA E RECURSOS AQUÁTICOS TROPICAIS**

PAOLA FABIANA FAZZI GOMES

**ANÁLISE DA VARIABILIDADE GENÉTICA DAS PISCICULTURAS DE
TAMBAQUI (*Colossoma macropomum*, Cuvier 1818) DO ESTADO DO PARÁ,
UTILIZANDO MARCADORES MICROSSATELITES**

**BELÉM
2015**

PAOLA FABIANA FAZZI GOMES

**ANÁLISE DA VARIABILIDADE GENÉTICA DAS PISCICULTURAS DE
TAMBAQUI (*Colossoma macropomum*, Cuvier 1818) DO ESTADO DO PARÁ,
UTILIZANDO MARCADORES MICROSSATELITES**

Dissertação apresentada à Universidade Federal Rural da Amazônia, como parte das exigências do Curso de Mestrado em Aquicultura e Recursos Aquáticos Tropicais, para a obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Igor Guerreiro Hamoy.

**BELÉM
2015**

PAOLA FABIANA FAZZI GOMES

**ANÁLISE DA VARIABILIDADE GENÉTICA DAS PISCICULTURAS DE
TAMBAQUI (*Colossoma macropomum*, Cuvier 1818) DO ESTADO DO PARÁ,
UTILIZANDO MARCADORES MICROSSATELITES**

Dissertação apresentada à Universidade Federal Rural da Amazônia, como parte das exigências do Curso de Mestrado em Aquicultura e Recursos Aquáticos Tropicais, para a obtenção do título de Mestre.

Aprovado em 24 de novembro de 2015.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Igor Guerreiro Hamoy
Universidade Federal Rural da Amazônia-UFRA

Prof. Dr. Nuno Filipe Alves Correia de Melo- 1º Examinador
Universidade Federal Rural da Amazônia-UFRA

Prof. Dr. Glauber David Almeida Palheta- 2º Examinador
Universidade Federal Rural da Amazônia-UFRA

Prof. Dr. Leonardo dos Santos Sena- 3º Examinador
Universidade Federal do Pará-UFPA

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, e minha amada vizinha Raimunda Andrade Gomes(in memorian)

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Dr. Igor Hamoy, pelo exemplo de profissional acadêmico, pelos inúmeros ensinamentos científicos e pela oportunidade de realização deste trabalho.

Ao programa de Pós Graduação em Aquicultura e Recursos Aquáticos Tropicais, em especial ao seu coordenador Dr. Nuno Melo pela indicação de desenvolvimento deste trabalho.

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Pará - FAPESPA pelo apoio financeiro para execução deste estudo.

À Universidade Federal Rural da Amazônia - UFRA, campus Capanema, por todo apoio logístico na realização das coletas.

À professora Dr. Iracilda Sampaio, pelas amostras cedidas.

Aos alunos de iniciação científica Natho Oliveira e Sávio Guerreiro, pela ajuda de campo e laboratório.

À CAPES, pela concessão da bolsa de estudo.

Ao Dr. Sidney Santos por abrir as portas do laboratório de Genética Humana e Médica - LGHM, da Universidade Federal do Pará, para a execução deste trabalho.

Aos técnicos e alunos de doutorado e mestrado do LGHM, por todo conhecimento repassado nesses dois anos, sou muito grata por tudo!!!

RESUMO

A piscicultura na região Norte do Brasil vem apresentado um desenvolvimento significativo. O tabaqui sendo uma espécie amazônica e a segunda mais cultivada na piscicultura continental, já vem sendo objeto de estudos de programas de melhoramento genéticos desenvolvidos em todo Brasil. A principal preocupação em criações em cativeiro é a determinação da variabilidade genética dessa população, a qual constitui a força que dá às populações capacidade de suportar pressões ambientais e antrópicas. A determinação da variabilidade genética é importante uma vez que pode mostrar a relação genética entre indivíduos, populações e até mesmo entre espécies diferentes. Com isso o presente estudo tem como objetivo avaliar o nível de variabilidade e relacionamento genético, de populações cultivadas de tabaqui em municípios de diferentes regiões do estado do Pará, utilizando marcadores microsatélites. Foram analisados 216 tabaquis cultivados provenientes de 10 municípios da região do Nordeste Paraense, Oeste do Pará e Sudeste do Pará. Para genotipagem utilizou-se um painel multiplex de 10 marcadores microsatélite tri e treta nucleotídeo. Foram calculados os índices de diversidade genética (heterozigosidade esperada e observada, número de alelos por *locus*, riqueza alélica e frequência alélica), o relacionamento genético foi verificado por R_{ST} e F_{ST} , teste de atribuição de assinatura genética e análise bayesiana para determinar o número de populações geneticamente homogêneas. Os resultados mostram que as populações cultivadas de tabaqui provenientes das três regiões em estudo apresentaram perda de variabilidade genética, e estão estruturadas geneticamente, com a formação de dois estoques (*clusters*), um amalgamando todos as pisciculturas de oeste do Pará e outro com as do nordeste paraense e Sudeste do Pará.

Palavras-Chave: Amazônia, Aquicultura, Short Tandem Repeat, Diversidade Genética, Relacionamento genético.

ABSTRACT

Fish farming in northern Brazil has shown a significant development. The tambaqui being an Amazonian species and the second most cultivated in continental fish farming, has already been the subject of studies of genetic breeding programs developed across Brazil. The main concern in captive creations is to determine the genetic variability of this population, which is the force that gives people ability to withstand environmental pressures and anthropogenic. The determination of the genetic variability is important since it can show the genetic relationship between individuals, communities and even among different species. The present study aims to evaluate the level of variability and genetic relationship, cultivated populations of tambaqui in cities from different regions of the state of Pará, using microsatellite markers. They analyzed 216 tambaquis grown from 10 municipalities of Pará Northeast, West of Pará and southeast of Pará. These were genotyped using a multiplex panel of 10 microsatellite markers and beef tri-nucleotide. They analyzed 216 tambaquis grown from 10 municipalities of Pará Northeast, West of Pará and southeast of Pará. These were genotyped using a multiplex panel of 10 microsatellite markers tri and tetranucleotide. The genetic diversity indices were calculated (expected and observed heterozygosity, number of alleles per locus, allelic richness and allele frequency), the genetic relationship was checked by F_{ST} and R_{ST} , assigning test genetic signature and Bayesian analysis to determine the number of populations genetically homogeneous. The results show that the cultivated populations of tambaqui from the three regions under study showed loss of genetic variability, and are structured genetically, with the formation of two stocks (clusters), an amalgamating all the west of fish farms in Pará and another with the Para northeast and southeast of Pará.

Keywords: Amazon, Aquaculture, Short Tandem Repeat, Genetic Diversity, genetic relationship.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Exemplar de tambaqui (<i>Colossoma macropomum</i>) (FishBase).....	14
Figura 2: Representação do replication slippage.....	21
Figura 3: Gráfico comparativo entre as médias de heterozigosidade observada (H_O média), como indicador de variabilidade genética, entre dados da literatura.....	26
Figura 4: Mapa de localização dos municípios que foram realizadas as coletas em pisciculturas de tambaqui.....	33
Figura 5: Eletroferograma do painel multiplex de marcadores microssatélites para <i>Colossoma macropomum</i>	36
Figura 6: Representação da assinatura genética de populações cultivadas de tambaqui, provenientes de região do Nordeste Paraense, Oeste do Pará e Sudeste do Pará.....	54
Figura 7: Estimativa do número de populações de acordo com o método de Evanno <i>et al.</i> (2005), o maior valor de ΔK corresponde ao K ótimo.....	55
Figura 8: Gráfico em barras originado no programa Structure, demonstrando a clusterização de duas populações.....	55
Figura 9: Dendograma gerado pelo método de Saito & Nei (1987) da distância genética entre as populações do Nordeste Paraense (1), Oeste do Pará (2) e Sudeste do Pará (3.....	56
Figura10: Gráfico comparativo entre as médias de heterozigosidade esperada (H_E média) entre as populações investigadas no presente trabalho e os dados da literatura..	61
Figura11: Gráfico comparativo entre as médias do número de alelos por <i>locus</i> (N_A médio) entre as populações investigadas no presente trabalho e os dados da literatura..	62
Figura 12: Gráfico comparativo entre as médias da riqueza alélica entre as populações investigadas no presente trabalho e os dados da literatura.....	63

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Classificação dos microssatélites quanto ao número de nucleotídeos da sequência de repetição.....	19
Tabela2: Exemplos de repetições de microssatélites.....	19
Tabela 3: Indicação do número de indivíduos coletados por município.....	32
Tabela 4: Termociclagem utilizada na PCR.....	34
Tabela 5: Painel multiplex desenvolvido por Hamoy & Santos (2012): F; <i>primer forward</i> ; R, <i>primer reverse</i> ; PD, poder de discriminação; PE, poder de exclusão; CPD, combinado poder de discriminação; CPE, combinado poder de exclusão.....	35
Tabela 6: Índices de Diversidade Genética da população de Bragança (n= 25).....	41
Tabela 7: Índices de Diversidade Genética da população de Capanema (n= 18).....	41
Tabela 8: Índices de Diversidade Genética da população de Peixe-Boi (n=18).....	42
Tabela 9: Índices de Diversidade Genética da população de Tracuateua (n= 18).....	42
Tabela 10: Índices de Diversidade Genética da população de Santarém (n=16).....	43
Tabela 11: Índices de Diversidade Genética da população de Itaituba (n=18).....	43
Tabela 12: Índices de Diversidade Genética da população de Monte Alegre (n=21).....	44
Tabela 13: Índices de Diversidade Genética da população de Óbidos (n=28).....	44
Tabela 14: Índices de Diversidade Genética da população de Oriximiná (n=26).....	45
Tabela 15: Índices de Diversidade Genética da população de Conceição do Araguaia (n=28).....	45
Tabela 16: Comparação pelo teste de Wilcoxon dos valores de riqueza alélica de tabaquis cultivados, provenientes das regiões do Nordeste Paraense, Oeste do Pará e Sudeste do Pará, com populações de tabaquis selvagens.....	46
Tabela 17: Distribuição das frequências alélicas do marcador C μ 01, das populações em estudado.....	46

Tabela 18: Distribuição das frequências alélicas do marcador C μ 03, das populações em estudo.....	47
Tabela 19: Distribuição das frequências alélicas do marcador C μ 04, das populações em estudo.....	47
Tabela 20: Distribuição das frequências alélicas do marcador C μ 05, das populações em estudo.....	48
Tabela 21: Distribuição das frequências alélicas do marcador C μ 07, das populações em estudo.....	48
Tabela 22: Distribuição das frequências alélicas do marcador C μ 08, das populações em estudo.....	49
Tabela 23: Distribuição das frequências alélicas do marcador C μ 09, das populações em estudo.....	50
Tabela 24: Distribuição das frequências alélicas do marcador C μ 10, das populações em estudo.....	50
Tabela 25: Distribuição das frequências alélicas do marcador C μ 12, das populações em estudo.....	51
Tabela 26: Distribuição das frequências alélicas do marcador C μ 13, das populações em estudo.....	51
Tabela 27: Resultados observados no programa Arlequin 3.5.1.3 para as medidas R _{ST} (acima da diagonal) e F _{ST} (abaixo da diagonal).....	53

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 REVISÃO DE LITERATURA	13
2.1 Aquicultura: visão geral	13
2.2 A espécie: <i>Colossoma macropomum</i>	14
2.2.1 Classificação sistemática	14
2.2.2 Biologia da espécie	15
2.3 Genética de populações aplicada à aquicultura	17
2.4 Marcadores microssatélites	18
2.4.1 Características Gerais do Microssatélites	18
2.4.2 Mecanismos de Mutabilidade dos Microssatélites	20
2.4.3 Modelos de Evolução Mutacional de Microssatélites	21
2.5 Estudos genéticos com populações de tambaqui	22
2.5.1 Estudos com populações no meio natural	22
2.5.2 Estudos com populações em meio de cultivo	26
3 JUSTIFICATIVA	29
4 OBJETIVOS	31
4.1 Objetivo geral	31
4.2 Objetivos específicos	31
5. MATERIAL E MÉTODOS	32
5. 1 Aspectos éticos	32
5.2 Coleta das amostras	32
5.3 Extração e mensuração do DNA genômico	34
5.4 Genotipagem	34
5.5 Análises estatísticas	36
6 RESULTADOS	38
6.1 Diversidade genética	39
6.2 Relacionamento genético	52
7 DISCUSSÃO	57
7.1 Diversidade genética	57
7.2 Relacionamento genético	64
8 CONCLUSÕES	66
REFERÊNCIAS	67

1 INTRODUÇÃO

O tambaqui (*Colossoma macropomum*, Cuvier 1818) pertencente à família Characidae e subfamília Serrasalminae. É um peixe de clima tropical oriundo das bacias dos rios Orinoco, Amazonas e seus principais afluentes. Podendo atingir no meio natural 1m de comprimento padrão e pesar até 30 kg (ARAÚJO-LIMA; GOULDING, 1997).

Essa espécie vem sendo cultivada intensamente na última década, devido ao bom sabor de sua carne e a sua rápida adaptação e crescimento em cativeiro (CHAGAS; VAL, 2003). Além de sua rusticidade que permite uma maior resistência a baixos níveis de oxigênio, apresenta também elevada eficiência na conversão alimentar e adaptação ao arraçoamento (FERNANDES *et al.* 2010). Ocupando assim o segundo lugar entre os peixes cultivados no Brasil com produção de 111.084,1 toneladas (t), ficando atrás somente da tilápia (*Oreochromis niloticus*) com produção de 253.824,1 (t) (MPA, 2011).

Na região Norte, o tambaqui desponta como a principal espécie de peixe cultivada (FERNANDES, *et al.* 2010). A demanda por sua carne é a grande razão pela qual muitos pesquisadores e produtores têm intensificado esforços para estabelecer um pacote tecnológico para a criação da espécie (GOMES *et al.* 2003).

É consenso que apenas um pequeno número de espécies de peixes explorados pela piscicultura comercial são essencialmente selvagens (GJEDREM, 2000). Este fato pode levar à perda de variabilidade genética, estudos demonstram que essa perda ou diminuição, da variabilidade, em estoques de pisciculturas ocorre principalmente por manejo reprodutivo inadequado (FROST *et al.*, 2006), deficiência no número efetivo de reprodutores (AHO *et al.*, 2006) e seleção não intencional.

Visando o aumento da produtividade na criação de algumas espécies de peixes têm se empregado com êxito a análise dessa variabilidade genética em populações cultivadas, utilizando marcadores moleculares, como ferramenta para organizar seus programas de manejo reprodutivo (LIU; CORDES, 2004).

Entre esses marcadores moleculares, os microssatélites são os com maior precisão para responder questões de variabilidade genética, estrutura populacional e filogenia em peixes, pois são baseados nas diferentes frequências alélicas em diferentes populações (LIU; CORDES, 2004; NAVARRO *et al.*, 2008). Outra abordagem muito

empregada com microssatélites é a análise de parentesco que revela informações relevantes para o manejo e a conservação de espécies (JONES *et al.*, 2010).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Aquicultura: visão geral

Em seu último documento sobre o estado da pesca e aquicultura no mundo a *Food and Agriculture Organization of the United Nations* (FAO) registrou que a produção aquícola hoje representa 42% do total do suprimento de pescado para alimentação. No total 136,2 milhões de toneladas de pescado são atualmente usados como alimento para a humanidade, provendo uma estimativa 19,2 kg per-capita de pescado (FAO, 2014).

Segundo o Ministério do Meio Ambiente (MMA, 1997) os primeiros estudos científicos com ênfase na criação de peixes (piscicultura), importante ramo da aquicultura, ocorridos no Brasil foram realizados pelo Dr. Rodolpho Von Ihering nos anos de 1920 e 1930. Desde então, a atividade recebeu grande impulso, principalmente a partir de 1970, com a organização e aperfeiçoamento de várias estações de pesquisa e produção.

A partir de 1950 com a introdução de espécies exóticas tais como as carpas (*Cyprinus carpio*), tilápia e a truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*), a piscicultura comercial brasileira teve seu início, essas espécies começaram a ser cultivadas sobretudo em tanques de pequenas propriedades (DIEGUES, 2006).

Vindo a se firmar como uma atividade econômica no cenário nacional da produção de alimentos a partir dos anos 1980, devido à existência de tecnologia compatível com uma criação racional, viabilizando diferentes processos de produção que permitem o escoamento da produção, tanto em larga como em pequena escala (MARTIN *et al.*, 1995).

Com o passar dos anos a piscicultura brasileira tem demonstrado evolução positiva comprovada pelo aumento da produção registrada pelas estatísticas oficiais. Segundo o Ministério de Pesca e Aquicultura (MPA) em 2011, a produção aquícola nacional foi de 628.704,3 toneladas (t), representando um incremento de 31,1% em relação à produção de 2010. Comparando-se essa produção com o montante produzido em 2009 (415.649,0 t), fica evidente o crescimento do setor no país, com um incremento de 51,2% na produção durante o triênio 2009-2011. Seguindo o padrão observado nos anos anteriores, a maior parcela da produção aquícola é oriunda da

aqüicultura continental (cultivo de espécies de água doce), na qual se destaca a piscicultura continental representando 86,6% da produção total nacional (MPA, 2011).

De acordo com o MPA, a análise da produção nacional de pescado oriunda da aqüicultura continental, por Unidade da Federação, para o ano de 2011 demonstrou uma produção de 94.578,0 t no estado do Pará o que corresponde a 17,4%, participação na produção total do país. Entre as espécies a tilápia e o tambaqui foram as mais cultivadas, as quais somadas representaram 67,0% da produção nacional de pescado desta modalidade.

A produção de peixes em cativeiro é a atividade que mais cresce no âmbito da produção de proteína animal do Brasil, quando compara com outras atividades como produção de carne bovina, de aves, suínos (MPA, 2010). Das espécies nativas das bacias hidrográficas brasileiras, o tambaqui é a com maior produção, sendo esta concentrada principalmente nas regiões Norte e Nordeste. O levantamento do MPA mostra também que dois híbridos aparecem nas estatísticas de produção; o tambacu - cruzamento da fêmea do tambaqui, com o macho do pacu (*Piaractus mesopotamicus*) com uma produção de 21.621,40 t (5,5% do total), e a tambatinga resultado do cruzamento da fêmea do tambaqui com o macho da pirapitinga amazônica (*Piaractus brachypomum*).

Somente na região de Manaus, na época do defeso da espécie (novembro a março) mais de 80% do consumo de tambaqui é oriundo de cativeiro (INOUE; BOIJINK, 2011). Isso demonstra que a aquicultura pode ser um meio de produção de alimentos importante para a preservação dos recursos genéticos nativos por aliviar a pressão sobre os estoques pesqueiros, possibilitando a recuperação das populações selvagens que são a permanente fonte de variabilidade genética para os programas de melhoramento dos plantéis de cativeiro (HILSDORF, 2013).

2.2 A espécie: *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818)

2.2.1 Classificação sistemática

O tambaqui foi descrito por George Cuvier em 1818, a espécie tipo ainda se encontra no Museu de História Natural de Paris e apresenta a seguinte classificação taxonômica:

Reino: Animalia

Filo: Chordata

Classe: Actinopterygii

Ordem: Characiformes

Família: Characidae

Subfamília: Serrasalminae

Gênero: *Colossoma*

Espécie: *Colossoma macropomum*

2.2.2 Biologia da espécie

O tambaqui é caracterizado por uma mancha preta distinta próxima do meio do corpo e abaixo da nadadeira dorsal (Figura 1). Essa mancha gradualmente desaparece em exemplares maiores de 75 mm de comprimento. Quando atinge cerca de 30 cm de comprimento, os indivíduos desta espécie perdem sua forma arredondada e tornam-se mais alongado, podendo atingir 1 m de comprimento padrão (CP) e pesar 30 kg (GOULDING, 1988; QUEIROZ & CRAMPTON, 1999).



Figura 1: Exemplar de tambaqui (*Colossoma macropomum*) (FishBase).

Fonte: <http://www.fishbas.org>.

Essa espécie tem ocorrência natural nas bacias do rio Amazonas e do Orinoco. No rio Amazonas, o tambaqui é, comumente, encontrado na foz do rio Xingu, no estado do Pará até o médio rio Ucayali, no Peru (GOMES *et al.*, 2010).

É também encontrado ao longo dos tributários de águas barrentas do rio Amazonas e nas partes baixas dos tributários de águas claras e negras (ARAÚJO-LIMA; GOULDING, 1997). De forma geral, o seu habitat é caracterizado por águas

ricas em nutrientes, como as várzeas amazônicas, com temperatura médias entre 25 a 34°C.

A alimentação natural da larva de tambaqui consiste de zooplâncton, particularmente cladóceros e copépodes, predando espécies maiores que 0,4 mm de largura, inicialmente, mas mudando rapidamente para invertebrados maiores, como quironomídeos, com um semana de vida ou, aproximadamente, 9 mm de comprimento (ARÁUJO-LIMA; GOULDING, 1997). Juvenis de tambaqui continuam a preda intensamente invertebrados, mas sua dieta passa a incorporar sementes pequenas, como de arroz silvestre e pequenas frutas. As sementes são mais abundantes na dieta durante a enchente, quando as plantas frutificam (GOMES *et al.*, 2010).

Os adultos têm uma dieta que consiste, principalmente, de sementes e frutas. Entre as principais sementes ingeridas estão a siringa barriguda (*Hevea spruceana*), o jauari (*Astrocaryum jauari*), e o capitari (*Tabebuia barbata*). Alimentam-se principalmente durante a enchente e a cheia, e migram no rio durante a vazante e a seca. Neste último período, existe uma escassez de frutas e plâncton no rio, e o tambaqui raramente se alimenta, ingerindo, ocasionalmente, folhas e animais (GOMES *et al.*, 2010).

O tambaqui somente se reproduz em águas ricas em nutrientes, que, na Amazônia são os rios de águas barrentas. As condições físico-químicas do rio são bastantes estáveis em toda a coluna d'água próxima à margem: A temperatura varia de 28,5 a 29 °C, e a concentração de oxigênio é superior a 4 mg/L (JUNK, 1973; RICHEY *et al.*, 1986).

A desova ocorre no início da enchente, próximo às margens do rio e, eventualmente, na direção das florestas inundáveis do rio Amazonas e seus tributários (ARÁUJO-LIMA; GOULDING, 1997).

As larvas e jovens se alimentam e crescem na planície de inundação do rio, nesse habitat observam-se variações amplas de temperatura (26-34 °C) e a concentração de oxigênio dissolvido pode atingir níveis muito baixos (0,1-7,4 mg/L) (MELACK; FISHER, 1990). Quando os juvenis atingem cerca de 45 a 60 cm de comprimento padrão (50% da população) ou, aproximadamente, quatro anos de idade, eles iniciam sua maturação sexual e recrutam aos cardumes adultos (VIEIRA *et al.*, 1999). Esses cardumes deixam a várzea na vazante e migram contra a corrente nos rios de águas barrentas. A migração não é contínua e cardumes de tambaqui são encontrados em remansos nas margens dos rios (GOMES *et al.*, 2010).

2.3 Genética de populações aplicada à aquicultura

A variabilidade dos recursos genéticos cultivados assim como nos recursos aquáticos que pode ser entendida como a somatória da diversidade de espécies mais a diversidade molecular dentro e entre espécies, sendo um importante componente da biodiversidade (HILSDORF *et al.*, 2006).

A variabilidade genética ou diversidade genética é usualmente mensurada pelo número de alelos ou pela heterozigosidade de um marcador molecular em uma população (JUANES *et al.*, 2007). A variabilidade intrapopulacional é resultado do balanço entre os processos de mutação, de deriva genética, fluxo gênico e de seleção natural.

O processo mutacional gera variação genética enquanto que a deriva genética diminui a variação genética, o que acarreta a diferenciação interpopulacional (diferenciação genética) e o estabelecimento do fluxo gênico leva a homogeneidade genética entre populações (HAMOY *et al.*, 2014 no prelo).

A seleção natural também pode atuar na redução da diversidade molecular com a fixação de alelos vantajosos. Entretanto, a diversidade molecular não é influenciada somente pela deriva genética, mutação e seleção natural, pode ser influenciada também por eventos históricos (HANFLING; BRANDL, 1998). Um exemplo desses processos na aquicultura é quando plantéis de cativeiro são submetidos a melhoramento genético mesmo que de forma não intencional, ocasiona a modificação de frequências da composição gênica favorecendo genes de interesse para produção em detrimento dos genes evolutivamente selecionados no ambiente natural podendo levar a perda de variabilidade genética (GROSS, 1998).

A redução e a fragmentação de habitat incrementam a ocorrência de deriva genética e reduzem o fluxo gênico entre populações, conseqüentemente, diminuem a variabilidade genética, podendo levar a diferenciação populacional (TEMPLETON *et al.*, 2001). Espécies que vêm sofrendo drásticas reduções no tamanho de suas populações, ou seja, o efeito gargalo de garrafa, apresentam grandes perdas na sua variabilidade genética e estão mais propensas à extinção (CORNUET; LUIKART, 1996).

A perda de variabilidade genética torna uma população mais suscetível à extinção, por esta não apresentar níveis de variação genética capazes de responder a diferentes pressões seletivas ocasionadas, geralmente, por mudanças no meio ambiente (FRANKHAM, 1995; HAIG; AVISE, 1996; REED; FRANKHAM, 2003; RADWAN

et al., 2010). Na Aquicultura, a sustentabilidade dos sistemas produtivos depende de diversas variáveis, especificamente dentro do ponto de vista das espécies, tais como a manutenção da variabilidade e a integridade genética das populações que vão ser fundamentais para a domesticação de novas espécies, bem como do melhoramento genético das espécies atualmente em criação (HILSDORF, 2013).

As preocupações e ações referentes aos impactos sobre a biodiversidade nos ecossistemas aquáticos e/ou cultivados estão muito mais direcionadas para a percepção do desaparecimento de uma dada espécie do que à diminuição da variabilidade genética da mesma. A depauperação da variabilidade genética dentro e entre populações pode ser um componente decisivo para a sobrevivência de uma espécie a médio e longo prazo. (SOLÉ-CAVA, 2001).

O conhecimento das diferenças genéticas entre peixes de diferentes populações, como resultados dos processos evolutivos, é uma etapa importante em programas de conservação de populações selvagens e fundamental para o manejo genético em aquiculturas. Uma vez que se conhece às respostas aos fatores de estresse em peixes, tais como assimilação de oxigênio dissolvido, mobilização de energia para os processos fisiológicos, supressão de fatores imunológicos (BONGA, 1997; VANDEPUTTE; PRUNET, 2002). Qualquer mudança nessa população pode ocasionar padrões gênicos de respostas diferentes principalmente em espécies em ambientes de cultivo (IWAMA *et al.*, 1992; POTTINGER; CARRICK, 1999; PICARD; SCHULTE, 2004).

2.4 Marcadores microssatélites

2.4.1 Características gerais do microssatélites

Os marcadores microssatélites também são conhecidos como “*short tandem repeats*” (STR) ou “*simple sequence repeats*” (SSR), são marcadores nucleares altamente polimórficos, formados por séries de seqüências curtas de DNA repetidas in tandem (em fila). Estas seqüências curtas compõem o locus do microssatélite e podem ser constituídas de um até seis nucleotídeos, sendo nomeadas de acordo com o número de nucleotídeos que as compõem, como di, tri, tetra, penta e hexanucleotídeos, respectivamente (FIELD; WILLS, 1998; TOTH *et al.*, 2000; KELKAR *et al.*, 2010) (Tabela 1).

Vale ressaltar que alguns autores também classificam repetições de sete a nove nucleotídeos como sendo microssatélites para diferenciá-las dos minissatélites que são

compostos por repetições de 10 a 100 nucleotídeos (RICHARD; PÂQUES, 2000; OLIVEIRA *et al.*, 2006; BARGAVA; FUENTES, 2010).

Tabela 1: Classificação dos microssatélites quanto ao número de nucleotídeos da sequência de repetição.

TATGCCTATGCCTATGCCTATGCCTATGCC - Hexanucleotídeo (TATGCC) ₅
TATGCTATGCTATGCTATGCTATGCTATGC - Pentanucleotídeo (TATGC) ₆
TATGTATGTATGTATGTATGTATGTATGTATG - Tetranucleotídeo (TATG) ₈
TATTATTATTATTATTATTATTATTATTATTAT - Trinucleotídeo (TAT) ₁₁
TATATATATATATATATATATATATATATA - Dinucleotídeo (TA) ₁₅

De acordo com dados da literatura, a maioria dos microssatélites isolados é composto de repetições dinucleotídicas (TOTH *et al.*, 2000; GUICHOUX *et al.*, 2011), seguido por mono e tetranucleotídeos e as repetições tri, penta.

Os microssatélites são classificados de acordo com a estrutura da sequência repetida em perfeitos, imperfeitos, interrompidos e compostos. Um microssatélite perfeito apresenta uma sequência de repetição sem nenhuma base que não pertença a ela. Em um microssatélite imperfeito existe um par de bases diferentes entre a sequência de repetição. Em um microssatélite interrompido existe uma pequena sequência de bases entre a sequência de repetição. Enquanto que em um microssatélite composto é formado por dois motivos de repetição distintos e adjacentes. (OLIVEIRA *et al.*, 2006; BARGAVA; FUENTES, 2010) (Tabela 2).

Tabela 2: Exemplos de repetições de microssatélites.

<i>Perfeitos</i>	TATATATATATATATATATATA
<i>Imperfeitos</i>	TATATATACTTATATATATATA
<i>Interrompidos</i>	TATATATACGTGTATATATATA
<i>Compostos</i>	TATATATAGTGTGTGTGTGTGT

A existência de microssatélites em genomas eucarióticos é conhecida desde 1970, mas somente ao final da década de 80 com o advento da técnica da reação em

cadeia da polimerase (PCR) surgiram os primeiros trabalhos com esse marcador, que em geral visavam o isolamento e caracterização (LITT; LUTY, 1989; CRAWFORD; DILKS, 2011).

Por serem abundantes em praticamente todas as espécies, tanto em procariontes quanto eucariontes, mesmo nos menores genomas bacterianos possibilitou muitos trabalhos com esses marcadores e sua introdução, como uma poderosa ferramenta em genética de populações, tornou-se bastante difundida (COX; MIRKIN, 1997; KELKAR *et al.*, 2010).

O tamanho pequeno dos loci microssatélites é importante porque facilita a genotipagem PCR (KARSI *et al.*, 2002). Em geral loci de microssatélites são altamente polimórficos em populações naturais, com altos níveis de heterozigosidade, além de serem freqüentes e bem distribuídos no genoma (JARNE; LAGODA 1996). Estes altos níveis de polimorfismo transformam estes marcadores em importantes ferramentas para estimar variabilidade genética, oferecendo uma melhor possibilidade de entendimento das estruturas populacionais (SLATKIN, 1995; SUN *et al.*, 2009).

2.4.2 Mecanismos de mutabilidade dos microssatélites

Com o alto polimorfismo dos microssatélites, conclui-se que as mutações devem ocorrer com frequência, hipótese que é apoiada por observações diretas (WEBER; LONG, 1993; GEMAYEL *et al.*, 2010).

A instabilidade dos microssatélites é explicada em dois mecanismos. Um deles propõe que esta é causada pelo crossing-over desigual, proveniente da recombinação entre cromossomos homólogos alinhados de forma imperfeita. Este modelo de instabilidade sugere que o fenômeno pode ocorrer em um padrão elevado nos microssatélites em decorrência da presença das repetições, que elevam a probabilidade de perda de pareamento entre os homólogos (SUN *et al.*, 2012; SMITH, 1974; SZOSTAK, 1980). Dessa forma, o crossing-over desigual determina um aumento das deleções em uma molécula de DNA e de inserções na outra (SMITH, 1976; SAWAMURA, 2011).

O outro mecanismo atribuído a instabilidade dos microssatélites ocorre quando há deslizamento da enzima DNA polimerase durante a replicação “*Replication slippage*” (LEVINSON; GUTMAN, 1987; CHEN *et al.*, 2009). Esse fenômeno de deslizamento durante a replicação pode ocorrer quando a fita nascente de DNA,

associada à DNA polimerase, desassocia da fita principal. Este problema quando ocorre em outras partes do genoma não chega a causar danos aparente, uma vez que o pareamento da fita nascente com a fita molde de DNA é restabelecido de forma precisa (LEVINSON; GUTMAN, 1987; ELLEGREN, 2004). Entretanto, se a sequência a ser replicada contém repetições em tandem, a fita nascente de DNA pode parar-se em outra região da fita principal à frente ou atrás da região anteriormente anelada (Figura 2). Dessa forma quando a replicação se restabelece após o deslizamento, a fita de DNA nascente pode tornar-se maior ou menor do que a principal (LEVINSON; GUTMAN, 1987; ELLEGREN, 2004).

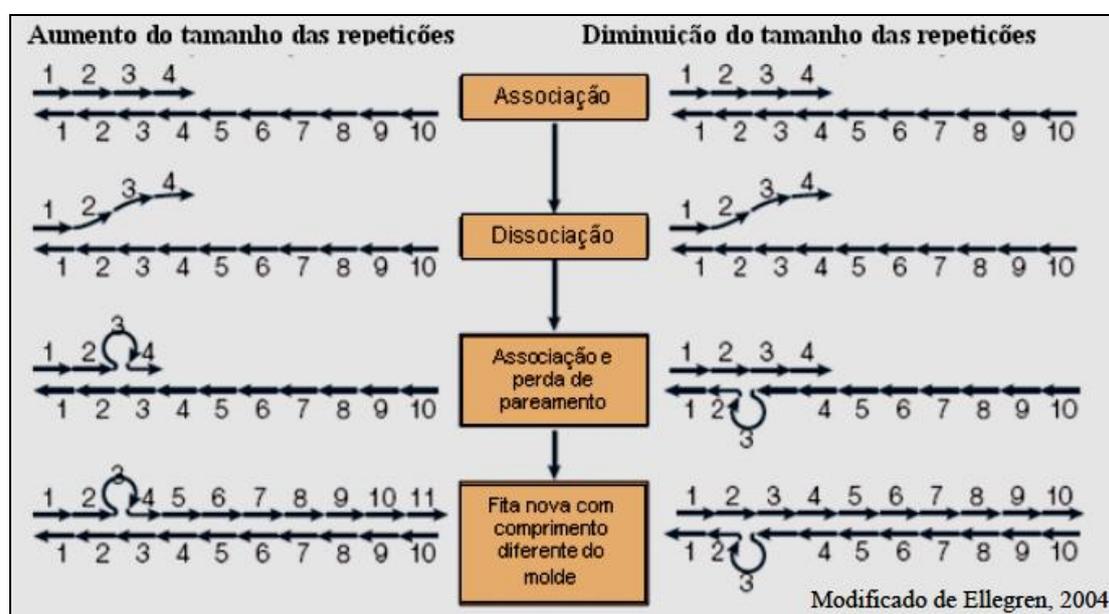


Figura 2: Representação do replication *slippage*.

Fonte: DA SILVA, 2014.

Entre os dois mecanismos atribuídos à mutabilidade de microssatélites, o deslizamento da DNA polimerase parece ser o mais adequado para explicar a instabilidade observada dos microssatélites, pois o mesmo mostra-se pouco afetado por defeitos em genes que estejam envolvidos na recombinação, e mais relacionados com genes envolvidos com defeitos no sistema de reparo (LEVINSON; GUTMAN, 1987; ELLEGREN, 2004).

2.4.3 Modelos de evolução mutacional de microssatélites

O processo de mutação de microssatélite é baseado entre dois modelos: o modelo de alelos infinitos - IAM e modelo passo-a-passo –“*stepwise mutation model*” – SMM (KIMURA; CROW, 1964; KIMURA; OHTA, 1978).

O IAM diz que uma mutação envolve alguns números de repetições e sempre resulta em novo alelo não existente na população. Já SMM descreve mutações nos alelos, que podem levar a perda ou ganho de uma repetição, e os alelos podem sofrer mutações em direção a outro alelo já existente na população, um fenômeno conhecido como homoplasia (DA SILVA, 2014).

Em um estudo com populações humanas foi introduzido um novo modelo, TWO PHASE MODEL – TPM (DI RIENZO *et al.*, 1994). Esse modelo é derivado do SMM, no qual descreve que eventos de mutação frequentemente levam ao aumento ou diminuição de uma unidade de repetições (SMM), entretanto tal modelo também leva em consideração alterações envolvendo um maior número de repetições (DI RIENZO *et al.*, 1994; BALLOUX & LUGON-MOULIN, 2002).

Mesmo com a indefinição sob qual é o modelo mutacional definitivo dos microssatélites, o uso desse marcador não parece ter sido afetado (LEVINSON; GUTMAN, 1987). Uma vez que a sua utilização no mapeamento de genes não apresenta nenhuma limitação, entretanto a utilização em estudos filogenéticos requer cuidados, principalmente quanto ao tempo de divergência entre as populações (RUIZ-LINARES *et al.*, 1999; ESTOUP & GUILLEMAUD, 2010). Nesse sentido, os microssatélites tem uma diversidade de aplicações como marcadores moleculares em mapeamento genético (GALLOWAY *et al.*, 1996; IHARA *et al.*, 2004), em conservação de populações ameaçadas (HANSSON, 2010; SAWAYA *et al.*, 2012), em hibridização e estruturação populacional (ANGERS; BERNATCHEZ, 1997; BRADIC *et al.*, 2012) e em identificação individual e paternidade (BEAUMONT, BRUFORD, 1999; MALIK *et al.*, 2011).

2.5 Estudos genéticos com populações de tabaqui

2.5.1 Estudos com populações no meio natural

Com relação aos trabalhos genéticos envolvendo o tabaqui nativo da bacia amazônica, com exceção de Calcagnotto (1998), utilizando fragmentos do DNA mitocondrial (DNAMt), indicando haver baixa variabilidade genética, todos os outros estudos posteriores a este indicam grande diversidade genética (Santos *et al.*, 2007; Farias *et al.*, 2010; Santos, 2010; Hamoy, 2011; Santos *et al.*, 2009; Hamoy *et al.*, 2011, Hamoy e Santos, 2012; Santana *et al.*, 2012; e Aldea-Guevara *et al.*, 2013; Agostini *et al.*, 2013) como exposto nos estudos abaixo.

Com o objetivo de identificar e caracterizar possíveis bancos genéticos selvagens de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) no Pantanal do Mato Grosso e de tambaqui (*Colossoma macropomum*) na Amazônia, Calcagnotto (1998) utilizou como ferramenta a análise dos padrões de fragmentos de restrição do DNAm_t produzidos por 14 enzimas de restrição. Os resultados obtidos indicaram a ocorrência de baixa variabilidade genética nos estoques selvagens de pacu e tambaqui. A hipótese proposta para explicar esse cenário genético-populacional é fundamentada, principalmente, na história geológica do Pantanal e da Amazônia bem como na grande capacidade migratória do pacu e do tambaqui.

Estudando tambaquês de cinco localidades ao longo da bacia amazônica, Tabatinga, Coari, Parintins, Oriximiná e Santarém, através do polimorfismo da região controle do DNAm_t, Santos *et al.* (2007) observaram alta variabilidade genética em todas as localidades amostradas. As análises de variância molecular (AMOVA) indicaram que quase toda a variância molecular estava contida dentro de localidades, e que as estimativas de fluxo gênico entre as localidades eram altas. Estes resultados sugerem que o tambaqui forma uma população panmítica ao longo do canal do rio Solimões-Amazônia.

Utilizando também a região controle do DNAm_t, Farias *et al.* (2010) analisaram 127 tambaquês do Brasil, 33 do Peru e 75 da Bolívia quanto a diversidade haplotípica total, divergência nucleotídica e índice de divergência populacional entre populações. Seus resultados propuseram que as corredeiras do Rio Madeira que separam a região Amazônica Brasileira da sub-bacia Amazônica Boliviana não são suficientes para impedir o fluxo gênico de populações de tambaqui, confirmando que se trata de uma única população na região estudada com alta variabilidade genética.

Vista a necessidade de novas ferramentas que forneçam informações sobre a ecologia e conservação de populações de tambaqui Santos *et al.* (2009) isolaram e caracterizaram 14 marcadores microssatélites dinucleotídeos que foram testados em 25 tambaquês capturados na cidade de Santarém e arredores, localizada no baixo Amazonas. Todos os marcadores desenvolvidos se mostraram altamente polimórficos, com um número de alelos por locus variando de 4 a 21. A heterozigosidade observada (H_o) e heterozigosidade esperada (H_E) variaram de 0,32000 a 0,96000 e 0,45061 a 0,95102, respectivamente. De acordo com os pressupostos do equilíbrio de Hardy-Weinberg, a frequência dos alelos está dentro do esperado (SANTOS *et al.*, 2009)

Posteriormente Santos (2010), desenvolveu estudos sobre a caracterização e diversidade genética das populações naturais de tabaqui em sua ampla distribuição na bacia Amazônica, através de marcadores microssatélites e marcadores mitocondriais. Foram analisados 1561 pares de base de seqüências do DNA mitocondrial (região controle mais o gene ATPase) de 539 indivíduos e dados de microssatélites de 12 locos de 604 indivíduos.

Entre os resultados encontrados observou-se altos níveis de variabilidade genética em tabaquis de uma ampla área geográfica, envolvendo a calha principal e os tributários da bacia Amazônica. De modo geral, a variação genética encontrada foi homogênea entre as localidades. Na bacia Amazônica brasileira, existe uma única e grande população de tabaqui, com alto fluxo gênico evidenciado pelo número efetivo de fêmeas migrantes por geração, elevadíssimo número de haplótipos, taxa de migração e baixa frequência de alelos exclusivos. Os dois marcadores mitocondriais e os microssatélites não detectaram efeitos da exploração que há cerca de 40 anos acomete à espécie, face à alta diversidade genética. É provável que o tempo de sobre exploração seja curto para ter ocorrido um registro genético ou que o tamanho efetivo populacional foi gigantesco no passado, podendo estar mascarando um sinal genético mais recente (SANTOS, 2010).

Após a publicação de Santos *et al.* (2009), Santana *et al.* (2012) também publicaram 14 novos marcadores microssatélites para tabaqui, todos dinucleotídeos, que foram genotipados em 30 indivíduos capturados no rio Solimões, entre as cidades de Coari e Manaus. O número de alelos para cada locus variou de 4 a 24, os valores de H_O e H_E variou de 0,318 a 1,000 e 0,729 a 0,949, respectivamente. Dos 14 marcadores, nove estão em equilíbrio de Hardy-Weinberg corrigidos pela correção de Bonferroni.

Agostini *et al.* (2013), também isolaram oito microssatélites do tipo dinucleotídeo para genotipar 20 tabaquis coletados na cidade de Oriximiná, localizada no Baixo Amazonas, os resultados mostram alta variabilidade genética.

Novos marcadores microssatélites foram isolados por Hamoy *et al.* (2011), agora em um total de 13 microssatélites tri e tetranucleotídeos. Este painel de microssatélites foi utilizado na genotipagem de 20 tabaquis coletados em lagos da cidade de Óbidos, na Amazônia Brasileira. O número de alelos por locus variou de 4 a 10. A H_E variou entre 0,55 a 0,87. Não foram observados desvios significativos no equilíbrio de Hardy-Weinberg. Nenhum desequilíbrio de ligação significativo foi

encontrado nos pares de loci. Além disso, não foi encontrada nenhuma indicação de erros de genotipagem atribuídos a “*stutter bands*”, perda de alelos ou alelos nulos.

Certificando essa ferramenta como um importante instrumento a ser utilizado em programas de gestão para tabaqui na Amazônia, Hamoy & Santos (2012) utilizaram esses marcadores para o desenvolvimento de um painel multiplex de genotipagem, que foi padronizado em tabaquis coletados na cidade de Juruti no baixo Amazonas.

Utilizando os marcadores tri e tetra nucleotídeo Hamoy (2011), constatou que as populações de tabaqui de Tefé, Manaus, Oriximiná e Santarém apresentam elevada diversidade genética que está distribuída de forma homogênea nessas populações. As populações investigadas não apresentam uma diferenciação genética significativa, sugerindo a existência de uma população panmítica na bacia amazônica. Os níveis de fluxo gênico entre as populações estão elevados, corroborando a homogeneidade genética encontrada entre as populações de tabaqui da bacia amazônica. Não houve congruência nos resultados dos testes de detecção de declínio populacional, apenas as populações de Tefé e Manaus apresentaram um indicativo de gargalo, admitindo o modelo de evolução mutacional TPM, sendo necessário um aprimoramento dessas análises (HAMOY, 2011).

Aldea-Guevara *et al.* (2013) utilizando o painel multiplex de Hamoy & Santos (2012), estudou a variabilidade genética de quatro populações de tabaqui da região do Peru (Shinguito, Ungurahui, Fortuna e Iricahua) observando alta variabilidade genética.

Um dos índices de variabilidade genética obtidos nos estudos acima citados, por marcador microssatélites, para populações selvagens de tabaqui estão expressos na Figura 3.

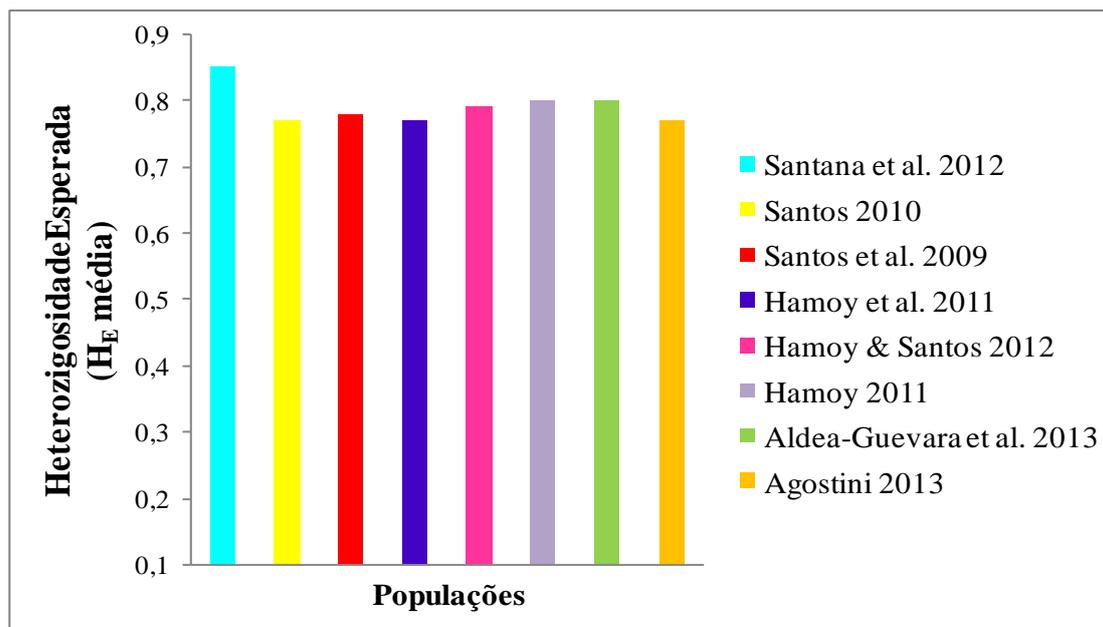


Figura 3: Gráfico comparativo entre as médias de heterozigosidade esperada (H_E média), estimados por microssatélites para populações selvagens de tabaqui.

2.5.2 Estudos com populações em meio de cultivo

O conhecimento e a conservação da variabilidade genética mantida nos estoques de peixe são prioridades atuais da piscicultura brasileira (CALCAGNOTTO; TOLEDO-FILHO, 2000).

Castro (2008) utilizando seqüências da região controle do DNA mitocondrial de 33 amostras de uma piscicultura localizada em Santarém-Pará, encontrou somente dois haplótipos. O mesmo foi encontrado por Cunha (2010) também utilizando seqüências do DNA mitocondrial, mas para 93 indivíduos oriundos de dez pisciculturas da Região Norte.

Para avaliar a diversidade alélica no loco da transferrina em tabaquis cultivados, Calcagnotto & Toledo-Filho (2000) coletaram material em cinco estações de pisciculturas cuja origem dos tabaquis sendo uma do estado do Ceará, duas no estado de São Paulo, uma no estado do Pará e uma no estado de Pernambuco. Desse material foram analisados 437 tabaquis através de eletroforese em gel de poliacrilamida, e apenas três alelos foram encontrados para os 437 indivíduos coletados. No estoque de Pentecoste-CE, que é o mais antigo cultivado no Brasil, foram detectados três alelos enquanto que nos outros quatro estoques, derivados de Pentecoste, só foi detectada a presença de um alelo fixado para a transferrina, caracterizando baixa variabilidade genética.

Lopes *et al.* (2009) ao analisar a diversidade genética de estoques de reprodutores de tambaqui, mediante o uso de marcador RAPD, utilizando 10 iniciadores para analisar 30 amostras do estoques de reprodutores das pisciculturas de Boa Esperança e Vale Verde, localizadas no estado de Rondônia. Constatou que a porcentagem de fragmentos polimórficos e o índice de diversidade genética de Shannon foram altos nos dois estoques de reprodutores; O estoque de reprodutores de Boa Esperança apresentou um fragmento exclusivo; A diferenciação genética foi baixa e o número de migrantes por geração foi alto entre os estoques de reprodutores. O dendrograma não separou os indivíduos dos estoques de reprodutores em grupos distintos. Há alta variabilidade genética nos estoques de reprodutores, um pouco inferior no estoque de Vale Verde, e há grande proximidade genética entre os indivíduos dos estoques de reprodutores.

Assim como Lopes *et al.* (2009), um estudo similar realizado por Jacometo *et al.* (2010) com o objetivo de avaliar a diversidade genética de estoques de tambaqui de diferentes Regiões do Brasil (Urupá-RO, Teixeirópolis-RO, Neópolis-SE e Sorriso-MT) por meio de marcador molecular RAPD encontrou resultados similares. Apresentando alta variabilidade genética dos estoques com maiores valores em Teixeirópolis-RO e em Neópolis-SE, baixa diferenciação e distância genética entre si. (JACOMETO, *et al.*, 2010).

Com um abordagem comparativa Santos *et al.* (2012) avaliaram a variabilidade genética de uma população selvagem de tambaqui com três populações de cativo oriundas de Pentecostes-CE, Jaboticabal-SP e Itacoatiara-AM. Nove sistemas isoenzimáticos foram usados para avaliar a variabilidade genética destas populações, onde foram averiguados o nível de polimorfismo, o número de alelos, das frequências alélicas observadas e esperadas, estatísticas F, distância genética, nível de similaridade e análise de grupo.

Os dados mostraram as populações cultivadas de Pentecostes e Jaboticabal estão com falta de heterozigotos e apresentam-se estruturadas geneticamente em relação às populações de Itacoatiara e da Natureza que apresentam excesso de heterozigotos e não são estruturadas (SANTOS *et al.*, 2012).

Com uma abordagem comparativa Aguiar *et al.* (2013) analisaram seqüências de DNAm, para avaliar diversidade genética entre populações selvagens, um plantel de produção de alevinos, e amostras provenientes de pisciculturas, todos da região de Santarém, no Oeste do estado do Pará.

Níveis similares de diversidade genética foram encontrados em todas as amostras e, surpreendentemente, o plantel mostrou expressiva representação da diversidade genética registrada em populações selvagens. Estes resultados contrastam consideravelmente com os dados Gomes (2012) que indicam uma longa história de endogamia nas matrizes utilizadas para a produção de alevinos naquela região. Com isso esses dois cenários distintos da aquicultura do tambaqui na Amazônia, devem ser melhor avaliados, a fim de garantir o sucesso da expansão da atividade na região, e no resto do Brasil, já que o tambaqui e seus híbridos agora são cultivados em todo o país (AGUIAR *et al.*, 2013).

Nos últimos anos tem ocorrido o cruzamento artificial entre espécies de Characiformes, produzindo os híbridos “Tambacu” e “Tambatinga”. A identificação de híbridos é uma tarefa difícil, em virtude da grande similaridade morfológica entre as espécies parentais (GOMES *et al.*, 2012). Com isso Gomes *et al.* (2012), apresentaram uma abordagem molecular inovadora para identificação de híbridos com base em PCR Multiplex de um gene nuclear (α -Tropomiosina), em que foram testados 93 espécimes obtidos em pisciculturas da região norte do Brasil.

O sequenciamento de um fragmento de 505 pares de bases da Região Controle do DNAm_t permitiu a identificação da linhagem materna de todos os espécimes como sendo de *C. macropomum*. Inesperadamente foram encontrados apenas dois haplótipos nas 93 amostras, um baixíssimo índice de diversidade para populações cultivadas de Tambaqui. A PCR multiplex identificou 42 híbridos, em contraste aos 23 híbridos citados pelos fornecedores dos peixes, em uma identificação realizada com base na morfologia. Esta ferramenta inovadora possui um grande potencial para o desenvolvimento da aquicultura brasileira dada a possibilidade de identificação sistemática das características genéticas tanto das matrizes produtoras de alevinos quanto dos alevinos e juvenis criados em fazendas (GOMES *et al.*, 2012).

3 JUSTIFICATIVA

A piscicultura na região Norte do Brasil vem apresentado um desenvolvimento significativo, com um enorme potencial para sua expansão. Nesse contexto, essa atividade é fundamental para suprir a demanda regional crescente de proteína animal podendo, ainda, contribuir para diminuir a pressão exploratória sobre os estoques naturais (QUEIROZ, 2002)

O tambaqui sendo uma espécie amazônica e a segunda mais cultivada na piscicultura continental, já vem sendo objeto de estudos de programas de melhoramento genéticos desenvolvidos em todo Brasil (MUNIZ *et al.*, 2008). Entre os estudos umas das preocupações é a determinação da variabilidade genética dessa população, visto que, um requisito básico para uma maior probabilidade de sucesso de um programa de seleção ou de reintrodução em espécies ameaçadas é manter a variabilidade genética (HEDRICK *et al.* 1986).

A variabilidade ou diversidade genética é a variedade de alelos e genótipos presente no grupo sob estudo, e constitui a força que dá às populações capacidade de suportar pressões ambientais, diminuindo o risco de extinção. Pode ser medida usando-se estimativas genéticas como polimorfismo, heterozigosidade média e diversidade alélica (FRANKHAM *et al.* 2002).

A determinação da variabilidade genética é importante uma vez que pode mostrar a relação genética entre indivíduos, populações e até mesmo entre espécies diferentes (FERGUSON *et al.* 1995). Muir e Roberts (1993) acrescentam a necessidade de uma prevenção para manter a variabilidade genética do estoque, pois tanto a seleção intencional quanto a não intencional afetam os níveis de variabilidade da população.

A redução da variabilidade genética em populações naturais e cultivadas é decorrente basicamente das modificações naturais no meio ambiente e/ou da ação antrópica, cujas conseqüências são efeitos genéticos como endogamia, “efeito gargalo de garrafa” e alterações no padrão do fluxo gênico (FRANKHAM *et al.* 2002). Segundo Hilsdorf (2013), esta situação é muito preocupante em populações confinadas como as criadas em cativeiro, pois aumentam as chances de endocruzamento, diminuindo a variação genética, tornando os peixes mais vulneráveis a parasitoses, menos tolerantes a mudanças ambientais, menor sucesso reprodutivo entre outros que só reduzem as chances de sobrevivência.

Devido a sua importância econômica para a região amazônica e em virtudes dos problemas atuais relatados de perda de variabilidade genética em estoques de

tabaquis, é evidente a necessidade de estudos genéticos em populações cultivadas, como forma de avaliar os níveis de variabilidade genética nessas populações. Uma vez que estudos relacionados à variação genética de estoques cultivados são prioritários para prevenir impactos genéticos na população e diminuir os riscos de depressão endogâmica nos indivíduos de cativeiro (BATISTA; PETRERE JÚNIOR, 2003; ISAAC; RUFFINO, 2003; GOMES *et al.*, 2012.)

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

O presente estudo tem como objetivo avaliar o nível de variabilidade e relacionamento genético, de populações cultivadas de tabaqui em municípios de diferentes regiões do estado do Pará, utilizando marcadores microsatélites.

4.2 Objetivos específicos

- ✓ Avaliar o nível de variabilidade genética das pisciculturas de tabaqui na região do Nordeste do Pará.
- ✓ Avaliar o nível de variabilidade genética das pisciculturas de tabaqui na região do Oeste do Pará.
- ✓ Avaliar o nível de variabilidade genética das pisciculturas de tabaqui na região do Sudeste do Pará.
- ✓ Comparar o nível de relacionamento genético das pisciculturas de tabaqui entre as diferentes regiões do estado do Pará.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Aspectos éticos

Para a realização deste estudo o projeto foi submetido à Comissão de Ética no Uso de Animais- CEUA, da Universidade Federal Rural da Amazônia- UFRA, com parecer favorável para a sua execução, número de protocolo 031/2013 (CEUA) – 23084.008077/2013-73.

5.2 Coleta das amostras

Foram coletadas amostras, da nadadeira caudal, de 216 tambaquis provenientes de pisciculturas dos municípios de Bragança, Capanema, Peixe-Boi, Tracuateua, Santarém, Itaituba, Monte Alegre, Óbidos, Oriximiná e Conceição do Araguaia (Tabela 3) (Figura 4). Estas amostras foram preservadas em etanol 95% e posteriormente armazenadas a -20°C

Tabela 3: Indicação do número de indivíduos coletados por município, e região de origem.

Município (Abreviatura)	Região Aquícola	Número de Pisciculturas	Número de Amostras
Bragança(BRA)	Nordeste do Pará	6	25
Capanema(CAPA)	Nordeste do Pará	5	18
Peixe-Boi(PB)	Nordeste do Pará	4	18
Tracuateua(TRA)	Nordeste do Pará	6	18
Santarém (STM)	Oeste do Pará	3	16
Itaituba(ITB)	Oeste do Pará	3	18
Monte Alegre(MTA)	Oeste do Pará	3	21
Óbidos(OB)	Oeste do Pará	3	28
Oriximiná(ORX)	Oeste do Pará	3	26
Conceição do Araguaia(CDA)	Sudeste do Pará	10	28
Total		46	216

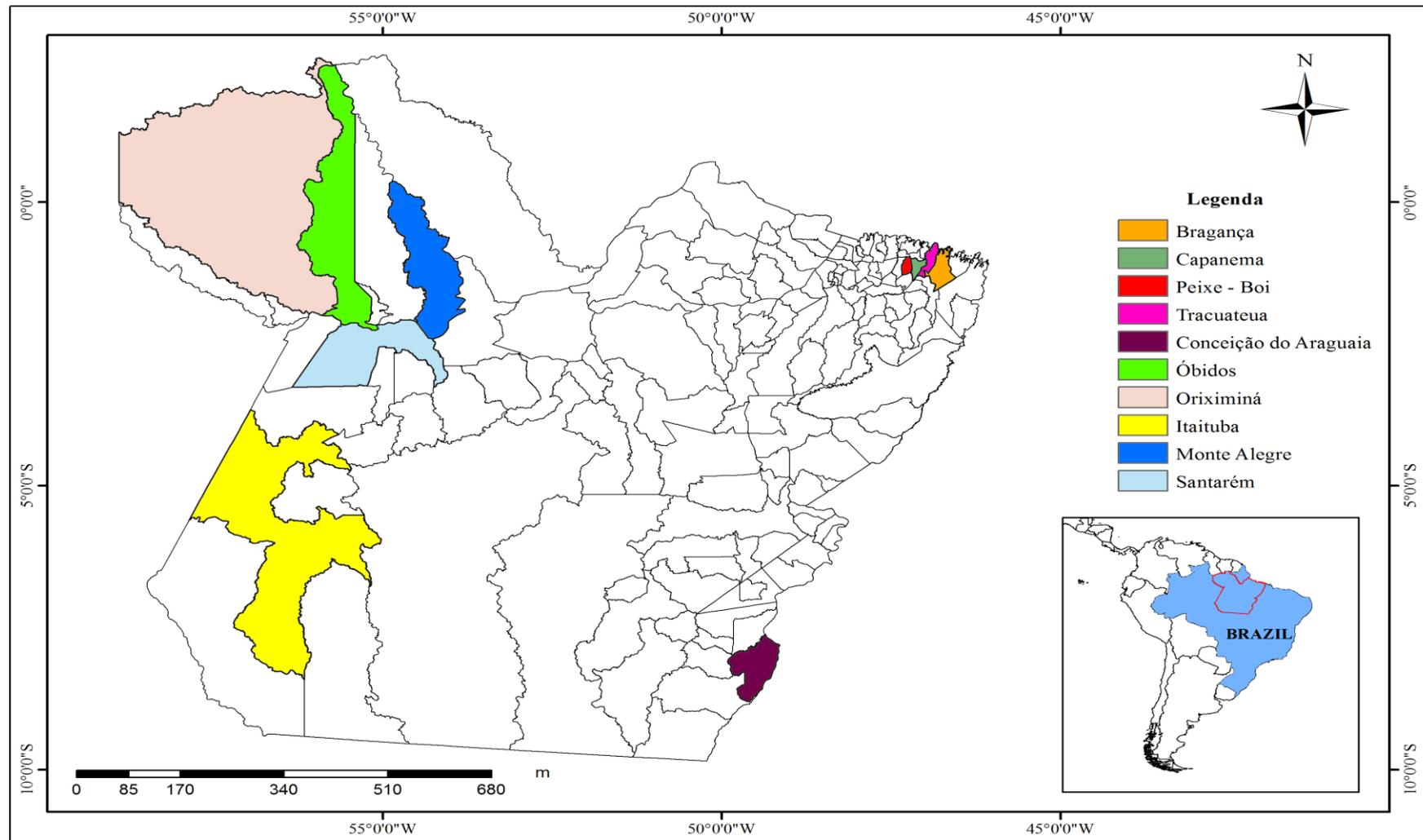


Figura 4: Mapa de localização dos municípios que foram realizadas as coletas das em pisciculturas de tambaqui.

5.3 Extração e mensuração do DNA genômico

A extração do DNA foi realizada com o kit “*Genomic DNA Isolation Kit*”, da Norgen Biotek Corporation.

A concentração do DNA das amostras foi calculada pelo índice de absorvância (A) das bases a 260 nm em espectrofotômetro NanoDrop™ ND-1000 (Thermo Scientific). Após quantificação estas foram padronizadas para uma concentração de 5 ng/μl.

5.4 Genotipagem

As amostras foram genotipadas utilizando o sistema de genotipagem multiplex desenvolvido por Hamoy & Santos (2012), amplificação I (Tabela 5) (Figura 5). As amplificações por PCR foram padronizadas para um volume final de 8 μL, contendo: 6,5 μL de 2X QIAGEN® Multiplex PCR Master Mix (Qiagen); 0,5 μL de mix de primer e 1,0 μL de DNA. Estas foram realizadas no termociclador Veriti (Applied Biosystems) seguindo as seguintes condições, tabela 4.

Tabela 4: Termociclagem utilizada na PCR.

N° de Ciclos	Temperatura (°C)	Tempo (Minutos)
1	95°C	5 min
30	94° C	1 min
30	60° C	1/2 min
30	72° C	1 min
1	72° C	30 min
1	4° C	5 min

Os produtos das PCRs na quantidade de 1μl, foram misturados a 8.5 μL de formamida Hi-Di deionizada (Applied Biosystems) e a 0,5 μL de Gene Scan 500 LIZ (Applied Biosystems) e visualizados no sequenciador automático de capilar Applied Biosystems 3130 Genetic Analyzer.

A genotipagem dos indivíduos foi feita utilizando o programa Gene Mapper 3.7 (Applied Biosystems).

Tabela 5: Painel multiplex adaptado de Hamoy & Santos (2012): F, *primer forward* ; R, *primer reverse*; PD, poder de discriminação; PE, poder de exclusão; CPD, combinado poder de discriminação; CPE, combinado poder de exclusão.

Amplificação	Locus (GenBank)	Primer (5'→3')	Fluorocromo	Mix de primers	PIC	PD	PE
I	Cmacrμ01 (HM579948)	F: *CAGTTCACCCACTCAGCCTT R: AAAACCTGTAGAAGAGCACATGAA	6-FAM	0,2	0,69	0,89	0,51
	Cmacrμ03 (HM579950)	F: *GCATCAAATAGGCACGAGTTCT R: GCTCTCAGCAACACATTACTGG		1,0	0,87	0,97	0,78
	Cmacrμ04 (HM579951)	F: *CCTTTCTATGTTCTCATCCCAA R: GCTTTGTGCGAAGGTTTCA		1,0	0,75	0,92	0,59
	Cmacrμ05 (HM579952)	F: *TCTCTACAGGCCGAACCAAT R: CGCGTCGTTCTTCTCAAAT	HEX	0,2	0,81	0,95	0,69
	Cmacrμ07 (HM579954)	F:* TGCTCACACAGAGAGAAGTGAAG R: GAGTACGGAGGCTGATGAAGAG	NED	0,2	0,69	0,89	0,49
	Cmacrμ08 (HM579955)	F: *ATGTATTGGTGATAGTGATGGGTG R: CGGGTAACACACACAAACCTT		1,25	0,74	0,91	0,58
	Cmacrμ09 (HM579956)	F:* CTGGGATAGGCTCCAGCA R: TGGCACTCCAGCAAACCTG		0,5	0,81	0,95	0,68
	Cmacrμ10 (HM579957)	F:* TAGTTAATCGGTCCAGGTGAGG R:GTTGGCTACTTGGTTATAGAAAATGTT	PET	1,25	0,74	0,92	0,58
	Cmacrμ12 (HM579959)	F: *CTGTGCGTGTGACGTTAATATGT R: TTCTCTGCTCTCCTGACTGCTAC		0,3	0,76	0,92	0,60
	Cmacrμ13 (HM579960)	F: *TTTTAGGCCAGTGATTGTAGTC R: CTGCTGCTTACTATGGGTGAAAG		0,25	0,68	0,87	0,50

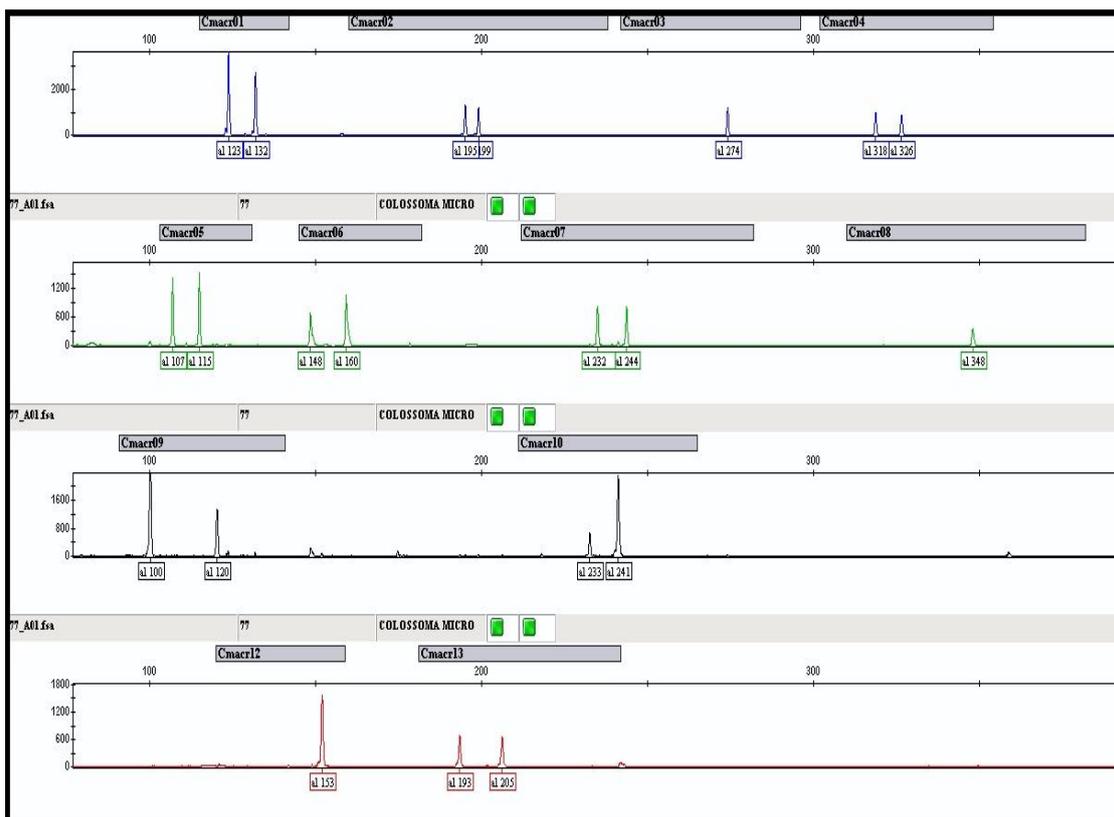


Figura 5: Eletroferograma do painel multiplex de marcadores microssatélites para *Colossoma macropomum*.

Fonte: HAMOY & SANTOS, 2012.

5.5 Análises estatísticas

Para determinar os possíveis erros de genotipagem e a presença de alelos nulos foi utilizado o programa Micro-Checker (VAN *et al.*, 2004).

A heterozigosidade observada (H_O) e esperada (H_E) e seus possíveis desvios do equilíbrio de Hardy-Weinberg foram calculados no programa Arlequin 3.5.1.3 (EXCOFFIER & LISCHER, 2010). Posteriormente, foi empregada a correção de Bonferroni (RICE, 1998) nos p -valores encontrados (p -valor Ajustado < 0,005).

Outros parâmetros de variabilidade genética, como número de alelos por *locus* (N_a) e riqueza alélica (AR), foram estimados utilizando o programa Fstat versão 2.9.3.2 (GOUDET, 2002).

Os valores de riqueza alélica, por não sofrerem influência do tamanho amostral, foram testados pelo teste não paramétrico de Wilcoxon no programa BioStat 5.0 (AYRES *et al.* 2007) para verificar se há diferenças significativas entre os valores encontrado neste estudo, por região aquícola, e os valores disponíveis na literatura para

populações selvagens de tabaqui, caracterizando assim a redução ou não, de variabilidade genética.

O conteúdo de informação polimórfica- PIC (HEARNE *et al.*, 1992), foi calculado no programa Cervus 3.0 (KALINOWSKI *et al.*, 2007).

As frequências alélicas de cada marcador nas diferentes populações foram calculadas com o programa Fstat 2.9.3.2 (GOUDET, 2002).

A diferenciação genética interpopulacional foi verificada com o R_{ST} (distância genética adequada ao modelo mutacional SMM) (SLATKIN, 1995), e ao F_{ST} (distância genética adequada ao modelo mutacional IAM) (WEIR; COCKERHAM, 1984) ambos implementados no programa Arlequin 3.5.1.3 (EXCOFFIER & LISCHER, 2010).

A magnitude da diferenciação entre as populações foi determinada segundo a definição de Wright (1978), caracterizando como pequena valores de 0 a 0,05, moderada valores de 0,05 a 0,15, grande valores de 0,15 a 0,25 e extensa para valores acima de 0,25. Seguida da análise de seu p-valor com nível de significância de 5%.

Para terminar a assinatura genética das populações, estas foram agrupadas em três grandes grupos por região sendo eles: Nordeste do Pará, Oeste do Pará e Sudeste do Pará. Posteriormente no programa no GenAlex (PEAKALL & SMOUSE, 2012) foi realizado um teste de atribuição genética, onde cada indivíduo é classificado como pertencente a sua população de origem ou a outra população.

Foi utilizado o programa Structure 2.2 (PRITCHARD *et al.*, 2000) que utiliza análise bayesiana para inferir o número de populações geneticamente homogêneas (K) com maior probabilidade (média de \ln prob) de ocorrer no banco de dados analisado. Essa análise atribui genótipos individuais para um determinado número de clusters levando a um equilíbrio de Hardy-Heinberg e equilíbrio de ligação em função das frequências alélicas dentro de cada cluster. O número real de K (com maior probabilidade de explicar o banco de dados) é obtido após execução da Cadeia de Markov Monte Carlo (MCMC) com múltiplas simulações entre os clusters atribuídos pelo programa e a variação de K inserida.

Nesta análise utilizou-se 10^6 simulações, com K variando de 1 a 10. Como período de burn-in, foram utilizadas 20.000 simulações. O valor mais provável de K foi determinado pelo método ΔK descrito por Evanno *et al.* (2005) a partir do programa Structure Harvester 0.6.94 (EARL; VONHOLDT, BRIDGETT, 2012). O programa CLUMPP 1.1.2 (JAKOBSSON & ROSENBERG, 2007) foi utilizado para alinhar os coeficientes de associação para cada cluster, para o melhor valor de K. O software

DISTRUCT 1.1.2 (ROSENBERG, 2004) foi utilizado para a representação dos resultados.

Ainda no programa Structure, utilizando o método de Saito & Nei (1987) foi determinado o distanciamento genético entre os clusters informados pelo ΔK , no pacote computacional Phylip 3.6 (FELSENSTEIN, 2005).

6 RESULTADOS

6.1 Diversidade genética

As tabelas de 6 a 15 apresentam estimativas de variabilidade genética que são a heterozigiosidade esperada (H_E), o número de alelos por *locus* (N_A), a riqueza alélica (A_R) e o conteúdo polimórfico informativo (PIC) nas diferentes populações aqui investigadas.

A população de Bragança apresentou H_E variando de 0,555 (Cmac μ 13) a 0,860 (Cmac μ 07). O N_A variando de quatro (Cmac μ 09 e Cmac μ 10) a 11 (Cmac μ 07). As estimativas de A_R variam de 3,048 (Cmac μ 01) a 6,423 (Cmac μ 07). O PIC variou de 0.4951 (Cmac μ 01) a 0.8254 (Cmac μ 07). Dos 10 marcadores testados quanto ao equilíbrio de Hardy-Weinberg para esta população, três deles (Cmac μ 07, Cmac μ 08 e Cmac μ 12) se mostraram fora do equilíbrio (Tabela 6).

A população de Capanema apresentou H_E variando de 0,386 (Cmac μ 01) a 0,860 (Cmac μ 07). O N_A variando de dois (Cmac μ 01) a oito (Cmac μ 07). As estimativas de A_R variam de 1,986 (Cmac μ 01) a 6,187 (Cmac μ 07). O PIC variou de 0.3047 (Cmac μ 01) a 0.8166 (Cmac μ 07). Dos 10 marcadores testados quanto ao equilíbrio de Hardy-Weinberg para esta população, um deles o Cmac μ 12 se mostrou fora do equilíbrio (Tabela 7).

A população de Peixe-Boi apresentou H_E variando de 0,528 (Cmac μ 01) a 0,836 (Cmac μ 07). O N_A variando de dois (Cmac μ 12) a oito (Cmac μ 07). As estimativas de A_R variam de 1,999 (Cmac μ 12) a 6,038 (Cmac μ 07). O PIC variou de 0.3538 (Cmac μ 12) a 0.7921 (Cmac μ 07). Dos 10 marcadores testados quanto ao equilíbrio de Hardy-Weinberg para esta população, três deles (Cmac μ 07, Cmac μ 10 e Cmac μ 12) se mostraram fora do equilíbrio (Tabela 8).

A população de Tracuateua apresentou H_E variando de 0,294 (Cmac μ 01) a 0,804 (Cmac μ 04). O N_A variando de três (Cmac μ 01) a nove (Cmac μ 07). As estimativas de A_R variam de 2,221 (Cmac μ 01) a 5,576 (Cmac μ 07). O PIC variou de 0.2576 (Cmac μ 01) a 0.7485 (Cmac μ 07). Dos 10 marcadores testados quanto ao equilíbrio de Hardy-Weinberg para esta população, quatro deles (Cmac μ 03, Cmac μ 04, Cmac μ 05 e Cmac μ 12) se mostraram fora do equilíbrio (Tabela 9).

A população de Santarém apresentou H_E variando de 0,485 (Cmac μ 09) a 0,895 (Cmac μ 07). O N_A variando de dois (Cmac μ 09) a 10 (Cmac μ 07). As estimativas A_R variam de 2,000 (Cmac μ 09) a 7,009 (Cmac μ 07). O PIC variou de 0.3457 (Cmac μ 09) a

0.8527 (Cmac μ 07) com média de 0.634 (Tabela 10). Dos 10 marcadores testados quanto ao equilíbrio de Hardy-Weinberg para esta população, nenhum deles se mostrou fora do equilíbrio.

A população de Itaituba apresentou H_E variando de 0,447 (Cmac μ 01) a 0,869 (Cmac μ 07). O N_A variando de quatro (Cmac μ 01) a nove (Cmac μ 07). As estimativas A_R variam de 3,173 (Cmac μ 01) a 6,291 (Cmac μ 07). O PIC variou de 0.4068 (Cmac μ 01) a 0.8250 (Cmac μ 07). Dos 10 marcadores testados quanto ao equilíbrio de Hardy-Weinberg para esta população, dois deles (Cmac μ 08 e Cmac μ 12) se mostraram fora do equilíbrio (Tabela 11).

A população de Monte Alegre apresentou a H_E variando de 0,667 (Cmac μ 01) a 0,863 (Cmac μ 07). O N_A variando de quatro (Cmac μ 01) a 12 (Cmac μ 07). As estimativas de A_R variam de 3,285 (Cmac μ 01) a 6,819 (Cmac μ 07). O PIC variou de 0.5851 (Cmac μ 01) a 0.8255 (Cmac μ 07). Dos 10 marcadores testados quanto ao equilíbrio de Hardy-Weinberg para esta população, um deles o Cmac μ 12 se mostrou fora do equilíbrio (Tabela 12).

A população de Óbidos apresentou H_E variando de 0,644 (Cmac μ 13) a 0,879 (Cmac μ 07). O N_A variando de quatro (Cmac μ 09) a 12 (Cmac μ 07). As estimativas de A_R variam de 3,451 (Cmac μ 13) a 6,678 (Cmac μ 07). O PIC variou de 0.5640 (Cmac μ 13) a 0.8476 (Cmac μ 07). Dos 10 marcadores testados quanto ao equilíbrio de Hardy-Weinberg para esta população, quatro deles (Cmac μ 04, Cmac μ 07, Cmac μ 08 e Cmac μ 12) se mostraram fora do equilíbrio (Tabela 13).

A população de Oriximiná apresentou H_E variando de 0,651 (Cmac μ 08) a 0,867 (Cmac μ 07). O N_A variando de quatro (Cmac μ 01) a 10 (Cmac μ 07). As estimativas de A_R variam de 3,501 (Cmac μ 01) a 6,641 (Cmac μ 07). O PIC variou de 0.5081 (Cmac μ 10) a 0.8314 (Cmac μ 07). Dos 10 marcadores testados quanto ao equilíbrio de Hardy-Weinberg para esta população, dois deles (Cmac μ 04 e Cmac μ 08) se mostraram fora do equilíbrio (Tabela 14).

A população de Conceição do Araguaia apresentou H_E variando de 0,171 (Cmac μ 01) a 0,920 (Cmac μ 07). O N_A variando de dois (Cmac μ 01) a 13 (Cmac μ 07). As estimativas de A_R variam de 1,731 (Cmac μ 01) a 8,013 (Cmac μ 07). O PIC variou de 0.1539 (Cmac μ 01) a 0.8873 (Cmac μ 07). Dos 10 marcadores testados quanto ao equilíbrio de Hardy-Weinberg para esta população, um deles o Cmac μ 12 se mostrou fora do equilíbrio (Tabela 15).

Tabela 6: Índices de Diversidade Genética da população de Bragança (n= 25).

<i>Loci</i>	H_O	H_E	N_A	A_R	PIC
Cmacrμ01	0,720	0,586	5	3,048	0.4951
Cmacrμ03	0,640	0,778	9	5,189	0.7305
Cmacro04	0,600	0,748	7	4,815	0.7017
Cmacrμ05	0,542	0,753	6	4,412	0.6951
Cmacrμ07	0,960*	0,860*	11	6,423	0.8254
Cmacrμ08	0,375*	0,747*	5	4,044	0.6838
Cmacrμ09	0,783	0,675	4	3,695	0.6113
Cmacrμ10	0,857	0,693	4	3,751	0.6275
Cmacrμ12	0,240*	0,601*	5	3,092	0.5054
Cmacrμ13	0,680	0,555	5	3,508	0.5050
Média	0,640	0,700	6,1	4,198	0.638

* Marcador fora do equilíbrio de Hardy- Weinberg, após correção de Bonferroni (p-valor ajustado < 0,005).

Tabela 7: Índices de Diversidade Genética da população de Capanema (n= 18).

<i>Loci</i>	H_O	H_E	N_A	A_R	PIC
Cmacrμ01	0,388	0,386	2	1,986	0.3047
Cmacrμ03	0,833	0,801	7	5,294	0.7484
Cmacro04	0,888	0,849	6	5,503	0.8011
Cmacrμ05	0,666	0,727	4	3,697	0.6505
Cmacrμ07	0,888	0,860	8	6,187	0.8166
Cmacrμ08	0,500	0,686	4	3,793	0.6204
Cmacrμ09	0,600	0,531	4	3,387	0.4749
Cmacrμ10	0,818	0,671	5	4,244	0.6013
Cmacrμ12	0,333*	0,654*	5	3,550	0.5748
Cmacrμ13	0,500	0,522	3	2,333	0.4040
Média	0,641	0,669	4,8	3,997	0.600

* Marcador fora do equilíbrio de Hardy- Weinberg, após correção de Bonferroni (p-valor ajustado < 0,005)

Tabela 8: Índices de Diversidade Genética da população de Peixe-Boi (n=18)

<i>Loci</i>	H_O	H_E	N_A	A_R	PIC
Cmacrμ01	0,777	0,528	4	2,665	0.4294
Cmacrμ03	0,722	0,686	5	3,967	0.6210
Cmacro04	0,722	0,719	6	4,549	0.6611
Cmacrμ05	0,666	0,671	3	2,984	0.5786
Cmacrμ07	0,777*	0,836*	8	6,038	0.7921
Cmacrμ08	0,500	0,613	4	3,050	0.5121
Cmacrμ09	0,833	0,694	4	3,737	0.6229
Cmacrμ10	0,588*	0,749*	4	3,869	0.6761
Cmacrμ12	0,000*	0,476*	2	1,999	0.3538
Cmacrμ13	0,667	0,655	5	4,156	0.6020
Média	0,625	0,663	4,5	3,701	0,585

* Marcador fora do equilíbrio de Hardy- Weinberg, após correção de Bonferroni (p-valor ajustado < 0,005)

Tabela 9: Índices de Diversidade Genética da população de Tracuateua (n= 18)

<i>Loci</i>	H_O	H_E	N_A	A_R	PIC
Cmacrμ01	0,222	0,294	3	2,221	0.2576
Cmacrμ03	0,111*	0,695*	5	3,868	0.6182
Cmacro04	0,055*	0,804*	5	4,721	0.7481
Cmacrμ05	0,277*	0,798*	5	4,650	0.7400
Cmacrμ07	0,778	0,797	9	5,576	0.7485
Cmacrμ08	0,889	0,694	4	3,518	0.6123
Cmacrμ09	0,687	0,613	5	3,366	0.5223
Cmacrμ10	0,417	0,764	5	4,251	0.6847
Cmacrμ12	0,222*	0,701*	6	4,172	0.6283
Cmacrμ13	0,777	0,624	4	3,152	0.5313
Média	0,444	0,678	5,1	3,950	0,609

* Marcador fora do equilíbrio de Hardy- Weinberg, após correção de Bonferroni (p-valor ajustado < 0,005)

Tabela 10: Índices de Diversidade Genética da população de Santarém (n=16).

<i>Loci</i>	H_O	H_E	N_A	A_R	PIC
Cmacrμ01	0,867	0,671	5	3,732	0.5939
Cmacrμ03	0,437	0,645	5	3,756	0.5704
Cmacro04	0,687	0,754	6	4,526	0.6898
Cmacrμ05	0,812	0,790	7	5,090	0.7314
Cmacrμ07	1,000	0,895	10	7,009	0.8527
Cmacrμ08	0,562	0,695	6	4,042	0.6226
Cmacrμ09	0,667	0,485	2	2,000	0.3457
Cmacrμ10	0,625	0,697	6	4,136	0.6214
Cmacrμ12	0,461	0,837	6	5,391	0.7765
Cmacrμ13	0,600	0,616	5	3,592	0.5403
Média	0,672	0,709	5,8	4,327	0,634

Tabela 11: Índices de Diversidade Genética da população de Itaituba (n=18).

<i>Loci</i>	H_O	H_E	N_A	A_R	PIC
Cmacrμ01	0,412	0,447	4	3,173	0.4068
Cmacrμ03	0,647	0,756	7	4,728	0.6954
Cmacro04	0,562	0,804	5	4,657	0.7430
Cmacrμ05	0,588	0,784	7	5,163	0.7274
Cmacrμ07	0,706	0,869	9	6,291	0.8250
Cmacrμ08	0,353*	0,830*	6	5,359	0.7791
Cmacrμ09	0,706	0,768	5	4,247	0.7023
Cmacrμ10	0,600	0,722	5	3,987	0.6434
Cmacrμ12	0,294*	0,829*	7	5,553	0.7778
Cmacrμ13	0,470	0,634	6	3,883	0.5692
Média	0,534	0,744	6,1	4,704	0,687

* Marcador fora do equilíbrio de Hardy-Weinberg, após correção de Bonferroni (p-valor ajustado < 0,005)

Tabela 12: Índices de Diversidade Genética da população de Monte Alegre (n=21).

<i>Loci</i>	H_O	H_E	N_A	A_R	PIC
Cmacrμ01	0,632	0,667	4	3,285	0.5851
Cmacrμ03	0,722	0,759	8	5,064	0.7005
Cmacro04	0,600	0,742	6	4,514	0.6814
Cmacrμ05	0,761	0,851	8	5,918	0.8092
Cmacrμ07	0,850	0,863	12	6,819	0.8255
Cmacrμ08	0,562	0,767	6	4,534	0.7001
Cmacrμ09	0,727	0,706	5	4,155	0.6201
Cmacrμ10	0,722	0,841	8	5,777	0.7939
Cmacrμ12	0,450*	0,860*	7	5,958	0.8182
Cmacrμ13	0,667	0,813	7	5,263	0.7639
Média	0,669	0,787	7,1	5,129	0,730

* Marcador fora do equilíbrio de Hardy- Weinberg, após correção de Bonferroni (p-valor ajustado < 0,005)

Tabela 13: Índices de Diversidade Genética da população de Óbidos (n=28).

<i>Loci</i>	H_O	H_E	N_A	A_R	PIC
Cmacrμ01	0,750	0,682	5	3,980	0.6266
Cmacrμ03	0,642	0,670	6	3,837	0.6084
Cmacro04	0,536*	0,773*	7	4,664	0.7218
Cmacrμ05	0,778	0,762	6	4,618	0.7092
Cmacrμ07	0,629*	0,879*	12	6,678	0.8476
Cmacrμ08	0,400*	0,813*	6	4,920	0.7655
Cmacrμ09	0,667	0,741	4	3,841	0.6692
Cmacrμ10	0,577	0,700	5	4,063	0.6402
Cmacrμ12	0,464*	0,860*	8	6,071	0.8254
Cmacrμ13	0,571	0,644	5	3,451	0.5640
Média	0,601	0,752	6,4	4,612	0,698

* Marcador fora do equilíbrio de Hardy- Weinberg, após correção de Bonferroni (p-valor ajustado < 0,005)

Tabela 14: Índices de Diversidade Genética da população de Oriximiná (n=26).

<i>Loci</i>	H_O	H_E	N_A	A_R	PIC
Cmacrμ01	0,560	0,662	4	3,501	0.5929
Cmacrμ03	0,654	0,737	6	4,510	0.6803
Cmacro04	0,640*	0,817*	7	5,120	0.7714
Cmacrμ05	0,846	0,797	7	5,104	0.7525
Cmacrμ07	0,869	0,867	10	6,641	0.8314
Cmacrμ08	0,320*	0,651*	6	3,954	0.5953
Cmacrμ09	0,571	0,717	5	4,154	0.6552
Cmacrμ10	0,458	0,554	5	3,646	0.5081
Cmacrμ12	0,680	0,808	8	5,757	0.7704
Cmacrμ13	0,640	0,760	6	4,719	0.7091
Média	0,624	0,737	6,4	4,711	0,687

* Marcador fora do equilíbrio de Hardy- Weinberg, após correção de Bonferroni (p-valor ajustado < 0,005)

Tabela 15: Índices de Diversidade Genética da população de Conceição do Araguaia (n=28).

<i>Loci</i>	H_O	H_E	N_A	A_R	PIC
Cmacrμ01	0,185	0,171	2	1,731	0.1539
Cmacrμ03	0,625	0,692	8	4,216	0.6280
Cmacro04	0,609	0,703	4	3,692	0.6319
Cmacrμ05	0,926	0,807	6	4,899	0.7598
Cmacrμ07	0,789	0,920	13	8,013	0.8873
Cmacrμ08	0,760	0,815	8	5,754	0.7759
Cmacrμ09	0,800	0,619	5	3,764	0.5660
Cmacrμ10	0,682	0,644	4	3,289	0.5567
Cmacrμ12	0,500*	0,792*	9	5,811	0.7587
Cmacrμ13	0,556	0,750	8	4,921	0.7009
Média	0,643	0,691	6,7	4,609	0,642

* Marcador fora do equilíbrio de Hardy- Weinberg, após correção de Bonferroni (p-valor ajustado < 0,005)

Os parâmetros de riqueza alélica obtidos para as populações deste estudo, quando agrupados por sua região de origem e comparados com os parâmetros de

populações selvagens de tabaqui da literatura, no geral apresentaram significativas diferenças (tabela 16).

Tabela 16: Comparação pelo teste de Wilcoxon dos valores de riqueza alélica de tabaquis cultivados, provenientes das regiões do Nordeste do Pará, Oeste do Pará e Sudeste do Pará, com populações de tabaquis selvagens.

Populações	Riqueza Alélica		
	Nordeste do Pará	Oeste do Pará	Sudeste do Pará
Hamoy (2011)	0.0051	0.0051	0.0051
Aldea-Guevara <i>et al.</i> (2013)	0.0051	0.0051	0.0051

Valores em negritos, apresentaram diferenças significativas ao nível de 0,05.

A distribuição das frequências alélicas dos 10 marcadores microssatélites genotipados, nas populações deste estudo estão representadas nas tabelas de 17 a 25.

Tabela 17: Distribuição das frequências alélicas do marcador Cmacrμ01, das populações em estudado.

Cmacrμ01 (Alelos)	BRA (25)	CAP (18)	PB (18)	TRA (18)	STM (15)	ITB (17)	MTA (19)	OB (28)	ORX (25)	CDA (27)
124	0,360	0,250	0,333	0,139	0,267	0,118	0,263	0,196	0,200	0,093
130	0,060	0,000	0,000	0,028	0,167	0,088	0,237	0,179	0,240	0,000
133	0,020	0,000	0,028	0,000	0,033	0,059	0,026	0,089	0,000	0,000
136	0,540	0,750	0,611	0,833	0,500	0,735	0,474	0,500	0,500	0,907
139	0,020	0,000	0,028	0,000	0,033	0,000	0,000	0,036	0,060	0,000

BRA, Bragança; CAP, Capanema; PB, Peixe-Boi; TRA, Tracuateua; STM, Santarém; ITB, Itaituba; MTA, Monte Alegre; OB, Óbidos; ORX, Oriximiná; CDA, Conceição do Araguaia.

Tabela 18: Distribuição das frequências alélicas do marcador Cmacrμ03, das populações em estudado.

Cmacrμ03	BRA	CAP	PB	TRA	STM	ITB	MTA	OB	ORX	CDA
(Alelos)	(25)	(18)	(18)	(18)	(16)	(17)	(18)	(28)	(26)	(24)
270	0,300	0,389	0,194	0,445	0,531	0,412	0,389	0,161	0,327	0,313
274	0,420	0,389	0,583	0,361	0,281	0,235	0,306	0,500	0,385	0,458
276	0,060	0,000	0,000	0,000	0,031	0,176	0,083	0,250	0,096	0,042
280	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,088	0,028	0,018	0,058	0,000
282	0,000	0,028	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
284	0,000	0,000	0,000	0,083	0,094	0,029	0,028	0,054	0,058	0,042
286	0,040	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
288	0,000	0,000	0,000	0,111	0,063	0,029	0,056	0,018	0,077	0,021
290	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,029	0,056	0,000	0,000	0,104
294	0,180	0,194	0,222	0,000	0,000	0,000	0,056	0,000	0,000	0,021

BRA, Bragança; CAP, Capanema; PB, Peixe-Boi; TRA, Tracuateua; STM, Santarém; ITB, Itaituba; MTA, Monte Alegre; OB, Óbidos; ORX, Oriximiná; CDA, Conceição do Araguaia.

Tabela 19: Distribuição das frequências alélicas do marcador Cmacrμ04, das populações em estudado.

Cmacrμ04	BRA	CAP	PB	TRA	STM	ITB	MTA	OB	ORX	CDA
(Alelos)	(25)	(18)	(18)	(18)	(16)	(16)	(20)	(28)	(25)	(23)
314	0,020	0,111	0,056	0,000	0,031	0,000	0,075	0,018	0,140	0,000
318	0,140	0,167	0,056	0,167	0,250	0,250	0,300	0,339	0,280	0,109
322	0,180	0,167	0,222	0,306	0,031	0,250	0,100	0,107	0,140	0,326
326	0,440	0,194	0,472	0,167	0,156	0,250	0,400	0,196	0,220	0,152
330	0,100	0,222	0,139	0,139	0,406	0,094	0,100	0,054	0,180	0,413
334	0,100	0,139	0,056	0,222	0,125	0,156	0,025	0,268	0,020	0,000
346	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,018	0,020	0,000
360	0,020	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000

BRA, Bragança; CAP, Capanema; PB, Peixe-Boi; TRA, Tracuateua; STM, Santarém; ITB, Itaituba; MTA, Monte Alegre; OB, Óbidos; ORX, Oriximiná; CDA, Conceição do Araguaia.

Tabela 20: Distribuição das frequências alélicas do marcador C μ 05, das populações em estudado.

Cμ05	BRA	CAP	PB	TRA	STM	ITB	MTA	OB	ORX	CDA
(Alelos)	(24)	(18)	(18)	(18)	(16)	(17)	(21)	(27)	(26)	(27)
107	0,000	0,000	0,000	0,111	0,031	0,088	0,048	0,056	0,019	0,000
111	0,042	0,083	0,000	0,194	0,281	0,088	0,119	0,130	0,192	0,037
115	0,313	0,306	0,333	0,278	0,125	0,353	0,214	0,278	0,346	0,204
119	0,125	0,000	0,000	0,000	0,063	0,088	0,214	0,037	0,173	0,000
123	0,146	0,361	0,250	0,139	0,031	0,000	0,214	0,130	0,154	0,185
127	0,354	0,250	0,417	0,278	0,344	0,294	0,095	0,370	0,058	0,241
131	0,000	0,000	0,000	0,000	0,125	0,029	0,024	0,000	0,058	0,074
135	0,021	0,000	0,000	0,000	0,000	0,059	0,071	0,000	0,000	0,259

BRA, Bragança; CAP, Capanema; PB, Peixe-Boi; TRA, Tracuateua; STM, Santarém; ITB, Itaituba; MTA, Monte Alegre; OB, Óbidos; ORX, Oriximiná; CDA, Conceição do Araguaia.

Tabela 21: Distribuição das frequências alélicas do marcador C μ 07, das populações em estudado.

Cμ07	BRA	CAP	PB	TRA	STM	ITB	MTA	OB	ORX	CDA
(Alelos)	(25)	(18)	(18)	(18)	(16)	(17)	(20)	(27)	(23)	(19)
212	0,000	0,000	0,000	0,000	0,031	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
214	0,000	0,000	0,000	0,028	0,063	0,000	0,100	0,019	0,000	0,026
216	0,020	0,000	0,000	0,000	0,000	0,029	0,025	0,019	0,043	0,079
224	0,000	0,000	0,000	0,000	0,031	0,029	0,050	0,000	0,065	0,000
228	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,050	0,019	0,000	0,000
232	0,020	0,083	0,056	0,028	0,094	0,176	0,300	0,185	0,239	0,026
234	0,020	0,000	0,000	0,000	0,156	0,206	0,025	0,130	0,239	0,079
236	0,180	0,111	0,056	0,000	0,156	0,000	0,050	0,167	0,087	0,079
238	0,000	0,083	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
242	0,000	0,000	0,000	0,111	0,000	0,029	0,050	0,000	0,022	0,053
244	0,260	0,222	0,139	0,167	0,000	0,176	0,175	0,093	0,065	0,184
246	0,080	0,000	0,083	0,056	0,094	0,176	0,125	0,111	0,087	0,079

248	0,080	0,111	0,056	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,132
250	0,080	0,028	0,111	0,167	0,188	0,118	0,025	0,185	0,087	0,026
252	0,020	0,000	0,000	0,028	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
254	0,000	0,250	0,000	0,000	0,031	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
256	0,180	0,000	0,333	0,028	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,132
258	0,060	0,111	0,167	0,389	0,156	0,059	0,025	0,056	0,065	0,053
262	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,053
326	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,019	0,000	0,000

BRA, Bragança; CAP, Capanema; PB, Peixe-Boi; TRA, Tracuateua; STM, Santarém; ITB, Itaituba; MTA, Monte Alegre; OB, Óbidos; ORX, Oriximiná; CDA, Conceição do Araguaia.

Tabela 22: Distribuição das frequências alélicas do marcador C μ 08, das populações em estudado.

Cμ08 (Alelos)	BRA (24)	CAP (18)	PB (18)	TRA (18)	STM (16)	ITB (17)	MTA (16)	OB (25)	ORX (25)	CDA (25)
316	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,020	0,000
328	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,031	0,000	0,000	0,040
330	0,000	0,000	0,000	0,000	0,031	0,000	0,000	0,000	0,000	0,100
344	0,000	0,000	0,000	0,000	0,031	0,147	0,000	0,180	0,020	0,040
348	0,125	0,167	0,000	0,000	0,281	0,147	0,313	0,140	0,120	0,180
352	0,333	0,167	0,083	0,333	0,031	0,206	0,156	0,160	0,220	0,360
356	0,208	0,167	0,472	0,056	0,156	0,294	0,344	0,240	0,540	0,100
360	0,313	0,500	0,417	0,194	0,469	0,118	0,125	0,260	0,000	0,100
364	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,088	0,031	0,020	0,080	0,000
376	0,021	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
378	0,000	0,000	0,028	0,417	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,080

BRA, Bragança; CAP, Capanema; PB, Peixe-Boi; TRA, Tracuateua; STM, Santarém; ITB, Itaituba; MTA, Monte Alegre; OB, Óbidos; ORX, Oriximiná; CDA, Conceição do Araguaia.

Tabela 23: Distribuição das frequências alélicas do marcador C μ 09, das populações em estudado.

Cμ09	BRA	CAP	PB	TRA	STM	ITB	MTA	OB	ORX	CDA
(Alelos)	(23)	(15)	(18)	(16)	(6)	(17)	(11)	(18)	(21)	(25)
104	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,029	0,091	0,000	0,048	0,000
108	0,500	0,667	0,472	0,531	0,667	0,353	0,455	0,333	0,238	0,580
112	0,217	0,100	0,250	0,031	0,000	0,235	0,318	0,194	0,452	0,100
116	0,109	0,067	0,167	0,063	0,000	0,206	0,045	0,333	0,167	0,020
120	0,000	0,000	0,000	0,031	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,120
128	0,174	0,167	0,111	0,344	0,333	0,176	0,091	0,139	0,095	0,180

BRA, Bragança; CAP, Capanema; PB, Peixe-Boi; TRA, Tracuateua; STM, Santarém; ITB, Itaituba; MTA, Monte Alegre; OB, Óbidos; ORX, Oriximiná; CDA, Conceição do Araguaia.

Tabela 24: Distribuição das frequências alélicas do marcador C μ 10, das populações em estudado.

Cμ10	BRA	CAP	PB	TRA	STM	ITB	MTA	OB	ORX	CDA
(Alelos)	(21)	(11)	(17)	(12)	(16)	(15)	(18)	(26)	(24)	(22)
137	0,000	0,000	0,000	0,083	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
223	0,000	0,045	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
225	0,476	0,545	0,324	0,292	0,094	0,367	0,278	0,135	0,646	0,455
229	0,000	0,000	0,000	0,000	0,031	0,033	0,056	0,077	0,063	0,000
233	0,119	0,091	0,324	0,250	0,063	0,167	0,111	0,058	0,083	0,045
237	0,214	0,136	0,206	0,333	0,344	0,367	0,194	0,462	0,167	0,114
241	0,190	0,182	0,147	0,042	0,438	0,067	0,194	0,269	0,042	0,386
245	0,000	0,000	0,000	0,000	0,031	0,000	0,111	0,000	0,000	0,000

BRA, Bragança; CAP, Capanema; PB, Peixe-Boi; TRA, Tracuateua; STM, Santarém; ITB, Itaituba; MTA, Monte Alegre; OB, Óbidos; ORX, Oriximiná; CDA, Conceição do Araguaia.

Tabela 25: Distribuição das frequências alélicas do marcador Cmacrμ12, das populações em estudado.

Cmacrμ12	BRA	CAP	PB	TRA	STM	ITB	MTA	OB	ORX	CDA
(Alelos)	(25)	(18)	(14)	(18)	(13)	(17)	(20)	(28)	(25)	(28)
129	0,000	0,028	0,000	0,083	0,192	0,147	0,000	0,000	0,000	0,125
132	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,147	0,150	0,125	0,140	0,054
135	0,020	0,139	0,000	0,028	0,115	0,000	0,100	0,089	0,100	0,018
138	0,420	0,306	0,357	0,361	0,269	0,294	0,200	0,125	0,380	0,107
141	0,000	0,000	0,000	0,000	0,115	0,059	0,150	0,018	0,120	0,054
144	0,040	0,028	0,000	0,056	0,077	0,000	0,225	0,125	0,100	0,107
150	0,040	0,000	0,000	0,056	0,000	0,059	0,075	0,232	0,040	0,071
153	0,480	0,500	0,643	0,417	0,231	0,059	0,100	0,196	0,040	0,411
156	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,235	0,000	0,089	0,080	0,054

BRA, Bragança; CAP, Capanema; PB, Peixe-Boi; TRA, Tracuateua; STM, Santarém; ITB, Itaituba; MTA, Monte Alegre; OB, Óbidos; ORX, Oriximiná; CDA, Conceição do Araguaia.

Tabela 26: Distribuição das frequências alélicas do marcador Cmacrμ13, das populações em estudado.

Cmacrμ13	BRA	CAP	PB	TRA	STM	ITB	MTA	OB	ORX	CDA
(Alelos)	(25)	(18)	(18)	(18)	(15)	(17)	(21)	(28)	(25)	(27)
173	0,100	0,000	0,139	0,361	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,074
185	0,000	0,000	0,000	0,028	0,033	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
193	0,180	0,389	0,111	0,111	0,567	0,559	0,286	0,464	0,400	0,407
197	0,640	0,583	0,556	0,500	0,267	0,235	0,190	0,375	0,100	0,278
201	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,095	0,000	0,140	0,000
205	0,000	0,000	0,000	0,000	0,100	0,029	0,262	0,018	0,240	0,093
209	0,020	0,028	0,056	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
211	0,060	0,000	0,139	0,000	0,000	0,118	0,024	0,089	0,040	0,037
215	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,037
217	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,029	0,071	0,000	0,000	0,000
221	0,000	0,000	0,000	0,000	0,033	0,029	0,071	0,054	0,080	0,000
233	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,056
244	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,019

BRA, Bragança; CAP, Capanema; PB, Peixe-Boi; TRA, Tracuateua; STM, Santarém; ITB, Itaituba; MTA, Monte Alegre; OB, Óbidos; ORX, Oriximiná; CDA, Conceição do Araguaia.

6.2 Relacionamento genético

A tabela 27 apresenta os resultados referentes às comparações dos valores de R_{ST} e F_{ST} das populações investigadas neste trabalho.

Os dados significativos das comparações por R_{ST} , entre as 10 populações, mostram baixa diferenciação entre CDA e OB (0,045), e ORX e STM (0,050). Moderada diferenciação entre TRA x CAP (0,077), BRA (0,079), PB (0,090); STM x PB (0,053), TRA (0,062); ITB x BRA (0,115), CAP (0,094), PB (0,101); MTA x BRA (0,096), CAP (0,071), PB (0,099), STM (0,064); OB x TRA (0,109), ITB (0,090), MTA (0,058); ORX x BRA (0,114), CAP(0,086), PB (0,122), ITB (0,093), OB (0,054); CDA x TRA (0,109), MTA (0,094), ORX (0,121). E alta diferenciação entre TRA x MTA (0,171), ORX (0,174). Por região de estudo as diferenciações significativas foram baixa (0,034) entre Nordeste do Pará e Sudeste do Pará, e moderada (0,051) entre Nordeste do Pará e Oeste do Pará.

Já os dados significativos das comparações por F_{ST} , entre as 10 populações, mostram baixa diferenciação entre BRA x CAP (0,032), TRA(0,035); CAP x PB(0,040), TRA(0,048); TRA x CDA (0,047); STM x ITB(0,033), MTA(0,038), OB(0,046), ORX(0,032); ITB x MTA(0,044), OB(0,028), ORX(0,029); OB x ORX (0,046), MTA(0,040). Moderada diferenciação entre CDA x BRA (0,079), CAP(0,057), PB(0,067), STM(0,060), ITB(0,056), MTA(0,081), OB(0,064), ORX(0,089); BRA x STM(0,080), ITB(0,080), MTA(0,068), OB(0,064), ORX(0,089); CAP x STM(0,072), ITB(0,077), MTA(0,086), OB(0,081), ORX(0,097); PB x STM(0,114), ITB(0,107), MTA(0,089), OB(0,071), ORX(0,108); TRA x STM(0,074), ITB(0,066), MTA(0,091), OB(0,074), ORX(0,091). Por região de estudo houve baixa diferenciação significativa entre Sudeste do Pará com Nordeste do Pará (0,049) e Oeste do Pará (0,050), e moderada diferença (0,059) entre Nordeste do Pará com Oeste do Pará.

Tabela 27: Resultados observados no programa Arlequin 3.5.1.3 para as medidas R_{ST} (acima da diagonal) e F_{ST} (abaixo da diagonal).

Populações	BRA (25)	CAP (18)	PB (18)	TRA (18)	STM (16)	ITB (18)	MTA (21)	OB (28)	ORX (26)	CDA (28)	Nordeste do Pará	Oeste do Pará	Sudeste do Pará
BRA		-0,014	-0,020	0,079	0,036	0,115	0,096	0,010	0,114	0,033	-0,006	0,049	0,033
CAP	0,032		-0,023	0,077	0,033	0,094	0,071	-0,003	0,086	0,027	-0,008	0,029	0,027
PB	-0,012	0,040		0,090	0,053	0,101	0,099	0,006	0,122	0,007	-0,003	0,049	0,007
TRA	0,035	0,048	0,038		0,062	0,067	0,171	0,109	0,174	0,109	0,052	0,110	0,109
STM	0,080	0,072	0,114	0,074		0,053	0,064	0,020	0,050	0,058	0,022	0,006	0,058
ITB	0,080	0,077	0,107	0,066	0,033		-0,008	0,090	0,093	0,005	0,138	0,054	0,005
MTA	0,068	0,086	0,089	0,091	0,038	0,044		0,058	-0,000	0,094	0,087	-0,017	0,09
OB	0,064	0,081	0,071	0,074	0,046	0,028	0,040		0,054	0,045	0,014	0,015	0,045
ORX	0,089	0,097	0,108	0,091	0,032	0,029	-0,001	0,046		0,121	0,094	0,011	0,121
CDA	0,079	0,057	0,067	0,047	0,060	0,056	0,081	0,069	0,079		0,034	0,031	-0,01
Nordeste do Pará	-0,003	0,014	-0,003	0,014	0,074	0,069	0,074	0,064	0,089	0,049		0,051	0,034
Oeste do Pará	0,061	0,069	0,076	0,065	0,013	0,007	0,005	0,013	0,003	0,050	0,059		0,031
Sudeste do Pará	0,079	0,057	0,068	0,047	0,060	0,056	0,082	0,069	0,079	0,018	0,049	0,050	

BRA, Bragança; CAP, Capanema; PB, Peixe Boi; TRA, Tracuateua; STM, Santarém; ITB, Itaituba; MTA, Monte Alegre; OB, Óbidos; ORX, Oriximiná; CDA, Conceição do Araguaia.

Valores em negrito, populações que mostraram diferenças significativas com p -valor > 0.05 .

- Pequena diferenciação genética
- Moderada diferenciação genética
- Grande diferenciação genética
- Extensa diferenciação genética

Ao verificar a assinatura genética das populações em estudo constatou-se que 92% dos indivíduos das populações do Nordeste do Pará são pertencentes a sua população original e 8% dos indivíduos à outra população. Nas populações do Oeste do Pará 81% dos indivíduos são pertencentes a sua população original e 19% dos indivíduos à outra população. E no Sudeste do Pará 71% dos indivíduos pertencem a sua população original e 29% dos indivíduos pertencem à outra população. No total 83% das populações estudadas pertenciam a sua população original e 17% a outra população. Tendo as populações do Nordeste do Pará maior relacionamento genético com a do Sudeste do Pará em relação às do Oeste do Pará (Figura 6).

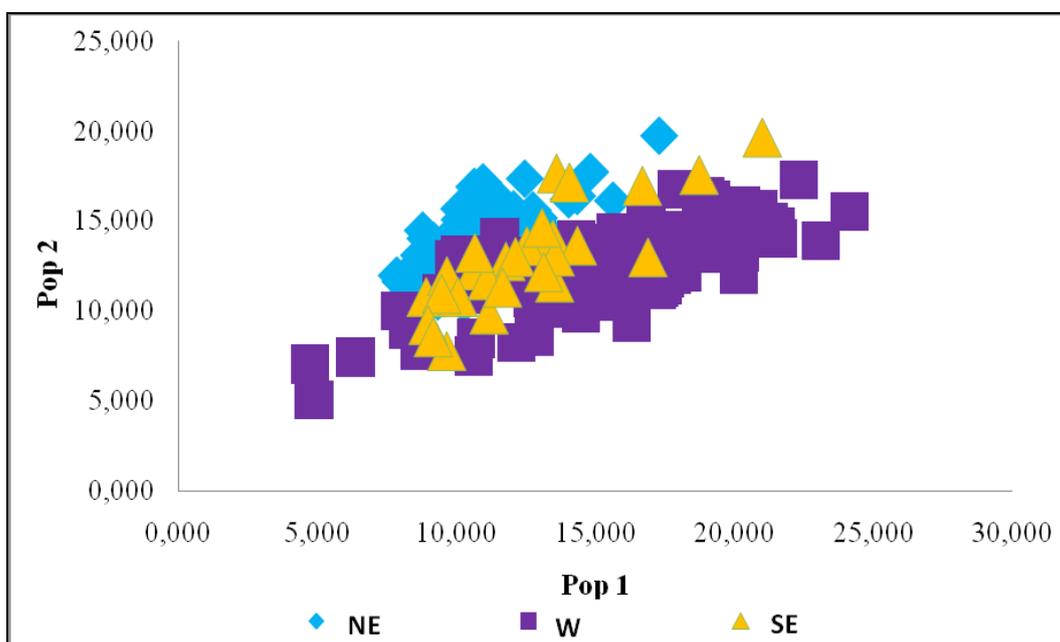


Figura 6: Representação da assinatura genética de populações cultivadas de tabaqui, provenientes de região do Nordeste do Pará (NE), Oeste do Pará(W) e Sudeste do Pará(SE).

O resultado do programa Structure fundamentado na estatística de Evanno *et al.* (2005) obteve ΔK ótimo = 2 (Figura 7). Estruturando uma grande população formada por Nordeste Paraense e Sudeste do Pará (em vermelho) e outra formada pelo Oeste do Pará (Verde) (Figura 8).

O distanciamento genético das populações por região, mostrou uma maior distância genética entre as regiões do Nordeste do Pará e Oeste do Pará, uma baixa distância genética entre Sudeste do Pará e Nordeste do Pará e alta distância entre Oeste do Pará e Sudeste do Pará (Figura 9).

$$\Delta K = \text{m\u00e9dia} (|L''(K)|) / \text{sd}(L(K))$$

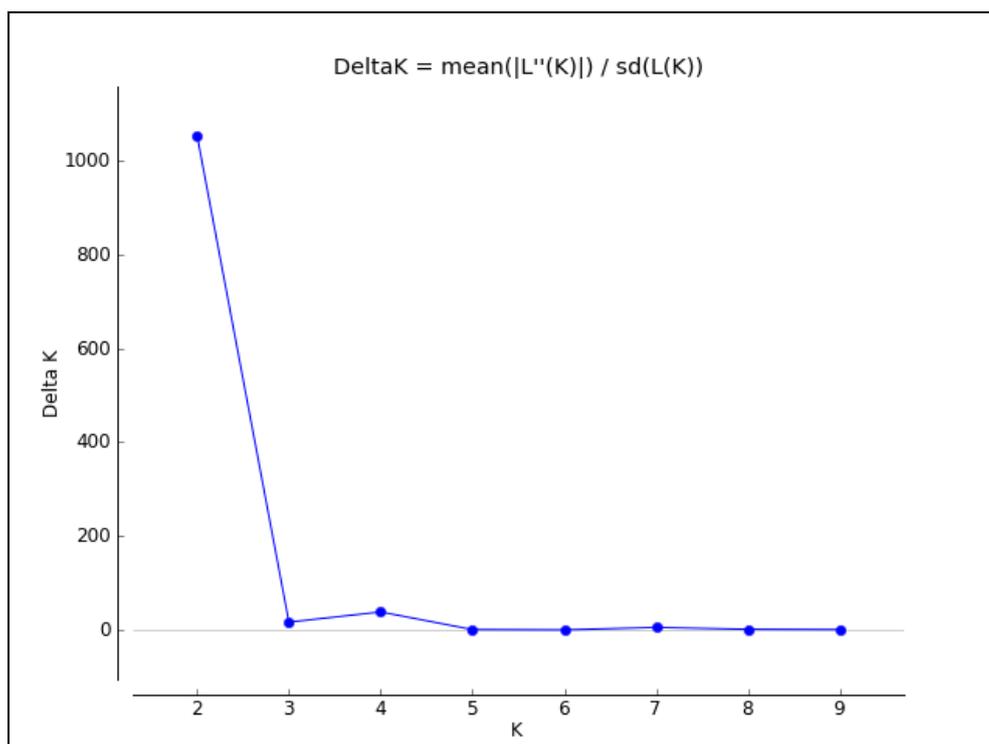


Figura 7: Estimativa do n\u00famero de popula\u00e7\u00f5es de acordo com o m\u00e9todo de Evanno *et al.* (2005), o maior valor de ΔK corresponde ao K \u00f3timo.

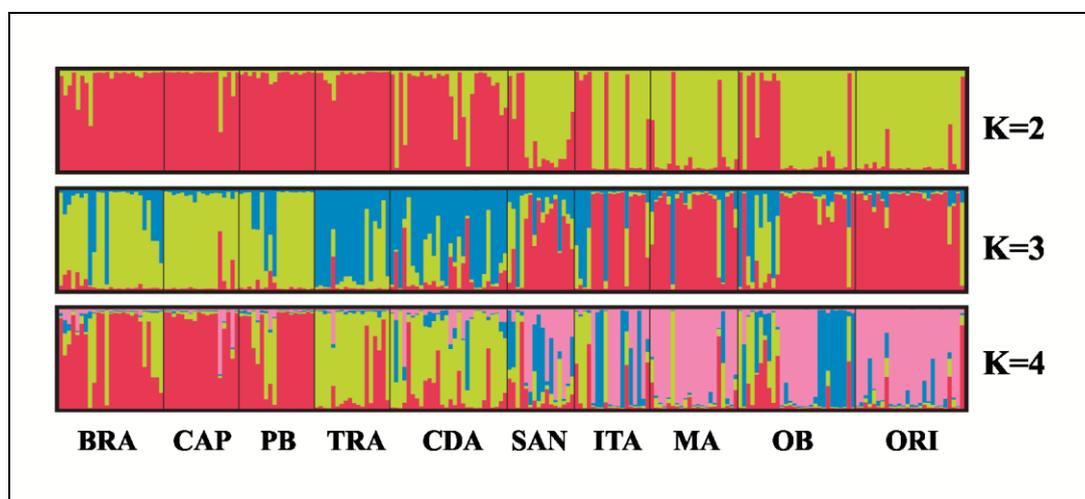


Figura 8: Padr\u00e3o de estrutura\u00e7\u00e3o populacional apoiada pelo STRUCTURE indicando a exist\u00eancia de dois grupos (K=2).

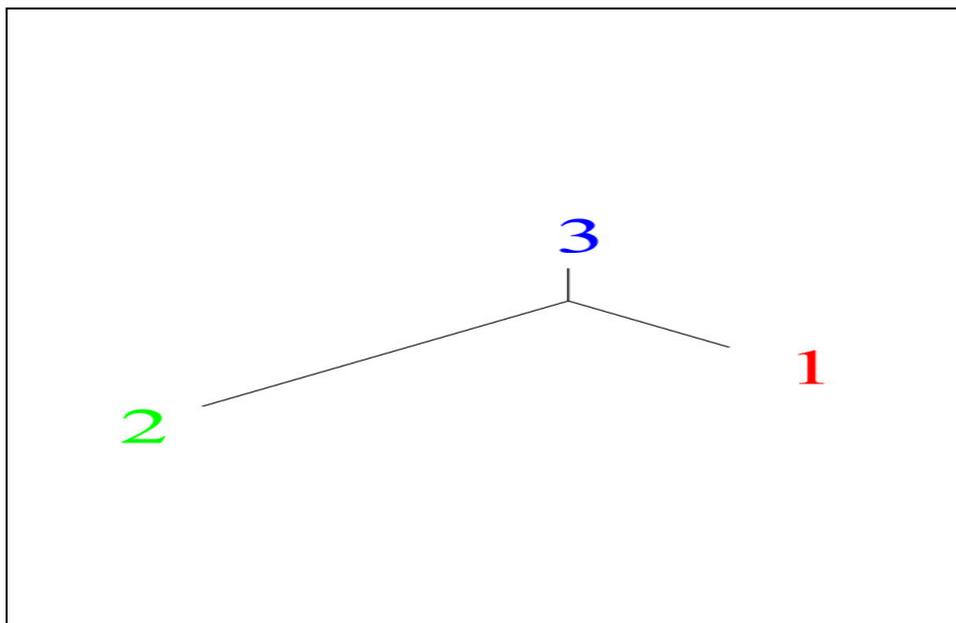


Figura 9: Dendrograma gerado pelo método de Saito & Nei (1987) da distância genética entre as populações do Nordeste do Pará (1), Oeste do Pará (2) e Sudeste do Pará (3).

7 DISCUSSÃO

7.1 Diversidade genética

A variabilidade genética corresponde à variedade de alelos e genótipos dentro de uma população, e entender a distribuição da variação genética dentro e entre populações é necessário para a conservação de espécies (COSTA, 2008). Além de ser crucial para uma população conseguir manter a capacidade natural de responder às mudanças climáticas e a todos os tipos de estresses bióticos e abióticos (MACHADO, 2008).

Para uma espécie muito explorada como o tambaqui, a investigação e descoberta do nível de diversidade genética de suas populações cultivadas é fundamental, visto que poucos estudos com marcadores confiáveis vem sendo desenvolvidos.

Os valores de diversidade genética (H_E) para as populações aqui investigadas, provenientes do Nordeste do Pará e Sudeste do Pará foram, Bragança (H_E média = 0,7), Capanema (H_E média = 0,669), Peixe-Boi (H_E média = 0,663), Tracuateua (H_E média = 0,678), e Conceição do Araguaia (H_E média = 0,691). Esses dados quando comparados com estudos de populações selvagens, estimados com o mesmo painel de marcadores, apresentam-se inferiores como podemos observar, Hamoy *et al.* (2011) (H_E média = 0,77), Hamoy (2011) (H_E média = 0,800), Hamoy & Santos (2012) (H_E média = 0,790) e Aldea-Guevara *et al.* (2013) (H_E média = 0,801) (Figura 10).

As populações do Oeste do Pará apresentaram os valores de H_E , Santarém (H_E média = 0,709), Itaituba (H_E média = 0,744), Monte Alegre (H_E média = 0,787), Óbidos (H_E média = 0,752) e Oriximiná (H_E média = 0,737), bem similares aos das populações selvagens acima citadas (Figura 10). Aguiar *et al.* (2013) ao analisar sequências de DNA mitocondrial, na região do Oeste do Pará, de populações selvagens de tambaqui, com populações cultivadas e plantel de reprodutores, também observou níveis similares de variabilidade. E propôs que este fato, pode estar relacionado com a facilidade de renovação de seus plantéis reprodutores. Uma vez que estão localizadas às margens do rio Amazonas, onde a renovação de seu estoque reprodutor a partir do selvagem é uma operação relativamente simples, forma diferente, as regiões Nordeste Paraense e Sudeste do Pará são distantes geograficamente do ambiente natural dessa espécie.

Essa perda de heterozigosidade, mais acentuada nos municípios do Nordeste do Pará e Sudeste do Pará, já era esperada por se tratar de populações mantidas em cativeiro, que estão realizando acasalamento entre parentais, poucos reprodutores ou

mesmo de um único casal para a obtenção dos alevinos (SOUSA, *et al.*, 2006; POVH *et al.*, 2008; LOPERA BARRERO *et al.*, 2010). O conjunto dessas ações resulta na redução da heterozigosidade permitindo que alelos deletérios recessivos entrem em homozigose (SOUZA, 2007). As conseqüências dessa baixa na variabilidade ao longo do tempo pode ser refletida na diminuição da resistência a doenças (TANIGUCHI, 2003) e da capacidade de adaptação a diferentes condições ambientais (POVH *et al.*, 2008), promovendo com o passar das gerações um afinilamento genético (efeito *bottlencke*) (POVH *et al.*, 2006).

O N_A para as dez populações aqui investigadas foram, Bragança (N_A médio = 6,1), Capanema (N_A médio = 4,8), Peixe Boi (N_A médio = 4,5), Tracuateua (N_A médio = 5,1), Santarém (N_A médio = 5,8), Itaituba (N_A médio média = 6,1), Monte Alegre (N_A médio = 7,1), Óbidos (N_A médio = 6,4), Oriximiná (N_A médio = 6,4) e Conceição do Araguaia (N_A médio = 6,7). Estes apresentaram tendência decrescente comparada com dados de populações selvagens, de Hamoy *et al.* (2011) (N_A médio = 7), Hamoy (2011) (N_A médio = 9,6), Hamoy & Santos (2012) (N_A médio = 8,6) e Aldea-Guevara *et al.* (2013) (N_A médio = 8,58) com exceção da população de monte alegre (Figura 11). De forma similar a H_E o N_A nas populações do Oeste do Pará, apresentou menor perda de variabilidade em relação as demais populações.

Essa baixa no número de alelos reforça as evidências de diminuição de variabilidade genética das populações em estudo. De acordo com Carvalho, Silva & Medeiros (2009) dentro de uma mesma espécie onde alelos (por exemplo, "A" ou "B") são perdidos juntamente com diferentes características, caracteriza-se o fenômeno da erosão genética. No caso das populações deste estudo este fato causa preocupação, uma vez que estas características que estão sendo perdidas não são conhecidas, e poderiam ser de interesse zootécnico e econômico para à atividade.

Os valores de A_R mantiveram um padrão de similaridade entre as 10 populações, Bragança (A_R média = 4,198), Capanema (A_R média = 3,997), Peixe-Boi (A_R média = 3,701), Tracuateua (A_R média = 3,950), Santarém (A_R média = 4,327), Itaituba (A_R média = 4,704), Monte Alegre (A_R média = 5,129), Óbidos (A_R média = 4,612), Oriximiná (A_R média = 4,711) e Conceição do Araguaia (A_R média = 4,609). Estes apresentaram valores inferiores e estatisticamente diferentes, ao nível de 5 %, quando comparados com dados da literatura de Hamoy (2011) (A_R média = 9) e Aldea-Guevara *et al.* (2013) (A_R média = 6,5) (Figura 12).

As populações do Oeste do Pará apesar de nos índices anteriores, tenham conseguido manter valores médios próximos das populações selvagens, esta é clara a perda de variabilidade que acomete também estas populações. A riqueza alélica não sofre influências de diferentes tamanhos amostrais, e é mais sensível aos efeitos de um evento de *boottleneck* se comparada com a heterozigosidade propriamente dita (SPENCER *et al.*, 2000; PETIT *et al.*, 1988). Para estes autores a riqueza alélica é um bom indicador das mudanças demográficas sofridas por uma população.

O PIC dos marcadores neste estudo foram todos acima de 0,5, sendo assim considerados muitos informativos e de boa qualidade (BOTSTEIN *et al.*, 1980).

Com exceção de Santarém todas as demais populações apresentaram *loci* em desequilíbrio de Hardy-Weinberg, sendo eles C_{macr}03 (Tracuateua), C_{macr}04 (Tracuateua, Óbidos e Oriximiná), C_{macr}05 (Tracuateua), C_{macr}07 (Bragança, Peixe Boi, Tracuateua), C_{macr}08 (Bragança, Itaituba, Óbidos e Oriximiná), C_{macr}10 (Peixe-Boi) e C_{macr}12 (Bragança, Capanema, Peixe-Boi, Tracuateua, Itaituba, Monte Alegre e Óbidos) a principal causa foi deficiência de heterozigotos, com exceção do C_{macr}07 para a população de Bragança a qual apresentou excesso de heterozigotos. Casos de desequilíbrio no marcador C_{macr}12, C_{macr}04 e C_{macr}07 são relatados por Aldea-Guevara *et al.* (2013) e Hamoy (2011) sempre por deficiência de heterozigotos.

Esta tendência de baixa na variabilidade genética em populações cultivadas de *C. macropomum*, também foi registrada por Gomes *et al.* (2012), Santos *et al.* (2012) Cunha (2010), Castro (2008) e Calcagnotto & Toledo-Filho (2000), utilizando outros marcadores moleculares.

Vários fatores podem estar interagindo para essa perda de diversidade genética das populações cultivadas, aqui investigadas, em contraste com a população natural. Um importante fator é a seleção de reprodutores que é verificada durante os processos reprodutivos realizados nas pisciculturas produtoras de alevinos da região, esses processos que normalmente incluem a seleção de indivíduos com as melhores características fenotípicas ou reprodutivas podem levar ao acasalamento entre indivíduos geneticamente aparentados e gerar perda de variabilidade (MOREIRA *et al.*, 2007).

Outro fator importante que pode ter influenciado é o efeito fundador, se o plantel for formado com poucos indivíduos ou os indivíduos selecionados não representarem geneticamente as populações originais, pode haver perda de variabilidade

genética, que vai ocasionar a presença de baixas frequências ou ausência de determinados alelos (JACOMETO, *et al.*, 2010).

Contudo, não é possível afirmar que sejam esses os fatores os determinantes, visto que não há registro sobre a formação desses estoques nem tão pouco sobre seu relacionamento genético.

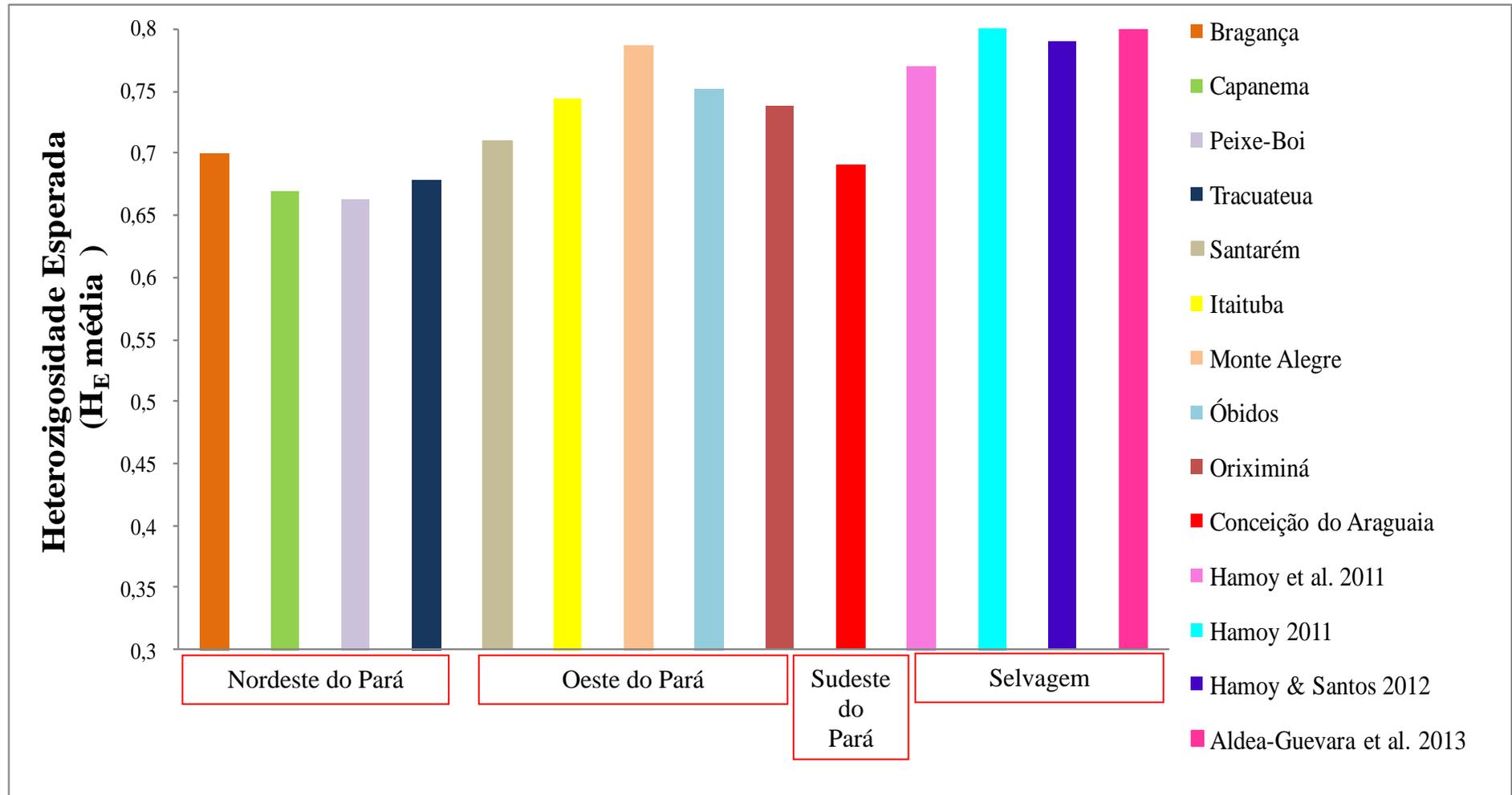


Figura 10: Gráfico comparativo entre as médias de heterozigidade esperada (H_E média) entre as populações investigadas no presente trabalho e os dados da literatura.

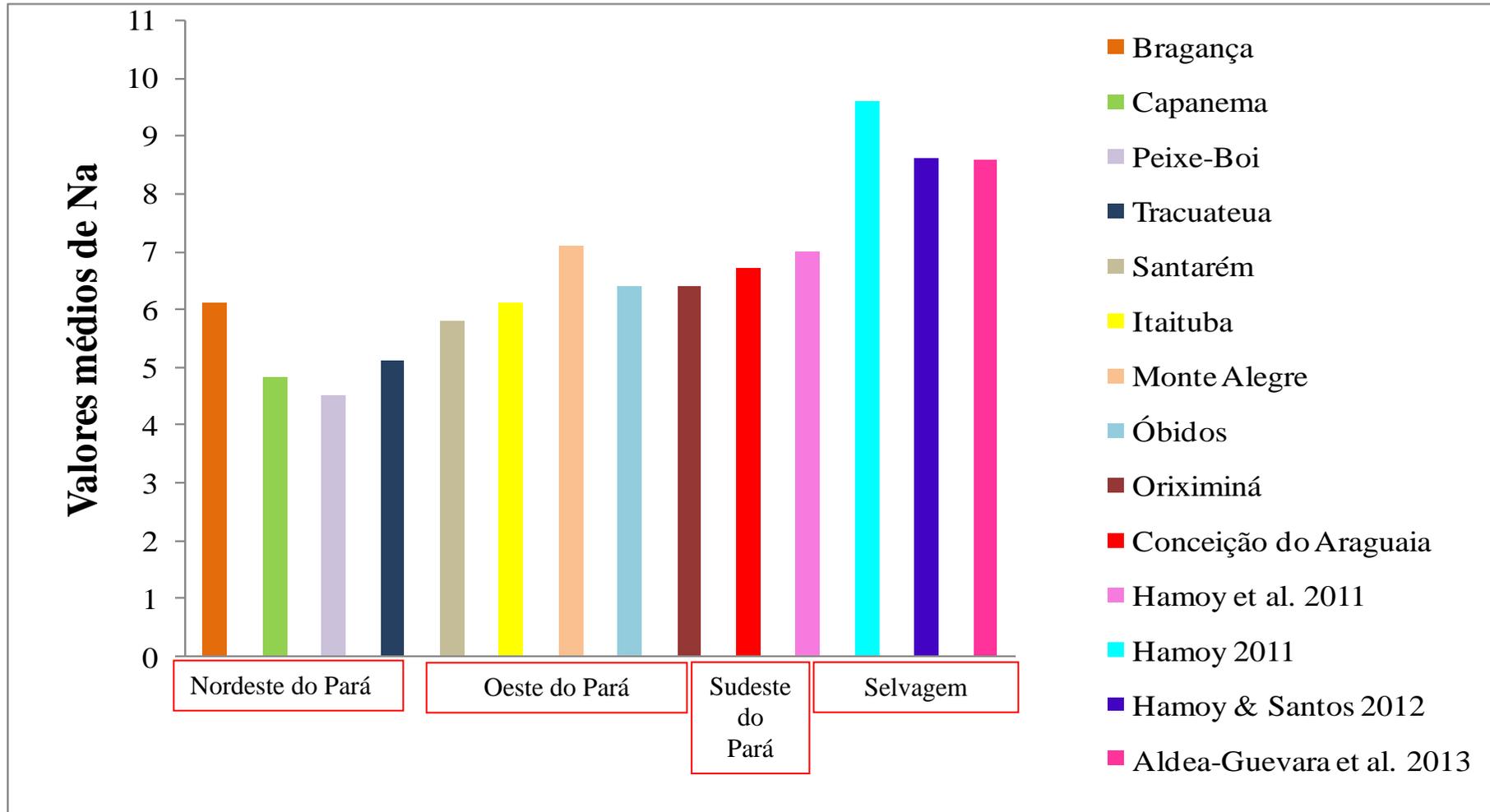


Figura 11: Gráfico comparativo entre as médias do número de alelos por *locus* (N_a médio) entre as populações investigadas no presente trabalho e os dados da literatura.

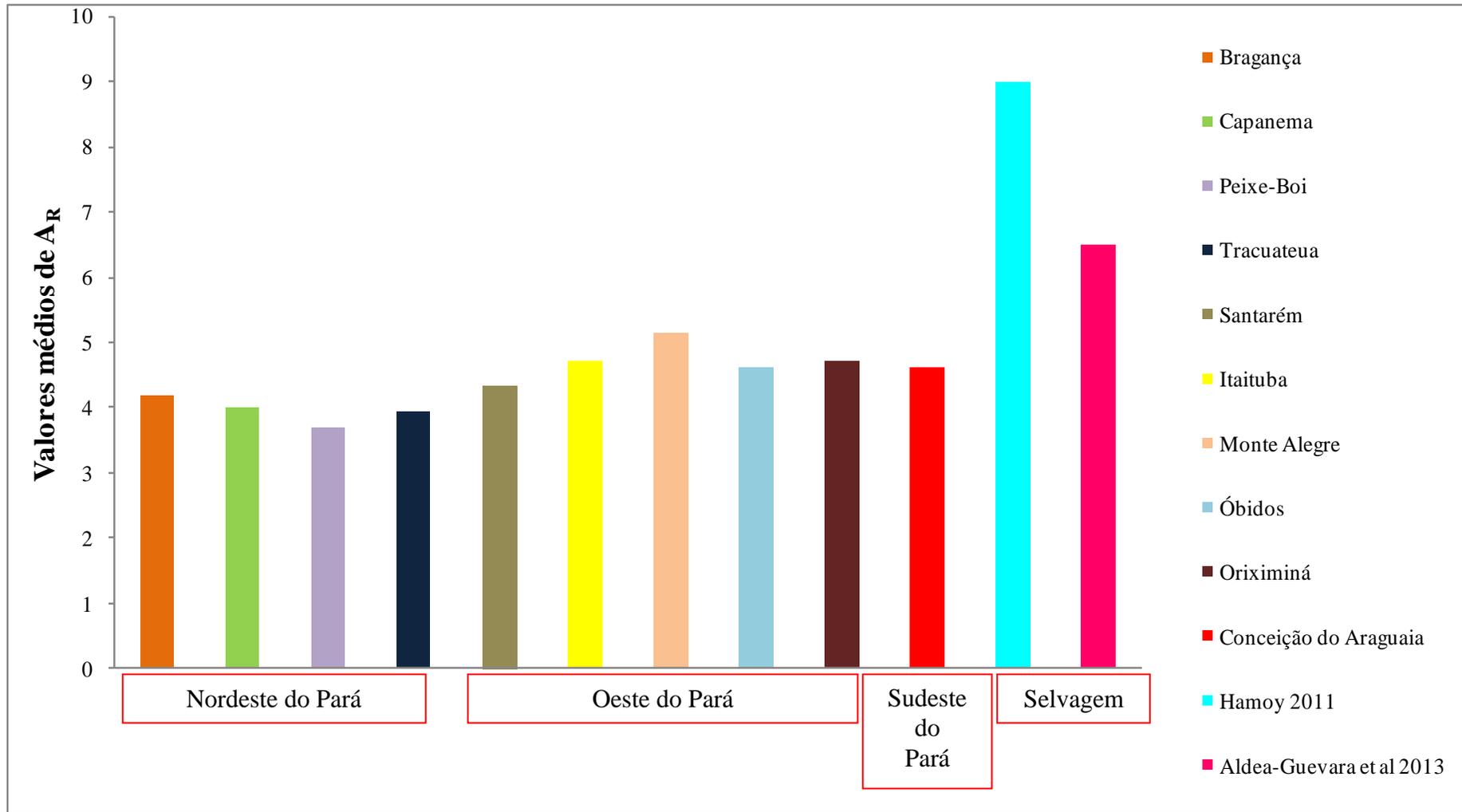


Figura 12: Gráfico comparativo entre as médias da riqueza alélica (A_R médio) entre as populações investigadas no presente trabalho e os dados da literatura.

7.2 Relacionamento genético

O conhecimento das diferenças genéticas dentro e entre populações, sejam elas naturais, raças, variedades ou linhagens de espécie de interesse em cativeiro, é a base para a manutenção da variabilidade genética. Sua manutenção é um importante requerimento para conservação dos estoques das espécies domesticadas que são constantemente submetidas a mudanças ambientais provocadas pelo manejo (HILSDORF *et al.*, 2006).

Para qualquer valor diferente da hipótese nula de panmixia, estimativas de R_{ST} e F_{ST} entre (0 e 0,050) indicam baixo distanciamento genético; entre (0,050 e 0,150) moderado distanciamento genético; entre (0,150 e 0,25) alto distanciamento genético; e acima de 0,25 extenso distanciamento genético (WRIGHT, 1978).

Os resultados de presente estudo apresentaram estimativas de R_{ST} e F_{ST} muito similares. Os dados do F_{ST} mostram claramente dois estoques se diferenciando moderadamente, um formado pelas populações do Nordeste do Pará e outro formado pelas populações do Oeste do Pará.

Este mesmo cenário, de formação de dois estoques, foi observado no teste de assinatura genética, com as populações do Nordeste do Pará e Sudeste do Pará mais relacionadas entre si formando um estoque, e outro formado pelas populações do Oeste do Pará. Corroborando com o resultado de distância genética implementado, que mostra claramente menor distanciamento genético entre as populações do Nordeste do Pará com Sudeste do Pará, e maior distanciamento das populações do Oeste do Pará com as populações do Nordeste do Pará e Sudeste do Pará.

Esse dados ficam evidentes com a análise do K no Structure, onde a partir do resultado de ΔK , observou-se que $K = 2$ foi o cluster mais representativo para todas as 10 populações. Com um estoque formado pelas populações de Bragança, Capanema, Peixe Boi, Tracuateua e Conceição do Araguaia e outro formado por Santarém, Itaituba, Monte Alegre, Óbidos e Oriximiná.

Com isso podemos inferir que as populações do Nordeste do Pará apresentam maior relacionamento e proximidade genética com a população do Sudeste do Pará. Já as populações do Oeste do Pará apresentam baixo relacionamento e distanciamento genético das populações do Nordeste do Pará e Sudeste do Pará.

Este cenário possivelmente é reflexo da perda de variabilidade genética nas populações deste estudo, visto que de acordo com Hilsdorf (2013) a estruturação

populacional é gerada pela perda de variação genética, resultado da diminuição da heterozigosidade esperada na população original.

Com forte influência do efeito fundador dos plantéis reprodutores que foram selecionados para dá origem aos alevinos utilizados no processo de engorda das pisciculturas analisadas. Uma vez que temos um estoque formado por populações do Nordeste do Pará e Sudeste do Pará formado por alevinos provenientes de um mesmo centro de alevinagem, e outro estoque formado pelas populações do Oeste do Pará com alevinos provenientes de outro centro de alevinagem. Sendo assim cada estoque está refletindo a variabilidade genética de seu plantel reprodutor.

O conhecimento da estruturação de genética de qualquer espécie é de grande importância pra a implementação de programas de manejo genético e melhoramento, todavia, para o tambaqui, foram publicados poucos estudos com esta finalidade e nenhum trabalho utilizando marcadores microssatélites Jacometo *et al.*(2010), Lopes *et al.*(2009), Santos *et al.*(2012) Aguiar (2013). Assim, de forma pioneira, o presente estudo caracterizou de forma acurada a estrutura populacional das pisciculturas de tambaqui no estado do Pará.

8 CONCLUSÕES

- ✓ As pisciculturas de tambaqui na região do Nordeste do Pará, apresentam perda de variabilidade genética significativa, em relação as populações selvagens de tambaqui.
- ✓ As pisciculturas de tambaqui na região do Oeste do Pará, apresentam menor perda de variabilidade genética significativa, em relação as populações selvagens de tambaqui.
- ✓ As pisciculturas de tambaqui na região do Sudeste do Pará, apresentam perda de variabilidade genética significativa em relação as populações selvagens de tambaqui.
- ✓ As populações cultivadas de tambaqui, da Região do Oeste do Pará, Nordeste do Pará e Sul do Pará, estão estruturadas em dois estoques.
- ✓ Os resultados obtidos no presente trabalho, representam um grande avanço para a piscicultura amazônica, pois com a caracterização fidedigna da diversidade genética e relacionamento genético das pisciculturas de tambaqui no estado do Pará, utilizando marcadores moleculares acurados como os microssatélites, alavancamos as condições para a realização de programas de manejo e melhoramento genético que visem o aumento da produtividade e da qualidade do pescado, além de diminuir a pressão sobre os estoques naturais dessa importante espécie de peixe da Bacia Amazônica.

REFERÊNCIAS

- AHO, T.; RONN, J.; PIIRONEN, J.; BJÖRKLUND, M. 2006. Impacts of effective population size on genetic diversity in hatchery reared Brown trout (*Salmo trutta* L.) populations. **Aquaculture**, v.253, p. 244-248.
- ALDEA-GUEVARA, M.; HARGROVE, J.; AUSTIN, J.D. 2013. Diversity and geneflow in a migratory frugivorous fish: implications for Amazonian habitat connectivity. **Conserv Genet**. 14:935–942
- AGOSTINI, C.; ALBALADEJO, R. G.; APARICIO, A.; ARTHOFER, W.; BERREBI, P.; BOAG, P. T.; CARBONE, I.; CONROY, G. C.; CORTESERO, A. M.; COSTA GONÇALVES, E.; COSTA, D.; COUTO, A.; DE GIROLAMO, M.; DU, H.; FU, S. J.; GARRIDO-GARDUÑO, T.; GETTOVÁ, L.; GILLES, A.; HAMOY, I. G.; HERRERA, C. M.; HEUSSLER, C.; ISIDRO, E.; JOSSO, C.; KRAPF, P.; LAMONT, R. W. L. E.; RALEC, A.; LOPES, S.; LUÍS, C.; LUO, H.; MAHÉO, F.; MARINO, I. A.; MIEUZET, L.; MURRAY, B. W.; OGBOURNE, S. M.; PALLAVICINI, A.; PAREJO-FARNÉS, C.; PATARNELLO, T.; PATY, C.; PEREIRA, C.; PINHO, C.; PINTO, P.; POINSOT, D.; POWELL, A.; PUTMAN, A. I.; SANTORO, A.; SANTOS, S.; SCHLICK-STEINER, B. C.; SCOTT, C.; SILVANIRAM, B.; SIMKOVÁ, A.; SIMON, J. C.; SOLÉ-CAVA, A.; STEINER, F. M.; SUN, Z.; TORBOLI, V.; TREDWAY, L. P.; VAN COEVERDEN, P. J. G.; VASCONCELLOS, A.; VÁZQUEZ-DOMÍNGUEZ, E.; WANG, D. Q.; WANG, Y. X.; WEI, Q. W.; ZANE, L.; ZHANG, S. H. 2013. Permanent Genetic Resources added to Molecular Ecology Resources Database. Molecular Ecology Resources Primer Development Consortium. **Mol Ecol Resour**. v. 13, n.5, p. 966-8.
- AGUIAR, J.; SCHNEIDER, H.; GOMES, F.; CARNEIRO, J.; SANTOS, S.; RODRIGUES, L. R.; SAMPAIO, I. 2013. Genetic variation in native and farmed populations of Tambaqui (*Colossoma macropomum*) in the Brazilian Amazon: regional discrepancies in farming systems. *Anais da Academia Brasileira de Ciência*, v. 85, p. 1439-1447.
- ANGERS, B.; BERNATCHEZ, L. 1997. Complex evolution of a salmonid microsatellite locus and its consequences in inferring allelic divergence from size information. **Molecular Biology and Evolution**, v.14, p. 230-238.
- ARAÚJO-LIMA, C. A. R. M.; GOULDING, M. 1997. **So fruitful fish: ecology, conservation, and aquaculture of the Amazon's Tambaqui**. New York: Columbia University, 157p.
- AYRES, M.; AYRES JUNIOR, M.; AYRES, D. L.; SANTOS, A. S. 2007. **Biostat 5.0**. Aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas. Belém: MCT; IDSM; CNPQ. 364p.
- BALLOUX, F.; LUGON-MOULIN, N. 2002. The estimation of population differentiation with microsatellite markers. **Molecular Ecology**, v. 11, p.155-165.
- BARGAVA, A.; FUENTES, F. F. 2010. Mutational Dynamics of Microsatellites. **Mol Biotechnol**, v. 44, p. 250-266.

- BATISTA, V. S.; PETRERE JR. M. 2003. Characterization of the commercial fish production landed at Manaus, Amazonas State, Brazil. **Acta Amazonica**, v. 33, p. 53-66.
- BEAUMONT, M. A. ; BRUFORD, M. W. 1999. Microsatellites in conservation genetics. **Microsatellites Evolution and Applications**, p.165-182.
- BONGA, S.E.W. 1997. The stress response in fish. **Physiological Reviews**, v. 77, p. 591-625.
- BOTSTEIN, D.; WHITE, R. L.; SKOLNICK, M. H.; DAVIES, R. W. 1980. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. **American Journal of Human Genetics**, 32, 314-31.
- BRADIC, M.; BEERLI, P.; GARCÍA-DE LEÓN, F. J.; ESQUIVEL-BOBADILLA, S.; BOROWSKY, R. L. 2012 Gene flow and population structure in the Mexican blind cavefish complex (*Astyanax mexicanus*). **BMC Evolutionary Biology**, v. 12, p. 9.
- BRANDT, F. M.; MARSCHELAK, R.; VIBRANS, A.C. Melhoria (Genético) Florestal. Disponível em: <<http://home.furb.br/rubensm/>> Acesso em: 15 abr. 2008.
- CALCAGNOTTO, D. 1998. Caracterização de Bancos Genéticos de Selvagens de Pacu (*Piaractus mesopotamicus*) e de Tambaqui (*Colossoma macropomum*) através de Análise do DNA Mitocondrial. **Tese de Doutorado**. Universidade de São Paulo.
- CALCAGNOTTO, D.; TOLEDO-FILHO, S. A. 2000. Loss of genetic variability at the transferrin locus in five hatchery stocks of tambaqui (*Colossoma macropomum*). **Genetics and Molecular Biology**, v. 23, n. 1, p.127-130.
- CARVALHO, J.M.F.C.; SILVA, M.M.A.; MEDEIROS, M.J.L. 2009. Perda e Conservação dos Recursos Genéticos Vegetais. Embrapa Algodão. Documentos, 221. ISSN 0103-0205. 19p.
- CASTRO, L. A. F. 2008. Comparação da Variação Genética da região D-Loop Mitocondrial em populações naturais e artificiais (estoques de pisciculturas) de Tambaqui. **Dissertação de Mestrado**. Universidade Federal do Pará. p. 44.
- CHAGAS, E. C.; VAL, A. L. 2003. **Efeito da vitamina C no ganho de peso e em parâmetros hematológicos de Tambaqui**. Pesquisa Agropecuária Brasileira v.38, p.397-402.
- CHEN, J. Q.; WU, Y.; YANG, H.; BERGELSON, J.; KREITMAN, M. 2009. Variation in the ratio of nucleotide substitution and indel rates across genomes in mammals and bacteria. **Molecular Biology and Evolution**, v.26, p. 1523-1531.

- CORNUET, J. M.; LUIKART, G. 1996. Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data. **Genetics**, v.144, p. 2001-2014.
- COSTA, F. R. da. Estudo das relações genômicas em espécies de Caricaceae com base em marcadores citomoleculares. **Tese de doutorado**. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro - UENF. Campos dos Goytacazes/RJ. 2008.
- COX, R.; MIRKIN, S. M. 1997. Characteristic enrichment of DNA repeats in different genomes. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.94, p.5237-5242.
- CRAWFORD, D.C.; DILKS, H. H. 2011. **Strategies for Genotyping. Current Protocols in Human Genetics**: 1.3. 1-1.3. 22.
- CUNHA, M. F. G. 2010. Identificação genética de tambaqui, *Colossoma macropomum* (CURVIER, 1818), e dos híbridos tambacu e tambatinga através de marcadores moleculares nucleares e mitocôndrias. **Dissertação de Mestrado**, Programa de Pós-graduação em Biologia Ambiental. Universidade Federal de Pará, p.90.
- DA SILVA , A. R. B. 2014. Isolamento de marcadores microssatélites para o estudo de populações insulares e continentais de Rhinela marina (ANURA, BUFONIDAE) na Amazônia. **Dissertação de Mestrado** apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia Ambiental (Mestrado em Biologia de Organismos da Zona Costeira Amazônica), no Instituto de Estudos Costeiros da Universidade Federal do Pará.117p.
- DI RIENZO, A.; PETERSON, A. C.; GARZA, J. C.; VALDES, A. M.; SLATKIN, M. 1994. Mutational processes of simple-sequence repeat loci in human populations. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 91, p. 3166-3170.
- DIEGUES, A. C. 2006. **Para uma aqüicultura sustentável do Brasil**. NUPAUB – Núcleo de Apoio à Pesquisa sobre Populações Humanas e Áreas Úmidas Brasileiras – USP. São Paulo. Artigo nº 3.
- EARL, D. A. & VON HOLDT, B. M. 2011. STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. **Conservation Genetics Resources** 4(2): 359–361.
- ELLEGREN, H. 2004. Microsatellites: simple sequences with complex evolution. **Nature Reviews Genetics**, v. 5, p. 435-445.
- ENGLBRECHT, C. C.; SCHLIEWEN, U.; TAUTZ, D. 2002. The impact of stocking on the genetic integrity of Arctic charr (*Salvelinus*), populations from the Alpine region. **Mol Ecol**, v.1, p. 1017- 1027.
- ESTOUP, A.; GUILLEMAUD, T. 2010. Reconstructing routes of invasion using genetic data: why, how and so what? **Molecular Ecology**, v. 19, p. 4113-4130.
- EVANNO, G.; REGNAUT, S.; GOUDET, J. 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. **Molecular Ecology** 14(8): 2611–2620.

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

FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. 2014 **El estado mundial de la pesca y la acuicultura**. Oportunidades y desafíos. 274p.

FARIAS, I. P.; TORRICO, J. P.; GARCIA-DA-VILA, C.; SANTOS, M. C. F.; HRBEK T.; RENNO J. F. 2010. Are rapids a barrier for floodplain fishes of the Amazon basin? A demographic study of the keystone floodplain species *Colossoma macropomum* (Teleostei: Characiformes). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 56 (3), p. 1129-1135.

FELSENSTEIN, J. 2005. **PHYLIP (Filogenia Inference Package) versão 3.6**. Distribuído pelo autor. Departamento de Ciências do Genoma da Universidade de Washington, Seattle.

FERGUSON, A.; TAGGART, J. B.; PRODHOL, A. 1995. The application of molecular markers to the study and conservation of fish population with special reference to Salmo. **Journal of Fish Biology**, v.47, p. 103-126.

FERNANDES, T. R. C.; DORIA, C. R.C.; MENEZES, J. T. B. 2010. Características de carcaça e parâmetros de desempenho do tambaqui (*Colossoma macropomum*, Cuvier, 1818) em diferentes tempos de cultivo e alimentado com rações comerciais. **Bol. Inst. Pesca, São Paulo**, v. 36(1), p. 45 – 52.

FIELD, D; WILLS, C. 1998. Abundant microsatellite polymorphism in *Saccharomyces cerevisiae*, and the different distributions of microsatellites in eight prokaryotes and *S. cerevisiae*, result from strong mutation pressures and a variety of selective forces. **Proc Natl Acad Sci USA**. v. 95, p. 1647-1652.

FISHBASE. Disponível em : <http://www.fishbas.org>. Acesso em 17 de maio, 2014.

FRANKHAM, R. 1995. Inbreeding and extinction – a threshold effect. **Conserv. Biol.** v. 9, p. 792-799.

FRANKHAM, R.; BALLOU, J. R.; BRISCOE, D. A. 2002. **Introduction to Conservation Genetics**. Cambridge University Press. Cambridge, England. 617p.

FROST, L. A.; EVANS, B. S.; JERRY, D. R. 2006. Loss of genetic diversity due to hatchery culture practices in barramundi (*Lates calcarifer*). **Aquaculture**, v. 261, p.1056-1064.

GALLOWAY, S. M.; HANRAHAN, V.; DODDS, K. G.; POTTS, M. D.; CRAWFORD, A. M. 1996. A linkage map of the ovine X chromosome. **Genome Research**, v. 6, p.667-677.

GEMAYEL R, VINCES MD, LEGENDRE M, VERSTREPEN KJ. 2010. Variable tandem repeats accelerate evolution of coding and regulatory sequences. **Annual Review of Genetics**, v. 44, p. 445- 477.

GJEDREM, T. 2000. Genetic improvement of cold-water fish species. **Aquac Res**, v. 31, p.25-33.

GOMES, L. C.; ARAUJO-LIMA, C. A. R. M.; ROUBACH, R.; URBINATI E. C. 2003. Avaliação dos efeitos da adição de sal e da densidade no transporte de tambaqui. **Pesq. agropec. bras., Brasília**, v. 38, n. 2, p. 283-290.

GOMES, L. C.; SIMÕES, L. N.; ARAUJO-LIMA, C. A. R. M. 2010. Tambaqui (*Colossoma macropomum*). In: **Espécies Nativas para Piscicultura no Brasil**. Bernardo Baldissero e Levy de Carvalho Gomes (Org.). 2 ed. Editora UFSM. 608p.

GOMES, F.; SCHNEIDER, H.; BARROS, C.; SAMPAIO, D.; HASHIMOTO, D.; PORTO-FORESTI, F.; SAMPAIO, I. 2012. Innovative molecular approach to the identification of *Colossoma macropomum* and its hybrids. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v.84, p. 517-525.

GOUDET, J, 2002. **FSTAT, a Program to Estimate and Test Gene Diversities and Fixation Indices**. (version 2.9.3.2) Available at. Disponível em: <http://www.unil.ch/izea/software/fstat.html>.

GOULDING, M. 1988. **Ecology and management of migratory food fishes of the Amazon Basin**. In: Almeida, F. AND Pringle, C.M. (eds.). Tropical rainforests, diversity and conservation. California Academy of Sciences, San Francisco: p.71-85.

GROSS, M. R. 1998. One species with two biologies: Atlantic salmon (*Salmo salar*) in the wild and in aquaculture. **Canadian Journal of Aquatic and Fisheries Science**, v. 55, p. 131-144.

GUICHOUX, E.; LAGACHE, L.; WAGNER, S.; CHAUMEIL, P. LEGER. P.; LEPAIS, O.; LEPOITTEVI, C.; MALAUSA, T.; REVARDEL, E.; SALIN, F. 2011. Current trends in microsatellite genotyping. **Mol Ecol Resour**, v. 11, p. 591-611.

HAIG, S. M.; AVISE, S. M. 1996. Avian Conservation Genetics. In: **Avise JC and Hamrick JR (Eds.) Conservation Genetics: case histories from nature**. Chapman and Hall, New York, p. 160-189.

HAMOY, I. G. 2011. Desenvolvimento de um painel multiplex de microssatélites para o tambaqui (*Colossoma macropomum*, characiforme: serrasalmidae): Ferramenta eficiente para aplicação em manejo e conservação. **Tese de Doutorado**, apresentada ao programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular. Universidade Federal do Pará. Belém. 136p.

HAMOY, I. G.; CIDADE, F.W.; BARBOSA, M. S.; GONÇALVES, E. C.; SANTOS, S. 2011. Isolation and characterization of tri and tetranucleotide microsatellite markers for the tambaqui (*Colossoma macropomum*, Serrasalmidae, Characiformes). **Conservation Genet Resour**, v. 3, p. 33–36.

HAMOY, I. G.; SANTOS, S. 2012. Multiplex PCR panel of microsatellite markers for the tambaqui, *Colossoma macropomum*, developed as a tool for use in conservation and broodstock management. **Genetics and Molecular Research**, v.11, n. 1, p.141-146.

HAMOY, I. G.; ARARIPE, J.; SANTOS, S. 2014. **Genética molecular aplicada à conservação de peixes Amazônicos**, (no prelo).

HANFLING, B.; BRANDL, R. 1998. Genetic variability, population size and isolation of distinct populations in the freshwater fish *Cottus gobio* L. **Mol. Ecol.**, v. 7, n. 12, p. 1625-1632.

HANSSON, B. 2010. The use (or misuse) of microsatellite allelic distances in the context of inbreeding and conservation genetics. **Molecular Ecology** v. 19, p. 1082-1090.

HEARNE, C.M.; GHOSH, S.; TODD, J. A. 1992. Microsatellites for linkage analysis of genetic traits. **Trends Genet.**, v. 8, p. 288-294.

HEDRICK, P.W.; BRUSSARD, P. F.; ALLENDORF, F.W.; BEARDMORE, J.A.; ORZACKS, S. 1986. Protein variation, fitness and captive propagation. **Zoo Biology**, v.5, p.91-99.

HILSDORF, A. W. S.; MARQUES, D. K. S.; RESENDE, E. K. 2006. Genética e Conservação de Estoques Pesqueiros de Águas Continentais no Brasil: Situação Atual e Perspectivas. **Embrapa Pantanal Documentos**. p. 82 -43.

HILSDORF, A. W. S. 2013. Marcadores moleculares e a caracterização dos recursos genéticos de peixes: desenvolvimento sustentável da aquicultura e da pesca de espécies nativas de água doce no Brasil. **Tese (Livre Docência)** - Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos – Universidade de São Paulo. 159 p.

IHARA, N.; TAKASUGA, A.; MIZOSHITA, K.; TAKEDA, H.; SUGIMOTO, M. 2004. A comprehensive genetic map of the cattle genome based on 3802 microsatellites. **Genome Research**, v. 14, p. 1987- 1998.

INOUE, L. A. K. A.; BOIJINK, C. L. 2011. **Manaus a capital do tambaqui**. 2011. Disponível em: www.infobibos.com/Artigos/2011_1/tambaqui/index.htm. Acesso em 17 jun 2014.

ISAAC, V. J.; RUFFINO, M. L. 2003. Informe estatístico do desembarque pesqueiro na cidade de Santarém, PA: 1992-1993. In: Fischer, C. F. (Ed.). **Recursos Pesqueiros do Médio Amazonas: biologia e estatística pesqueira**. IBAMA/GTZ/GOPA, Brasília. p. 225-280

IWAMA, G.K.; MCGEER, J.C.; BERNIER, N.J. 1992. The effects of stock and rearing history on the stress response in juvenile coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). **ICES Journal of Marine Science Symposium**, v. 194, p. 67-83.

- JACOMETO, C. B.; BARRERO, N. M. L.; RODRIGUEZ-RODRIGUEZ, M. D. P.; GOMES, P. C.; POVH, J. A. 2010. Variabilidade genética em tambaquis (Teleostei: Characidae) de diferentes regiões do Brasil. **Pesq. agropec. bras.**, Brasília, v.45, n.5, p.481-487.
- JAKOBSSON, M.; ROSENBERG, N. A. 2007. CLUMPP: a cluster matching and permutation program for dealing with label switching and multimodality in analysis of population structure. **Bioinformatics**, Oxford, v. 23, p. 1801-1806.
- JARNE, P.; LAGODA, P. J. L. 1996. Microsatellites, from molecules to populations and back. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 11, p. 424-429.
- JONES, A. G.; SMALL, C. M.; PACZOLT, K. A.; RATTERMAN, N. L. 2010. A practical guide to methods of parentage analysis. **Molecular Ecology Resources**, n. 10, p. 6-30.
- JUANES, F.; PEREZ, J.; GARCIA-VAZQUEZ, E. 2007. Reproductive strategies in small populations: using Atlantic salmon as a case study. **Ecol. Freshw. Fish**, v. 16, n. 4, p. 468-475.
- JUNK, W. J. 1973. Investigations on the ecology and production-biology of the "floating" meadows on the middle Amazon. Part II: The aquatic fauna in the root zone of floating vegetation. **Amazoniana**, v. 4, n 1, p.9-12
- KALINOWSKI, S. T; TAPER, M. L; MARSHALL, T. C. 2007. Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. **Molecular Ecology**, v. 16, p. 1099-1006.
- KARSI, A.; PATTERSON, A.; FENG, J.; LIU, Z. J. 2002. Translational machinery of channel catfish: A transcriptomic approach the analysis of 32 40 s ribosomal protein genes and their expression. **Gene**, v. 291, p. 177-186.
- KELKAR, Y. D.; STRUBCZEWSKI, N.; HILE, S. E. 2010. What is a microsatellite: a computational and experimental definition based upon repeat mutational behavior at A/T and GT/AC repeats. **Genome Biology and Evolution**, v. 2, p. 620-635.
- KIMURA, M.; CROW, J. F. 1964. The number of alleles that can be maintained in a finite population. **Genetics**. v. 49, p.725.
- KIMURA, M.; OHTA, T.1978. Stepwise mutation model and distribution of allelic frequencies in a finite population. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 75, p. 2868-2872.
- LEVINSON, G.; GUTMAN, G. A. 1987. Slipped-strand mispairing: a major mechanism for DNA sequence evolution. **Molecular Biology and Evolution**, v. 4, p. 203-221.
- LITT, M.; LUTY, J. A. 1989. A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. **American Journal of Human Genetics**, v. 44, p. 397.

LIU, Z. J.; CORDES, J. F. 2004. DNA marker technologies and their applications in aquaculture genetics. **Aquaculture**, v.238, p.1-37.

LOPES, T.S.; STREIT, J. R. D. P.; RIBEIRO, R. P.; POVH, J. A.; LOPERA-BARRERO, N. M.; VARGAS, L.; PINTO FILHO, C.; QUEIROZ, J. R. 2009. Diversidade genética de estoques de reprodutores de *Colossoma macropomum*. **Arq Bras Med Vet Zootec.**, v. 61, n. 3, p. 728-735.

LOPERA BARRERO, N.M.; RIBEIRO, R.P.; VARGAS, L.; POVH, J.A.; LOPES, T.S.; OLIVEIRA, S.N.; GOMES, P.C. 2010 Diversidade genética de *Piaractus mesopotamicus* utilizado em programas de repoblación. **Archivos de Zootecnia**, v.59, p.51-62.

MACHADO, A. T. Manejo da agrobiodiversidade, direito dos agricultores e propriedade intelectual. Disponível em: http://www.encontroagroecologia.org.br/files/Manejo_Agrobiodiversidade.rtf.

MALIK, A.; FRENKEL, Z.; HERNANDEZ, A.; BAND, M.; NEVO, E. 2011. Characterization of paternity relationships in the mole rat *Spalax ehrenbergi* by microsatellite genotyping. **Population Ecology**, v. 53, p. 501-510.

MARTIN, N. B. et al. Custos e retorno na piscicultura em São Paulo. **Informações Econômicas**. São Paulo, v. 25, n.1, p. 9-47.

MELACK, J. M.; FISCHER, T. R. 1990. Comparative limnology of tropical floodplain lakes with an emphasis on the Central Amazon. **Acta Limnologica Brasiliensia**, v. 3, p. 1-48

MMA. Ministério do Meio Ambiente. 1997. **Diretrizes ambientais para o setor pesqueiro: Diagnóstico e Diretrizes para a Aquicultura**. Brasília, DF.

MOREIRA, A.A.; HILSDORF, A.W.S.; SILVA, J.V. da; SOUZA, V.R. 2007. Variabilidade genética de duas variedades de tilápia nilótica por meio de marcadores microsatélites. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.42, p.521-526.

MPA. Ministério da Pesca e Aquicultura. 2010. Boletim Estatístico da Pesca e Aquicultura.

MPA. Ministério da Pesca e Aquicultura. 2011. Boletim Estatístico da Pesca e Aquicultura.

MUNIZ, J.A. S. M.; CATANHO, M. T. J. A.; SANTOS, A. J. G. 2008. Influência do fotoperíodo natural na reprodução induzida do tambaqui, *Colossoma Macropomum* (Cuvier, 1818). **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 34, n. 2, p. 205-211.

MUIR, J.F., ROBERTS, R. 1993. **Recent advances in aquaculture**. London: Croom Helm, p. 63-138.

- NAVARRO, A.; BADILLA, R.; ZAMORANO, M.J.; PASAMONTES, V.; HILDEBRANDT, S.; SÁNCHEZ, J. J.; AFONSO, J. M. 2008. Development of two new microsatellite multiplex PCRs for three sparid species: Gilthead seabream (*Sparus auratus* L.), red porgy (*Pagrus pagrus* L.) and redbanded seabream (*P. auriga*, Valenciennes, 1843) and their application to paternity studies. **Aquaculture**, v. 285, p. 30-37.
- OLIVEIRA, E. J.; PÁDUA, J. G.; ZUCCHI, M. I.; VENCOVSKY, R.; VIEIRA, M. L. C. 2006. Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. **Genetics and Molecular Biology**, v. 29, n. 2, p. 294-307.
- PEAKALL, R. & SMOUSE, P. E. 2012. GenA1Ex 6.5: Genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research--an update. **Bioinformatics** **28(19)**: 2537–2539.
- PETIT, R. J.; EL MOUSADIK, A.; PONS, A. O. 1998. Identifying Populations for Conservation on the basis of genetic markers. **Conservation Biology**, Gainesville, v.12, n.4, p. 844-855.
- PICARD, D. J.; SCHULTE, P. M. 2004. Variation in gene expression in response to stress in two populations of *Fundulus heteroclitus*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A**, v. 137, p. 205-216.
- POVH, J. A.; RIBEIRO, R. P.; SIROL, R. N.; MANGOLIN, C. A.; GASPARINO, E.; BARRERO, N.M.L; GOMES, P.C.; STREIT JR, D.P.; VARGAS, L. 2006. Importância do monitoramento genético pela utilização de marcadores moleculares na piscicultura. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 45, p.101-106.
- POVH, J. A.; RIBEIRO, R. P.; SIROL, R. N.; STREIT JÚNIOR, D. P.; LOPERA BARRERO, N. M.; VARGAS, L.; GOMES, P. C.; LOPES, T.S. 2008. Diversidade genética de pacu do Rio Paranapanema e do estoque de um programa de repovoamento. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 43, p.201-206.
- POTTINGER, T.G.; CARRICK, T.R. 1999. Modification of the plasma cortisol response to stress in rainbow trout by selective breeding. **General and Comparative Endocrinology**, v. 116, p. 122-132.
- PRITCHARD, J. K; STEPHENS, M.; DONNELLY, P. 2000. Inference of Population Structure Using Multilocus Genotype Data. **Genetics**, v. 155, p. 945-959.
- QUEIROZ, H. L. & CRAMPTON, W. G. R. (eds.) 1999. **Estratégias para Manejo de Recursos Pesqueiros em Mamirauá**. Brasília, Brazil: Sociedade Civil Mamirauá, MCT - CNPq.
- QUEIROZ, J. F.; LOURENÇO, J. N. P.; KITAMURA, P. C. 2002. **A Embrapa e a Aquicultura Demandas e Prioridades de Pesquisa**. Brasília : Embrapa Informação Tecnológica. (Texto para Discussão ; 11). 35 p.

- RADWAN, J.; BIEDRZYCKA, A.; BABIK, W. 2010. Does reduced MHC diversity decrease viability of vertebrate populations? **Biological Conservation**, v. 143, p. 537–544.
- REED, D. H; FRANKHAM, R. 2003. Correlation between fitness and genetic diversity. **Conserv Biol**, v. 17, p. 230-237.
- RICE, W. R. 1998. **Analyzing tables of statistical tests**. *Evolution* v. 43, p. 223-225.
- RICHARD, G. F; PAQUES, F. 2000. **Mini- and microsatellite expansions: the recombination connection**. *EMBO Rep* 1, p. 122-126.
- RICHEY, J. E. *et al.* 1986. Water discharge and suspended sediment concentrations in the Amazon river: 1982-1984. **Water Resources Research**, v. 22, n.5, p. 756-764.
- ROSENBERG, N. A. Distruct: a program for the graphical display of population structure. *Molecular Ecology Notes*, Oxford, v. 4, p. 137-138, 2007.
- RUIZ-LINARES, A.; GOLDSTEIN, D. B.; SCHLOTTERER, C. 1999. **Microsatellites and the reconstruction of the history of human populations**. *Microsatellites: Evolution and Applications* Oxford University Press, Oxford. p. 183-197.
- SANTANA, G. X.; SANTOS, C. H. A.; SOUSA, C. F. S.; NASCIMENTO, P. R. M.; PAULA-SILVA, M. N.; SOUSA, A. C. B.; CAMPOS, T. A.; ALMEIDA-VAL, V. M. F. 2012. Isolation of novel microsatellite markers for tambaqui (*Colossoma macropomum*, Cuvier 1818), an important freshwater fish of the Amazon. **Conservation Genet Resour.**, v. 4, p. 197–200
- SANTOS, M. C.; RUFFINO, M. L; FARIAS, I. P. 2007. High levels of genetic variability and panmixia of the tambaqui *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1816) in the main channel of the Amazon River. **Journal of Fish Biology** 71 (Supplement A). p. 33-44.
- SANTOS, M. C. F.; HRBEK, T.; FARIAS, I. P. 2009. Microsatellite markers for the tambaqui (*Colossoma macropomum*, Serrasalminae, Characiformes), an economically important keystone species of the Amazon River floodplain. **Permanent Genetic Resources Note** v. 9, p. 874-876.
- SANTOS, M. C. F. 2010. Caracterização da diversidade genética de populações naturais de tambaqui (*Colossoma macropomum*) através de marcadores moleculares: uma contribuição para conservação da espécie. **Tese de Doutorado**. Instituto Nacional de Pesquisas Amazônicas. 175p.
- SANTOS, C. H. A.; LEITÃO, M. A. B.; SOUSA, C. F. S.; SANTANA, G. X.; SILVA, M. N. P.; ALMEIDA-VAL, V. M. F. 2012. Genetic variability of wild and captivity populations of *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818). **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, v. 34, n. 2, p. 191-197.
- SAITOU N, NEI M. 1987. A neighbor-joining método: um novo método para a reconstrução de árvores filogenéticas. **Mol Biol Evol**. 1987 julho, 4 (4): 406-25

- SAWAMURA, K. 2011. Chromatin evolution and molecular drive in speciation. **International Journal of Evolutionary Biology**, 2012.
- SAWAYA, S. M.; LENNON, D.; BUSCHIAZZO, E.; GEMMELL, N.; MININ, V. N.; 2012. Measuring Microsatellite Conservation in Mammalian Evolution with a Phylogenetic Birth–Death Model. **Genome Biology and Evolution**, v. 4, p. 748-759.
- SLATKIN, M. 1995. A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequency. *Genetics*, v.139, p. 457-462.
- SMITH, G. P. 1974. **Unequal crossover and the evolution of multigene families**. Cold Spring Harbor Laboratory Press. p. 507-513.
- SMITH, G. P. 1976. Evolution of repeated DNA sequences by unequal crossover. *Science*, v. 191, p. 528-535.
- SOLÉ-CAVA, A. M. 2001. Genética da Conservação.172-192p, in Mattioli, S. (Ed). **Biologia Molecular e Evolução**. Editora Holos.
- SOUSA, A.; CARVALHO, D. C.; DE MELO, D. C.; SEERIG, A. S.; DE OLIVEIRA, D. A. A.; RIBEIRO, L. P.; TEIXEIRA, E. A; CREPALD, V; FARIA, P. M. C.; A. 2006. Utilização de baixo número de matrizes em piscicultura: perda de recursos genéticos para programas de repovoamento. **Rev Bras Reprod Anim**, Belo Horizonte, v.30, n.3/4, p.100-104. Disponível em www.cbra.org.br.
- SOUZA, M. E. Caracterização genética de reprodutores de tilápia: estratégias para manutenção da variabilidade. 2007. **Dissertação de Mestrado**. Universidade Federal Rural de Pernambuco. Recife/PE. 55p.
- SUN, J. X.; MULLIKIN, J. C.; PATTERSON, N.; REICH, D. E. 2009. Microsatellites are molecular clocks that support accurate inferences about history. **Molecular Biology and Evolution**, v. 26, p. 1017-1027.
- SUN, J. X.; HELGASON, A.; MASSON, G.; EBENESERSDÓTTIR, S. S.; LI, H. 2012. A direct characterization of human mutation based on microsatellites. **Nature Genetics**, v. 44, p. 1161-1165.
- SPENCER, C. C.; NEIGEL, J. E.; LEBERG, P. L. 2000. Experimental evaluation of the usefulness of microsatellite DNA for detecting demographic bottlenecks. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 9, p. 1517-1528.
- SZOSTAK, J. W.; WU, R. 1980. Unequal crossing over in the ribosomal DNA of *Saccharomyces cerevisiae*. **Nature**, v. 284, p. 426-430.
- TANIGUCHI, N. 2003. Genetic factors in broodstock management for seed production. *Rev. Fish Biol. Fish.*, v.13, p.175-185.

- TEMPLETON, A. R.; ROBERTSON, R. J.; BRISSON, J.; STRASBURG, J. 2001. Disrupting evolutionary processes: the effect of habitat fragmentation on collared lizards in the Missouri Ozarks. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 98, n. 10, p. 5426-5432.
- TOTH, G.; GASPARI, Z.; JURKA, J. 2000. Microsatellites in different eukaryotic genomes: Survey and analysis. **Genome Research**, v.10, p. 967-981.
- VAN, O.; OSTERHOUT, C.; HUTCHINSON, W. F.; WILLS, D. P. M; SHIPLEY, P. 2007. MICRO-CHECKER: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. **Mol Ecol Notes**, v. 4, p. 535-538.
- VANDEPUTTE, M.; PRUNET, P. 2002. Génétique et adaptation chez les poissons: domestication, résistance au stress et adaptation aux conditions de milieu. **INRA Productions Animales**, v. 15, p. 365-371.
- VIEIRA, E. F.; ISAAC, V. J.; FABRÉ, N. N. 1999. Biologia reprodutiva do tambaqui, *Colossoma macropomum* Curvier, 1818 (Teleostei, Serrasalminidae), no baixo Amazonas, Brasil. **Acta Amazonica**, v. 29, n. 4, p. 625-638.
- WEBER, J. L.; WONG, C. 1993. Mutation of human short tandem repeats. **Human Molecular Genetics**, v.2, p. 123-1128.
- WEIR, B. S; COCKERHAM, C. C. 1984. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. **Evolution**, v. 38, p. 1358-1370.
- WRIGHT, S. 1978. Evolution and genetics of populations. In: **The Theory of Gene Frequencies**. London: University of Chicago Press 511pp.