

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRO-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
DEPARTAMENTO DE APOIO À PESQUISA
PROGRAMA INSTITUCIONAL DE BOLSA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

yurick.gomes@fabriq.com.br

**Teste de estruturação genética entre calha principal do rio Amazonas
versus tributários na espécie *Brycon amazonicus***

Bolsista: Roberta Cunha de Oliveira, CNPq

MANAUS

2011

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRO-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
DEPARTAMENTO DE APOIO À PESQUISA
PROGRAMA INSTITUCIONAL DE BOLSA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

RELATÓRIO FINAL
PIB-B/ 0056/ 2010

**Teste de estruturação genética entre calha principal do rio Amazonas
versus tributários na espécie *Brycon amazonicus***

Bolsista: Roberta Cunha de Oliveira, CNPq
Orientadora: Prof^a Dr^a Izeni Pires Farias
Co-orientador: Dr^a Maria da Conceição Freitas Santos

MANAUS
2011

Lista de figuras

Figura 1 – Exemplar de <i>Brycon amazonicus</i> (Matrinxã).....	6
Figura 2 – Mapa da distribuição das localidades de <i>Brycon amazonicus</i>	9

Lista de tabelas

Tabela 1 – Localidades amostradas de matrinxã.....	9
Tabela 2 – Amostras populacionais com haplótipos únicos de <i>Brycon amazonicus</i>	12
Tabela 3 – Sítios variáveis que resultaram em mudança de AA para o gene da ATPase de <i>Brycon amazonicus</i>	13
Tabela 4 – Resultado da análise de variância molecular (AMOVA).....	13
Tabela 5 – Valores de par-a-par (diagonal abaixo) e valores de <i>N_m</i> (diagonal acima) para <i>Brycon amazonicus</i> . (Inf)= inferior. * Após correção de Bonferroni ($P < 0,0017$).....	14
Tabela 6 – Parâmetros genéticos obtidos através da região da ATPase para <i>Brycon amazonicus</i>	15

Sumário

1. INTRODUÇÃO.....	6
2. OBJETIVOS.....	8
2.1. Objetivo Geral.....	8
2.2. Objetivos Específicos.....	8
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	10
3.1. Amostragem.....	10
3.2. Metodologia do Laboratório.....	11
3.3. Análises Genético-Populacionais de DNAm.....	11
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	11
5. CRONOGRAMA DE ATIVIDADES.....	16
6. REFERÊNCIAS.....	16

Resumo

A espécie *Brycon amazonicus* é conhecida por matrinxã e vive sazonalmente em áreas alagadas onde utilizam o canal do rio como via migratória. É uma espécie muito apreciada na alimentação das populações locais tendo grande importância em sistemas de pesca comercial e na pesca de subsistência. Partindo de uma hipótese nula que a espécie *B. amazonicus* corresponde a uma única população na bacia Amazônica, esse trabalho visou verificar a existência de estruturação entre a calha principal e alguns tributários da bacia Amazônica por meio de marcador molecular, nesse caso, DNA mitocondrial. A área de estudo compreendeu o rio Amazonas e alguns de seus tributários. Os resultados mostraram evidência de sub-estruturação populacional com fluxo gênico restrito e que as populações de Santarém e de Jacareacanga são geneticamente distintas das demais. Entretanto, tal resultado deve ser visto com cautela uma vez que pode ter sido pelo fato da amostragem ter sido feita em apenas um cardume (irmandades), e não representando uma amostragem aleatória das populações.

PALAVRAS-CHAVE: Estruturação, DNA mitocondrial, Matrinxã.

1. Introdução

Com uma área de aproximadamente 6.000.000 km², uma rede de bacias hidrográficas inigualáveis e a ictiofauna mais rica do planeta, a Amazônia tem, na pesca, uma das atividades econômicas mais importantes para a região, não só como fonte de renda, mas também como fonte de proteína de fácil acesso para as populações locais. Cerca de 30 espécies de peixes são capturadas para fins alimentícios e comerciais na Amazônia sendo que, do ponto de vista prático e da cultura local, elas podem ser divididas em dois grandes grupos: peixes de escamas (os representantes das Characiformes, Osteoglossiformes, Perciformes e Clupeiformes) e peixes lisos (os bagres da ordem Siluriformes). Os Characiformes são o grupo de peixes de maior riqueza específica da Região Amazônica (Ferreira *et al.* 1996), vivem sazonalmente em áreas alagadas e utilizam em geral o canal dos rios como rota migratória. Dentre as espécies que se destacam está *Brycon amazonicus* (Matrinxã).



Figura 1 – Exemplar de *Brycon amazonicus* (Matrinxã)

A espécie *Brycon amazonicus* é conhecida por Matrinxã na maior parte da Amazônia Central (Santos *et al.* 2006, Lima 2003), sendo também chamada na bacia do rio Madeira de “Jatuarana” (Goulding 1979, 1980). Está distribuída ao longo do rio Solimões-Amazonas e tributários, na bacia do Rio Orinoco e no Rio Essequibo na Venezuela (Lima 2003). Essa espécie é migradora, onívora (estágio adulto), ou seja, alimenta-se de frutos, sementes e insetos e, ocasionalmente, de pequenos peixes, além disso, se reproduz com desova total no início da enchente. Seus principais predadores na natureza são o homem e os botos, *Inia geoffrensis* (Blainville, 1817) e *Sotalia fluviatilis* (Gervais & Deville, 1853) (Smith 1879, Goulding 1979, 1980, Santos *et al.* 2006).

Na Amazônia, os piscicultores manejam a matrinxã em canais de igarapés. Seu manejo é relativamente fácil, uma vez que se adapta bem em águas correntes e limpas. A espécie ainda tem a vantagem de resistir a águas mais frias e ácidas. Pela tolerância a áreas de altas densidades, possui ótimo crescimento em sistemas de cultivo. Então, é necessário que se façam estudos que visem a estrutura genética das populações de *B. amazonicus* na calha do rio Amazonas. O conhecimento da estrutura genética da espécie pode contribuir para futuros planos de manejo, bem como para melhoramento genético em cativeiro.

Uma maneira de estudar a variabilidade genética de um determinado organismo é utilizando como marcador molecular o DNA mitocondrial, cuja estrutura em animais é uma molécula de DNA circular de fita dupla e contida em múltiplas cópias na mitocôndria. Seu tamanho é relativamente estável para animais, em torno de 16500 ± 500 pares de bases (pb) (Clark-Walker, 1985; Moritz, *et al.*, 1987). O DNAm é geneticamente mais eficiente do que o DNA nuclear, (Attardi, 1985; Gray, 1989), quando se considera que não contem sequências duplicadas, não possui íntrons e os genes são geralmente separados por menos do que 10 pares de bases (Wolstenholme & Clary, 1985).

Uma das vantagens no uso do DNAm_t em estudos populacionais é que ele possui uma taxa de evolução (mutação) de 5 a 10 vezes maior (5,7 X 10⁻⁸ substituição/sítio/ano) do que os genes codificadores de proteínas do DNA nuclear (Perler *et al.*, 1980; Brown *et al.* 1982). O DNAm_t é também muito utilizado devido ao grande número de cópias por célula, seu tamanho pequeno, sua organização simples (Avise *et al.*, 1984; Hayashi *et al.*, 1985), por sua suposta herança estritamente materna e uniclonal (Vaughn *et al.*, 1980; Avise *et al.*, 1986, 1994). A herança materna gera hipóteses que refletem a filogenia das fêmeas de uma população, sendo útil, por exemplo, no estudo da movimentação de fêmeas em populações naturais de uma espécie (Lasman *et al.*, 1981; Avise *et al.*, 1984). A alta taxa de mutação ainda permite que o DNA mitocondrial seja utilizado para inferir relações filogenéticas entre populações ou espécies com tempos de divergência relativamente recentes entre milhares e alguns milhões de anos (Brown *et al.*, 1979). Entre trabalhos realizados com este marcador em espécies de Characiformes dois são descritos abaixo.

Utilizando o DNAm_t como ferramenta molecular, Sivasundar *et al.* (2001), estudando o gênero *Prochilodus* verificou que análises filogeográficas, incluindo análises do clado aninhado, sugerem altos níveis de fluxo gênico dentro da bacia do Paraná. O DNAm_t também foi empregado como ferramenta molecular por Sanches *et al.* (2007) onde verificaram que a espécie *Brycon hilarii* apresenta um modelo de sub-estruturação com indivíduos se organizando em unidades reprodutivas geneticamente diferenciadas que mantêm sua integridade, co-existindo e co-migrando em um mesmo sistema de rio.

A espécie *B. amazonicus* é muito apreciada na alimentação das populações locais tendo grande importância em sistemas de pesca comercial e na pesca de subsistência (Smith 1979, Batista *et al.* 2000). Desta forma, estudos sobre a genética populacional dessa espécie na bacia do rio Amazonas podem contribuir para o conhecimento da constituição genética, o grau de variabilidade genética e ainda verificar se há algum padrão de estruturação na espécie em questão, usando o DNA mitocondrial como marcador molecular.

Partindo de uma hipótese nula que a espécie *B. amazonicus* corresponde a uma única população na bacia Amazônica, esse trabalho visa verificar a existência de estruturação entre a calha principal e alguns tributários da bacia Amazônica por meio de marcador molecular, nesse caso, DNA mitocondrial.

Por esse motivo e pelo fato da espécie em questão ter uma grande importância comercial é necessário que se façam estudos que visem a estrutura genética das populações de *B. amazonicus* na calha principal do rio Amazonas e seus tributários. O conhecimento da

estrutura genética da espécie poderá contribuir para futuros planos de manejo, bem como para melhoramento genético em cativeiro.

2. Objetivos

2.1. Objetivo geral

Caracterizar geneticamente as populações de matrinxã (*Brycon amazonicus*) e verificar a existência de estruturação genética entre as localidades da calha principal do Rio Amazonas e seus tributários.

2.2. Objetivos específicos

- Sequenciar o gene ATPase8 do DNA mitocondrial dos indivíduos de matrinxã.
- Estimar os níveis de variabilidade genética nas populações naturais de matrinxã.
- Verificar a relação genealógica entre as localidades amostradas de *B. amazonicus*.

3. Materiais e Métodos

3.1. Amostragem

A área de estudo compreende o rio Amazonas e alguns de seus tributários (Figura 1). A amostragem teve dois tipos de bancos de dados: localidades que foram sequenciadas em estudos anteriores e localidades que foram incluídas nesse banco de dados maior (Tabela 1).

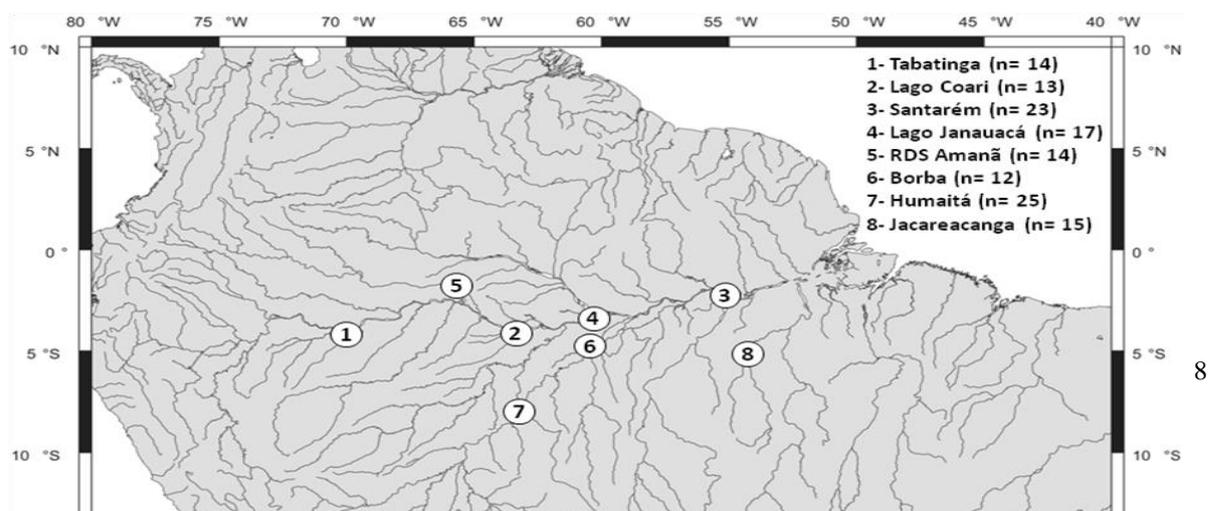


Figura 2. Mapa da distribuição das localidades de *Brycon amazonicus*

Tabela 1. Localidades amostradas de matrinxã

Rio principal/Tributários	Localidades/Amostras populacionais	Tamanho amostral (N)
Rio Solimões/Amazonas	Tabatinga	14
	Coari	13
	Santarém	23
	Lago Janauacá	17
	RDS Amanã	14
Rio Madeira	Borba	12
	Humaitá	25*
Rio Tapajós	Jacareacanga	15
		Total= 133

* 19 amostras desta localidade são do banco de dados incluído posteriormente.

Os indivíduos de matrinxã de todas as localidades citadas encontram-se depositadas na Coleção de Tecidos de Genética Animal – CTGA/ICB/UFAM (Fiel Depositário).

3.2. Metodologia do Laboratório

Para a extração do DNA total foram utilizadas amostras de tecido da nadadeira peitoral dos peixes. As amostras de cada indivíduo serão colocadas em tubos Eppendorf 2µL para serem digeridos em uma solução contendo: 500 µL de Tampão CTAB e 15µL de Proteinase K. Estes tubos foram acondicionados em estufa a 60 °C até que o tecido fosse totalmente digerido. Após a digestão, o produto passou por lavagens com Clorofórmio-Álcool Isoamílico

(24:1), em seguida o DNA foi precipitado com álcool, ao final desse procedimento o DNA foi ressuspenso com 50µL de água deionizada e autoclavada (Milli-q). O material genético que foi extraído corresponde ao DNA genômico das populações de *B. amazonicus*, cujas amostras de DNA foram quantificadas em gel de agarose 1% e comparadas com um marcador de peso conhecido para estimar suas concentrações.

Após a extração e quantificação do DNA genômico, foi amplificado o segmento em estudo, a região ATPase8 do DNA mitocondrial. A técnica da PCR (reação em cadeia da polimerase) foi utilizada para as reações de amplificação do segmento de DNA estudado. Para isto foi utilizado um par de iniciadores (*primers* – ATP8 e CO3) específicos para peixes caracídeos desenvolvidos e publicados por Sivasundar *et al.*, (2001). As reações de amplificações têm como volume final 14,3µL contendo 5µL de água milli-q, 2µL de MgCl₂, 2µL de dNTP, 1,5µL de *buffer* (tampão), 1,5µL de cada *primer*, 0,3µL de Taq DNA polimerase. As amplificações passam por ciclos nas seguintes condições: 1- desnaturação inicial a 92 °C por 1 minuto; 2- logo após, 35 ciclos que consistem em desnaturação a 92 °C por 1 minuto, anelamento dos *primers* a 50 °C por 40 segundos e extensão a 72 °C por 1,5 minutos; 3- extensão final a 72 °C por 5 minutos. Após a reação, a eficácia da amplificação foi verificada através de eletroforese em gel de agarose 1% em comparação com um marcador para estimar o tamanho dos fragmentos obtidos e verificar se está ocorrendo a amplificação da região de interesse.

Uma vez obtidos os fragmentos específicos do DNA em estudo, através da técnica de PCR, o próximo passo foi sequenciá-las, ou seja, obter a ordem correta das bases nitrogenadas (nucleotídeos) que compõem o seguimento de DNA.

Os produtos de PCR foram submetidos a uma purificação com enzimas exonuclease e fosfatase alcalina de acordo com as especificações do fabricante (GE-Healthcare) para a retirada de restos de *primers* e moléculas de RNA. Após essa etapa realiza-se a reação de sequenciamento utilizando 2µL de DNA purificado, 2µL de cada *primer*, 2,5µL de tampão Big Dye, 0,5 de Big Dye terminator (*cycle sequencing kit da Applied Biosystems*). A etapa seguinte inclui a precipitação das amostras purificadas com a utilização do protocolo de etanol/EDTA finalizando com o sequenciamento das amostras em sequenciador automático ABI 3130xl (*Applied Biosystems*).

Após a obtenção das sequências pelo sequenciador, estas são editadas no programa Bioedit (Hall, 1999), alinhadas com o auxílio do programa Clustal W (Thompson *et al.*, 1994), sendo a base para a construção de uma matriz de dados contendo todas as sequências nucleotídicas.

3.3. Análises Genético-Populacionais do DNAm

Após a edição de todas as sequências e criação das matrizes de dados, estas foram usadas para analisar a presença de estrutura genética populacional e fluxo gênico das populações de *Brycon amazonicus*, em cuja análise utilizou-se o teste de AMOVA (Análise de Variância Molecular) (Excoffier *et al.* 1992), e *pairwise Fst* (Cockerham & Weir, 1993), implementados no programa Arlequin 3.0 (Excoffier *et al.* 2005).

Os índices de diversidade genética e testes de neutralidade seletiva de mutações (Teste D de Tajima e Teste FS de Fu) foram acessados utilizando-se também o programa Arlequin 3.0.

4. Resultados e Discussões

Foram seqüenciados 520 pares de bases para 133 indivíduos, onde se observou 13 haplótipos sendo que destes, oito foram haplótipos únicos (Tabela 2). A média da composição de bases nucleotídicas foi definida como: 27,33% para Adenina, 28,40% para Timina, 31,16% para Guanina e 13,11% para Citosina. Foi encontrado um total de 13 sítios polimórficos, sendo que oito foram decorrentes de transições e cinco de transversões.

Tabela 2. Amostras populacionais com haplótipos únicos de *Brycon amazonicus*

Haplótipos únicos	
Nº da amostra	Localidade
12	Coari
6	Coari
13	Coari
7	Amanã
13	Tabatinga
10	Coari
7	Tabatinga
12	Coari

As sequências de ATPase obtidas foram submetidas ao programa MEGA 5.0, para tradução de aminoácidos (AA) hipotéticos, a qual foi realizada a partir da 2ª posição do códon. Após a tradução foram obtidos 173 AA, e não houve detecção de códon de parada. Houve seis sítios variáveis para mudanças de AA (Tabela 3). As mutações que resultam na mudança de AA foram observadas em sua maioria nos indivíduos de Coari.

Tabela 3. Sítios variáveis que resultaram em mudança de AA para o gene da ATPase de *Brycon amazonicus*

Sítios	Mudança de AA	Localidade
11, 12, 13	Isoleucina → Metionina	Coari
17, 18, 19	Tirosina → Cisteína	RDS Amanã
38, 39, 40	Triptofano → Glicina	Coari
74, 75, 76	Cisteína → Glicina	Coari
134, 135, 136	Alanina → Treonina	Coari
335, 336, 337	Valina → Metionina	Coari

A AMOVA (Análise da Variância Molecular) revelou que a maior variação genética se encontra dentro das populações de matrinxã (Tabela 4). O valor de $F_{ST} = 0,11757$ ($P > 0,05$) não foi significativo.

Tabela 4. Resultado da Análise de Variância Molecular (AMOVA)

Tipos de variante	Componente variante (ATPase)	Porcentagem de variação (ATPase)
Entre populações	0,06827	11,76
Dentro das populações	0,51244	88,24
TOTAL	0,58071	

$F_{ST} = 0,11757$ ($P > 0,05$).

Segundo os valores para o índice de fixação F_{ST} referente às comparações par-a-par entre as amostras de matrinxã, as populações de Santarém e Jacareacanga estariam diferenciadas geneticamente das demais localidades. No entanto, entre Santarém e Jacareacanga não foi observado diferenciação genética. Com relação às outras localidades, observou-se uma diferenciação genética entre Amanã e Coari. Antes da correção de Bonferroni 13 comparações par-a-par mostraram diferenciação genética entre elas. Análise feita após a correção de Bonferroni identificaram 9 comparações significantes as quais incluem as comparações envolvendo Santarém com todas as demais localidades, exceto com Jacareacanga (Tabela 5).

A respeito do Número de Migrantes por geração (Nm), os menores valores de Nm , variando de $Nm = 2$ a $Nm = -1$ foram observados entre Santarém e Jacareacanga com as outras localidades. O menor valor de Nm ($Nm = 0,48$) foi observado entre Santarém e Amanã. Valores de Nm considerados infinito foram observados entre nove comparações par-a-par. Os valores observados para o F_{ST} são inversamente proporcionais aos valores de Nm , assim, quanto maior foi o número de migrantes, menores foram os valores de F_{ST} (Tabela 5).

Tabela 5. Valores de F_{ST} par-a-par (diagonal abaixo) e valores de Nm (diagonal acima) para *Brycon amazonicus*. (inf)= infinito. * Após correção de Bonferroni ($P < 0,0017$).

	Janauacá	Tabatinga	Amanã	Humaitá	Borba	Coari	Santarém	Jacareacanga
Janauacá	–	inf	50,80	inf	inf	7,16	1,01	1,36
Tabatinga	-0,0217	–	7,91	inf	inf	Inf	1,61	2,33
Amanã	0,0097	0,0594	–	6,04	inf	4,71	0,48	0,64
Humaitá	-0,0186	-0,0373	0,0763	–	inf	43,19	1,95	2,60
Borba	-0,0730	-0,0485	-0,0015	-0,0484	–	19,84	0,92	1,30
Coari	0,06525	-0,0036	<u>0,0959</u>	0,0114	0,0245	–	1,18	1,68
Santarém	<u>0,3294*</u>	<u>0,2367*</u>	<u>0,5081*</u>	<u>0,2033*</u>	<u>0,3513*</u>	<u>0,2965*</u>	–	Inf
Jacareacanga	<u>0,26771</u>	<u>0,1766</u>	<u>0,4357*</u>	<u>0,1610</u>	<u>0,2771*</u>	<u>0,2287*</u>	0,0000	–

A diversidade gênica ou haplotípica variou de 0,0000 (Jacareacanga e Santarém) a 0,8462 (Coari). A diversidade haplotípica total para as amostras de *Brycon amazonicus* foi de 0,5850. A diversidade nucleotídica variou de zero (Jacareacanga e Santarém) a 0,0033 (Amanã), sendo que a diversidade nucleotídica total foi de 0,0022 (Tabela 6).

Tabela 6. Parâmetros genéticos obtidos através da região da ATPase para *Brycon amazonicus*.

Localidade	N	Nº de haplótipos (N_A)	Sítios variáveis	Diversidade gênica (h)	Diversidade nucleotídica (π)	TAJIMA'S D Test	FUS'S Fs Test
Janauacá	17	4	4	0,6544 ± 0,0891	0,0029 ± 0,0020	0,8574	0,7861
Tabatinga	14	5	5	0,6703 ± 0,1262	0,0025 ± 0,0018	-0,5826	-0,9649
Amanã	14	6	5	0,8352 ± 0,0617	0,0033 ± 0,0023	0,3369	-0,2886
Humaitá	25	4	4	0,6767 ± 0,0749	0,0024 ± 0,0017	0,5118	0,8005
Borba	12	4	4	0,7121 ± 0,1053	0,0029 ± 0,0021	0,5060	0,2821
Coari	13	7	7	0,8462 ± 0,0758	0,0028 ± 0,0020	-1,3352	-3,3345
Santarém	23	1	0	0,0000 ± 0,0000	0,0000 ± 0,0000	0,0000	0,0000
Jacareacanga	15	1	0	0,0000 ± 0,0000	0,0000 ± 0,0000	0,0000	0,0000
TOTAL	133	13	13	0,5850 ± 0,0439	0,0022 ± 0,0015	-1,3488	-4,8172

Os resultados dos testes de neutralidade (D de Tajima e FS de Fu $P=0,05$) apresentaram valores negativos e significantes para algumas populações como Tabatinga, Coari, Santarém e Jacareacanga, indicando que estas amostras populacionais de matrinxã sofreram recente expansão populacional ou redução no tamanho efetivo. Os testes não foram significantes ($P=0,05$) em certas localidades, sugerindo que estas estão em equilíbrio genético com relação aos haplótipos do DNAm (Tabela 6).

As populações de Santarém e de Jacareacanga encontram-se diferenciadas geneticamente das outras e iguais entre si, que é bem evidente quando se analisou o Nm infinito entre essas localidades e baixo entre as demais.

Os índices de polimorfismo de DNA (diversidade haplotípica, número de mutações e de sítios polimórficos) revelaram uma alta variabilidade genética. Os valores nulos dos parâmetros genéticos encontrados nas populações de Santarém e Jacareacanga indicam que está havendo fluxo gênico normal entre essas duas localidades, mesmo existindo uma corredeira entre elas servindo de barreira geográfica. Isto se deve provavelmente ao fato de que as amostras referentes a essas localidades sejam artefato de coleta, ou seja, provavelmente são peixes do mesmo cardume uma vez que se observa para as duas somente um único haplótipo.

A AMOVA mostrou alta diferenciação genética ($F_{ST} = 0,11757$ $P<0,05$), indicando a existência de estrutura de população. Segundo Hartl e Clark (1997) considera-se baixa diferenciação genética quando os valores de F_{ST} variam de 0 a 0,05; moderada diferenciação quando variam de 0,05 a 0,15; alta diferenciação de 0,15 a 0,25 (como encontrado para as populações de matrinxã) e muito alta quando os valores estão acima de 0,25. Na análise dos parâmetros genéticos, todas as populações apresentam fluxo gênico, com exceção das populações de Santarém e Jacareacanga devido ao provável problema citado acima (presença de um único haplótipo sugerindo um único cardume amostrado). O fluxo gênico foi infinito entre várias comparações, sugerindo que está havendo migração entre as populações, porém entre as populações de Santarém e de Jacareacanga e as demais se observou um fluxo gênico restrito, ou seja, baixo número de migrantes.

Todos os resultados que envolvem as localidades de Santarém e de Jacareacanga evidenciando estruturação genética e fluxo gênico restrito podem ser apenas um artefato de amostragem, uma vez que se observou somente um único haplótipo para estas localidades. Novas amostras deverão ser realizadas para se confirmar ou não o padrão observado.

A matrinxã é cada vez mais apreciada para o consumo pelas populações da região Amazônica. Então, já existe uma preocupação com esta espécie, visto que atualmente o gênero da espécie da matrinxã está incluído na lista de espécies protegidas pelo defeso, sendo protegida durante seu período de reprodução natural, evitando a pesca. Dessa forma, este trabalho teve como objetivo contribuir para a conservação das matrinxãs.

5. Cronograma de Atividades

Nº	Descrição	Ago 2010	Set	Out	Nov	Dez	Jan 2011	Fev	Mar	Abr	Mai	Jun	Jul
	Extrações de DNA	X	X	X	X	X	X						
	Amplificações no gene ATPase via PCR		X	X	X	X	X						
	Análises genético-populacionais				X	X	X	X	X	X	X	X	
	Elaboração do Resumo e Relatório Final												X
	Preparação da Apresentação Final para o Congresso												X

6. Referências

- Attardi, G. Animal mitochondrial DNA: An extreme example of genetic economy. *Int. Rev. Cyt.* 93, p. 93-145, 1985.
- Awise, J.C.; Neigel, J.E.; Arnold, J. Demographic influences on mitochondrial DNA lineage survivorship in animal populations. *Journal of Molecular Evolution.* 20, p.99-105, 1984.
- Brown, W.M.; Prager, E.M.; Wang, A.; Wilson, A.C. Mitochondrial DNA sequences of primates: Tempo and mode of evolution. *Journal of Molecular Evolution.* 18, p.225-239, 1982.

- Clark-Walker, G.D. Basis of diversity in mitochondrial DNAs. In: Cavalier-Smith (ed). The evolution of genome size. New York: Wiley, 1985.p. 277- 297. Desmore *et al.*, 1985;
- Excoffier, L.; Laval, G.; Schneider, S.. Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online* **1**, 47-50 2005.
- Excoffier, L.; Smouse, P. E. and Quattro, J. M. Analyses or molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes : application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics*, 131: 479-491. 1992.
- Farias, P. I., Gomes, J. A. A., Batista, J., Aquino, K. F.. Genética populacional das espécies de bagres migradores: siluriformes, pimelodidae. Projeto manejo de recursos naturais da Várzea. 2004
- Filho, L. C. S.; Batista, V. S. Dinâmica populacional da matrinxã *Brycon amazonicus* (Characidae) na Amazônia Central. *Zoologia* 26 (2): 195-203 2009.
- Frscá-Scorvo, C. M. D.; Carneiro, D. J., Malheiros, E. B. Comportamento alimentar do Matrinxã (*Brycon cephalus*) no período de temperaturas mais baixas. *Boletim do Instituto de Pesca, São Paulo*, 27 (1): 1-5. 2001
- Gray, M.W. Origin and evolution of mitochondrial DNA. *Ann. Review of Cell Biology*. 5, p.25-50, 1989.
- Hall, T. Bioedit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*. 41, 95-98. 1999.
- Hayashi, J.L.; Tagashira, Y.; Yoshida, M.C. Absence of extensive recombination between Inter and intraespecies mitochondrial DNA in mammalian cells. *Experimental Cell Research*. 160, p.387-395, 1985.
- Moritz, C.; Dowling, T.E.; Brown, W.M. Evolution of animal mitochondrial DNA: relevance for population biology and systematics. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 18, p.269-292, 1987.
- Perler, F.; Efstratiadis, A.; Lomedico, P.; Gilbert, W.; Kolodner, R.; Dodgson, J. The evolution of gene: the chicken preproinsulin gene. *Cell*. 20, p.555-556, 1980.
- Sanches, A.; Galetti Jr, P.M.. Genetic evidence of population structuring in the neotropical freshwater fish *Brycon hilarii* (Valenciennes, 1850). *Brazilian Journal of Biology*, 67: 889-895 2007.
- Sivasundar, A., Bermingham, E., & Ortí, G.. Population structure and biogeography of migratory freshwater fishes (*Prochilodus*: Characiformes) in major South American rivers. *Molecular Ecology* **10**, 407-417 2001.
- Vaughn, K.C.; Debonte, L.R.; Wilson, K.G.. Organelle alteration as a mechanism for maternal inheritance. *Science*, (208): 196-197 1980.

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