

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

**Avaliação da variabilidade genética das populações naturais e de cativeiro de
matrinxã (*Brycon amazonicus*) utilizando marcadores moleculares
microssatélites**

Bolsista: Roberta Cunha de Oliveira, FAPEAM

MANAUS
2012

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/ 0052/ 2011

**Avaliação da variabilidade genética das populações naturais e de cativeiro de
matrinã (*Brycon amazonicus*) utilizando marcadores moleculares
microssatélites**

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

MANAUS
2012

Lista de figuras

Figura 1. Exemplar de <i>Brycon amazonicus</i> (matrinxã).....	6
Figura 2. Mapa da bacia Amazônica com as localidades amostradas.....	9
Figura 3. Piscicultura Águas Claras.....	10
Figura 4. Fazenda Experimental – UFAM.....	10
Figura 5. Estação de Piscicultura de Balbina.....	10
Figura 6. Sistema multiplex usado para genotipagem das amostras de matrinxã.....	14

Lista de tabelas

Tabela 1. Sistema multiplex utilizado na reação de genotipagem para as amostras de matrinxã.....	14
Tabela 2. Otimização dos 11 pares de <i>primers</i> de loci microssatélites.....	16
Tabela 3. Índices genéticos para os 10 locos de microssatélites.....	17
Tabela 4. Comparação de valores de heterozigosidade entre espécies do gênero <i>Brycon</i>	17
Tabela 5. Parâmetros genéticos para cada localidade amostrada.....	18
Tabela 6. Índices de diversidade genética resultantes de 10 locos de microssatélites para todas as localidades amostradas.....	19
Tabela 7. Desequilíbrio de ligação entre pares de locos.....	20
Tabela 8. Análise da Variância Molecular AMOVA para matrinxã com microssatélite.....	20
Tabela 9. Valores de F_{ST} para a par entre as localidades amostradas.....	21

Sumário

1. INTRODUÇÃO.....	6
2. OBJETIVOS.....	8
2.1. Objetivo Geral.....	8
2.2. Objetivos Específicos.....	8
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	9
3.1. Amostragem.....	9
3.2. Metodologia do Laboratório.....	11
3.2.1. Extração de DNA.....	11
3.2.2. Caracterização e Transferibilidade dos locos de microssatélites.....	11
3.2.3. Amplificação e Genotipagens das amostras populacionais de matrinxã.....	13
3.3. Análises Genéticas.....	15
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	16
4.1. Caracterização e Transferibilidade dos locos de microssatélites para <i>Brycon amazonicus</i>	16
4.2. Caracterização dos locos de microssatélites para as amostras populacionais.....	17
4.3. Distribuição da diversidade genética em matrinxã.....	21
5. REFERÊNCIAS.....	22
6. CRONOGRAMA DE ATIVIDADES.....	24

Resumo

A espécie *Brycon amazonicus* é conhecida como matrinxã na maior parte da Amazônia Central 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. A análise genética de populações naturais é importante para revelar a quantidade de variabilidade genética potencial das populações e a forma como esta variação genética está distribuída geograficamente, logo, esse trabalho visa caracterizar geneticamente as populações naturais e cultivadas de matrinxã (*Brycon amazonicus*), comparando os níveis de variabilidade genética encontrados, por meio de dez marcadores moleculares microssatélites. Foram amostradas três localidades da natureza: Tabatinga, Manaus e Tefé – localizadas na calha do rio Solimões-Amazonas; e três de Estações de piscicultura do Estado do Amazonas: Piscicultura Águas Claras, Fazenda Experimental da UFAM e Estação de Piscicultura de Balbina. Para amplificação dos locos de microssatélites através da técnica da PCR (reação em cadeia da polimerase) foram utilizados 10 pares de *primers* desenvolvidos para *Brycon opalinus* e *Brycon hilarii* transferidos para a espécie em estudo. As genotipagens foram realizadas em sistema multiplex durante a reação de genotipagem com o propósito de melhor aproveitamento de tempo e reagentes. Os resultados da AMOVA mostraram que a menor variação genética (2,60%) encontra-se entre as localidades e mais que 90% entre todos os indivíduos, sugerindo baixa diferenciação genética entre as localidades amostradas ($P < 0,05$). No entanto, considerando somente as amostras populacionais da natureza, encontrou-se ausência de estrutura populacional. Foi encontrado um total de 122 alelos e uma riqueza alélica de 12,2 alelos por loco. A heterozigosidade esperada total foi de 0,827. Estes valores indicam alta variabilidade genética quando comparadas com outras espécies de peixes amazônicos. Além disso, a homogeneidade nas medidas de variabilidade genética entre as localidades amostradas sugere que os indivíduos provenientes do cativeiro apresentam níveis de variabilidade satisfatórios para a “saúde genética” de seus descendentes.

PALAVRAS-CHAVE: Variabilidade genética, Microssatélites, Matrinxã.

1. Introdução

A espécie *Brycon amazonicus* é conhecida como matrinxã na maior parte da Amazônia Central (Santos *et al.* 2006; Lima 2003; Filho 2009), sendo também chamada na bacia do rio Madeira de “jatuarana”. O matrinxã é um peixe de escama, que chega a 80 cm de comprimento, atinge 5 kg de peso vivo, apresenta hábito alimentar onívoro tais como: frutos, sementes e insetos. Pode ser encontrada em diversos hábitat durante as diferentes fases de sua vida (Goulding 1979; Hoshiba 2007). Sua distribuição geográfica encontra-se ao longo do Rio Solimões-Amazonas e tributários, na bacia do Rio Orinoco e no Rio Essequibo na Venezuela (Lima 2003). Seus principais predadores são os botos, *Inia geoffrensis* (Blainville 1817) e *Sotalia fluviatilis* (Gervais & Deville 1853; Goulding 1979, 1980; Santos *et al.* 2006) (Filho *et al.* 2009). Esta espécie faz migração reprodutiva no início da enchente, quando desce os afluentes para desovar nos rios de água branca, e realiza também uma migração trófica, quando sobe os rios, na enchente/cheia, para se alimentar na floresta alagada. Além disso, faz também deslocamentos de dispersão, quando deixa as áreas que estão secando e penetra no leito dos rios. Os alevinos e jovens são criados nas áreas de várzea, no período que vai da enchente até a seca, enquanto os adultos e jovens recrutados das áreas de várzea fazem “arribação”, isto é, dispersam rio acima no período da seca (Santos *et al.* 2006). Pelo fato de a espécie ser migradora, o matrinxã não se reproduz em condições de cativeiro, pois a ovogênese e a desova não se completam, a não ser que sejam estimuladas artificialmente por aplicação de hormônios (Bernardino *et al.* 1993; Gomes & Urbinati 2005). A espécie se destaca no setor econômico devido à rápida adaptação à ração artificial, qualidade da carne e pela sua utilização na pesca esportiva (Castagnolli 1992, Hoshiba 2007).



Figura 1. Exemplar de *Brycon amazonicus* (matrinxã)

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 e pode ser medida usando-se estimativas genéticas como polimorfismo, heterozigosidade média e diversidade alélica (Frankham *et al.* 2002). Assim, como as condições ambientais podem variar de forma não previsível, quanto maior o repertório de alelos diferentes em uma população maior será as chances dos indivíduos dessa população sobreviverem a essas variações.

A análise genética de populações naturais é importante para revelar a quantidade de variabilidade genética potencial das populações. As populações naturais normalmente têm níveis altos de variabilidade genética e essa variação é introduzida por mutação ou migração de indivíduos de outras populações e é perdida por deriva genética, endocruzamento e seleção natural (Frankham *et al.* 2002). Por outro lado, em populações confinadas como as criadas em cativeiro, há uma tendência de redução da variação genética, pois aumentam as chances de endocruzamento, tornando os peixes mais vulneráveis a parasitoses, menos tolerantes a mudanças ambientais, menor sucesso reprodutivo entre outros que só reduzem as chances de sobrevivência, o que traduziria diretamente em contratempo na piscicultura. Por isso, a determinação da variabilidade genética é importante tanto para populações naturais quanto para manejo e comercialização de peixes cultivados, havendo a necessidade de uma previsão para manter a variabilidade genética do estoque, pois tanto a seleção intencional quanto a não intencional afetam os níveis de variabilidade da população (Muir & Roberts 1993).

No presente estudo foram utilizados marcadores moleculares microsatélites, que têm se mostrado excelente ferramenta para análises em nível intra-populacional e inclusive na piscicultura e aquicultura onde as diferenças genéticas entre populações são limitadas. Isto porque, estes marcadores apresentam características de alto polimorfismo, são multialélicos, co-dominantes e de ampla distribuição no genoma (Lee & Koecher 1996). O uso das técnicas moleculares na pesquisa pesqueira tem aumentado nos últimos anos devido ao desenvolvimento das técnicas e também a conscientização do valor dos dados genéticos (Ward & Grave 1995), para questão de políticas públicas do setor pesqueiro.

Segundo Scholotterer & Pemberton (1998) as sequências denominadas DNA microsatélite têm unidades de repetição de 1 a 6 nucleotídeos de comprimento repetidas em tandem. Essas sequências são geralmente encontradas nas regiões não codificadoras do genoma (sendo considerados marcadores neutros) (Goldstein & Scholotterer 1999). Estes marcadores, também chamados de “*simple sequence repeats* ou SSR”, são hiper-variáveis, co-dominantes e revelam variações no comprimento entre os alelos (Parker *et al.* 1998; Sunnucks 2000). Deste modo,

sua utilização na piscicultura e aqüicultura, permite um rápido progresso nas investigações da variabilidade genética, identificação de espécies e linhagens, entre outros (Liu & Cordes 2004).

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). A extenuação da variabilidade genética dentro e entre populações exploradas pode ser um componente decisivo para a sobrevivência de uma espécie a médio e longo prazo. A utilização de marcadores microssatélites para os estudos genéticos dessa espécie é uma importante ferramenta para se estimar seguramente parâmetros genéticos importantes para conservação da espécie como estimativas do tamanho efetivo populacional e a constatação de populações que sofreram recente redução no tamanho populacional (Hedrick, 2004), além de evidenciar estrutura de população, inferindo padrão de dispersão entre os peixes com grande confiabilidade.

Deste modo, a utilização de marcadores moleculares microssatélites permitiu acessar os níveis de variabilidade genética das amostras estudadas. Com esta abordagem foi possível comparar a variabilidade genética das populações naturais e cultivadas, a fim de orientar medidas de manejo, se necessário nas estações de piscicultura que serão amostradas neste estudo, ou ainda no que se referem às populações naturais amostradas na calha do rio Solimões-Amazonas, contribuindo para futuras estratégias de conservação.

2. Objetivos

2.1. Objetivo geral

Caracterizar geneticamente as populações naturais e cultivadas de matrinxã (*Brycon amazonicus*), comparando os níveis de variabilidade genética encontrados.

2.2 Objetivos específicos

- Otimizar os 11 pares de *primers* de locos microssatélites desenvolvidos para outras espécies de *Brycon* que se mostraram polimórficos para a espécie deste estudo.
- Estimar os níveis de variabilidade genética das populações naturais e cultivadas do matrinxã.
- Comparar os níveis de variabilidade genética de *Brycon amazonicus* de amostras populacionais da natureza e de cativeiro.

3. Material e Métodos

3.1. Amostragem

Neste trabalho foram amostradas três localidades: Tabatinga, Manaus (dos arredores como o lago Janauacá) e Santarém, localizadas na calha do rio Solimões-Amazonas, como amostras populacionais da natureza (Figura 2). Também foram amostrados indivíduos de cativeiro (matrizes), oriundos de três estações de piscicultura do Estado do Amazonas: Piscicultura Águas Claras, Fazenda Experimental – UFAM e Estação de Piscicultura de Balbina. De cada localidade (natureza e cativeiro) foram coletadas amostras de 15 a 30 indivíduos. De cada indivíduo foi coletado um pedaço da nadadeira peitoral, e este foi preservado em álcool 100% para posteriores análises de laboratório.

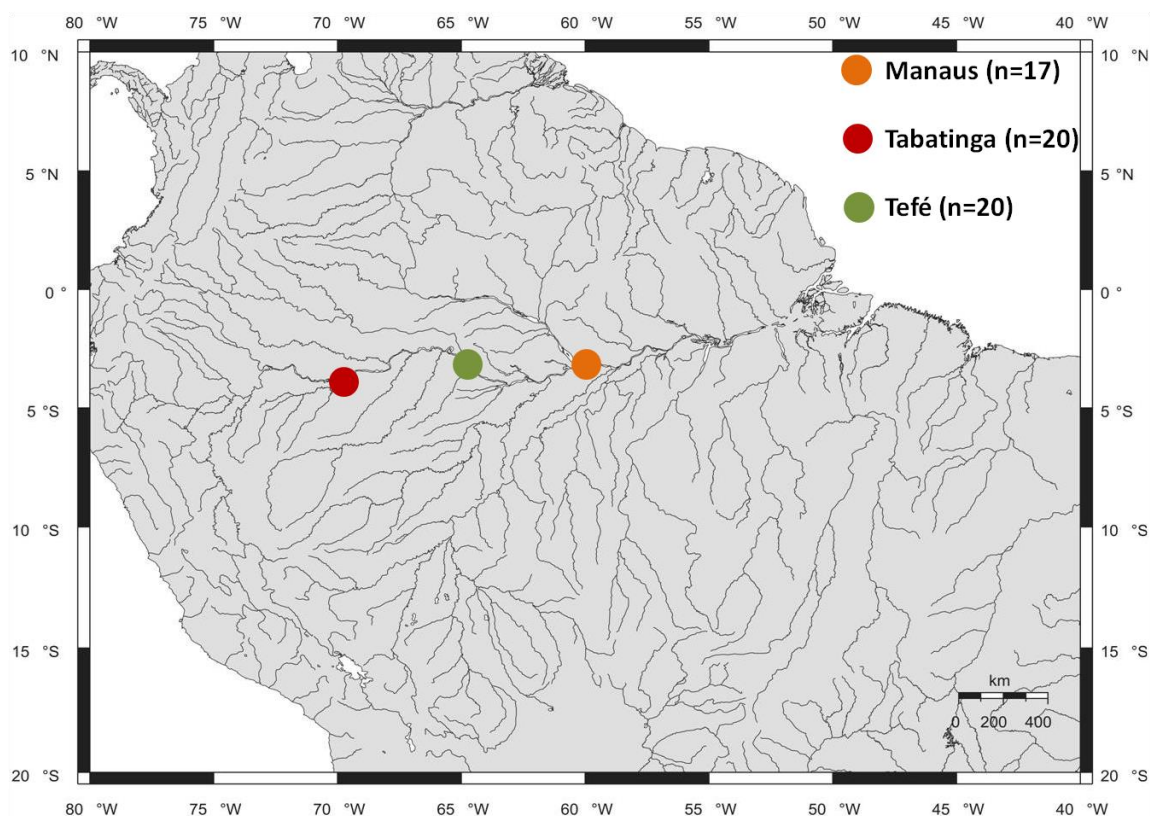


Figura 2. Mapa da bacia Amazônica com as localidades amostradas na natureza.



Figura 3. Piscicultura Águas Claras



Figura 4. Fazenda Experimental – UFAM



Figura 5. Estação de Piscicultura de Balbina

3.2 Metodologia do Laboratório

3.2.1. Extração do DNA

As amostras de tecido de cada indivíduo foram 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 a 70%, ao final desse procedimento o DNA foi ressuspensionado 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.

3.2.2. Caracterização e Transferibilidade dos locos de microssatélites

Para amplificação dos locos de microssatélites através da técnica da PCR (reação em cadeia da polimerase) foram utilizados 11 pares de *primers* desenvolvidos para *Brycon opalinus* (Barroso *et al.* 2003) e *Brycon hilarii* (Sanches & Galetti Jr. 2006).

A caracterização dos locos de microssatélites envolveu algumas etapas descritas a seguir: primeiramente realizou-se uma PCR de gradiente com o propósito de verificar a temperatura ótima para anelamento dos *primers*. Esta PCR apresentou volume final de 12 μL contendo 3,7 μL de H₂O, 1,5 μL de MgCl₂ (25mM), 1,25 μL de dNTPs (10 mM), 1,25 μL de tampão 10x (100mM Tris-HCl, 500mM KCl), 1,5 μL do *primer forward*, 1,5 μL do *primer reverso*, 0,3 μL de *Taq DNA Polymerase* (5 U/μl) e 1 μL do DNA (com a concentração de 50ng). As condições da PCR foram as seguintes: desnaturação inicial a 93°C por 1 minuto, desnaturação a 94°C por 1 minuto, temperatura de anelamento dos *primers* variando entre 50 a 65°C (gradiente de temperatura testado: 50°C, 53°C, 56°C, 59°C, 62°C e 65°C) por 35 segundos, e extensão a 72°C por 1 minuto, repetidas por 35 vezes, com extensão final de 10 minutos a 72°C.

Para verificar o resultado da reação amplificada foi utilizado 2μL do produto de PCR juntamente com 2μL de corante Gel Red e em seguida, aplicado em gel de agarose 1,0% e então visualizado através de um transluminador de luz UV *Image Master*. Após determinada a temperatura ótima de anelamento de cada *primer*, iniciou-se o teste de polimorfismo através de

PCR de genotipagem com volume final de 10 μL contendo 3,5 μL de H_2O , 1,0 μL de MgCl_2 (25mM), 1,0 μL de dNTPs (10 mM), 1,0 μL de tampão 10x (100mM Tris-HCl, 500mM KCl), 1,0 μL do *primer forward* contendo a cauda M13 (2 μM), 1,5 μL do *primer reverso*, 0,7 μL do *primer M13* marcado com fluorescência azul (FAM), 0,3 μL de *Taq DNA Polymerase* (5 U/ μl) e 1 μL do DNA (50ng). O perfil de amplificação da PCR foi uma desnaturação inicial a 94°C por 1 minuto, seguida de outra desnaturação a 94°C por 30 segundos, temperatura de anelamento dos *primers* variando entre 50 a 65°C dependendo do *primer* por 30 segundos, e extensão a 68°C por 30 segundos, repetidas por 25 vezes, seguidas por outro ciclo para anelamento dos *primers M13* com as seguintes condições: desnaturação a 94°C por 20 segundos, temperatura de anelamento do *primer M13* a 53°C por 20 segundos, e extensão a 72°C por 30 segundos, repetidas por 20 vezes, com extensão final de 30 minutos a 72°C.

A eficiência da reação amplificada foi checada em gel de agarose 1,0% com marcador molecular de 100 pares de bases, onde foi aplicado 2 μL do produto de PCR juntamente com 2 μL de corante Gel Red. Em seguida foi visualizado através de um transiluminador de luz UV.

Para a reação de genotipagem os produtos das PCRs foram diluídos de acordo com a intensidade de bandas visualizadas,. Esta diluição foi assim realizada: PCR que apresentaram as bandas com pouca intensidade foram diluídos em 10-30 μL de água ultra pura e os produtos de PCR que apresentaram bandas intensas, foram diluídas em 30-50 μL de água ultra pura. Para cada 1 μL de produto diluído foram adicionados 8,0 μL de formamida Hi-Di (Applied Biosystems, Inc), 1,0 μL de ROX (6-carboxi-X-rodamina (ROX) *size standard*, que consiste em uma série de fragmentos de tamanho diferente e conhecido amplificados com *primers* específicos a partir de um molde de DNA conhecido pUC19). As amostras foram genotipadas em seqüenciador automático ABI 3130xl (Applied Biosystems, Inc).

A caracterização dos locos de microssatélites para os 11 pares de *primers* foi realizada com oito amostras de *B. amazonicus*, oriundas de: Humaitá, Borba, Lago Janauacá, Santarém, Coari, Tabatinga e Jacareacanga (PA). O tamanho dos alelos (em pb) foi estimado e editado usando o *software* específico para genotipagem *GeneMapper*TM *software* versão 4.0 (Applied Biosystems Inc.). Esse *software* determina o tamanho dos alelos, através da comparação com o marcador ROX *size standard*.

3.2.3. Amplificação e Genotipagens das amostras populacionais de matrinxã

As condições de amplificação para os locos de microssatélites foram: 2,2 μL de água autoclavada deionizada, 1,0 μL de MgCl_2 (25mM), 1,0 μL de dNTPs (10 mM), 1,0 μL de

tampão 10x (100mM Tris-HCl, 500mM KCl), 1,0 µL de *primer forward* contendo a cauda M13 (2 µM), 1,5 µL de *primer reverso*, 0,7 µL do *primer* M13 marcado com fluorescência (FAM), 0,6 µL de *Taq DNA Polymerase* (5 U/µl) e 1 µL do DNA (com a concentração variando entre 50 ng e 100 ng), com um volume final de 10,0 µL. O perfil da PCR foi: desnaturação a 94°C por 20 segundos, temperatura de anelamento do *primer* (dependendo do resultado da otimização) por 20 segundos, e extensão a 68°C por 30 segundos, repetidas por 30 vezes, seguidas por outro ciclo para anelamento do *primer* M13 com as seguintes condições: desnaturação a 94°C por 20 segundos, temperatura de anelamento do *primer* M13 a 50°C por 20 segundos, e extensão a 72°C por 30 segundos, repetidas por 15 vezes, com extensão final de 30 minutos a 72°C. Para verificar a eficiência da reação amplificada e comparação da banda em gel correspondente ao tamanho do microssatélite amplificado, foi utilizado 2µL do produto de PCR juntamente com 2µL de corante Bromofenol e em seguida, aplicados em gel de agarose 1,0%, com marcador (100pb).

Os produtos das PCRs foram diluídos de acordo com o padrão de intensidade das bandas visualizadas em gel de agarose. Para cada 1 µL de produto diluído foram adicionados 8,0 µL de formamida Hi-Di (Applied Biosystems, Inc), 1,0 µL de ROX (6-carboxi-X-rodamina (ROX) *size standard*, que consiste em uma série de fragmentos de tamanho diferente e conhecido amplificados com *primers* específicos a partir de um molde de DNA conhecido pUC19), modificado de De Woody *et al.* (2004), que depois de preparado foi diluído 1:5. As amostras foram genotipadas em sequenciador automático ABI 3130xl (Applied Biosystems, Inc).

As genotipagens foram realizadas em sistema multiplex durante a reação de genotipagem com o propósito de melhor aproveitamento de tempo e reagentes. Depois de otimizados, os grupos de *primers* (Tabela 1) foram escolhidos por possuírem alelos em faixas de tamanho diferentes ou estarem marcados por diferentes tipos de fluorescências.

O tamanho dos alelos (em pb) foi estimado e editado usando o *software* específico para genotipagem *GeneMapper TM software* versão 4.0 (Applied Biosystems Inc.). Esse *software* determina o tamanho dos alelos, através da comparação com o marcador ROX *size standard*.

Tabela 1. Sistema multiplex utilizado na reação de genotipagem para as amostras de matrinxã.

Multiplex	Primers	Intervalo de tamanho (pb)	Temperatura de anelamento	Fluorescência
Grupo 1	BoM7 + BoM5	160 - 220/115 – 165	52 °C	HEX/FAM
Grupo 2	BoM13 + Bh5	190 - 210/210 – 240	62 °C	HEX/FAM
Grupo 3	Bh17 + BoM2	220 - 270/140 – 160	65 °C	HEX/FAM
Grupo 4	Bh15 + Bh6	145- 185/190 – 210	62 °C	HEX/FAM
Grupo 5	BoM6 + BoM1	140- 190/175 – 235	62 °C	HEX/FAM

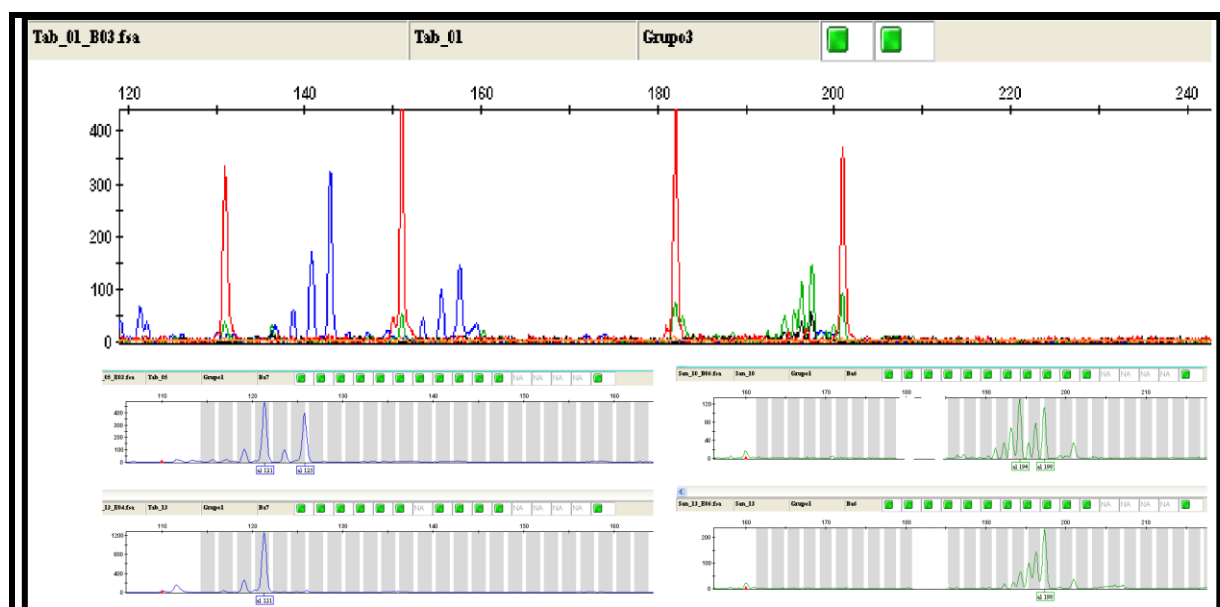


Figura 6. Sistema multiplex usado para genotipagem das amostras de matrinxã.

3.3. Análises Genéticas

Para a análise de dados foi utilizado o programa Arlequin 3.5 (Excoffier & Lischer 2010), que calcula o número de alelos, a heterozigidade observada e heterozigidade esperada de cada loco, e é usado para acessar o desequilíbrio de ligação entre os pares de locos e o teste do equilíbrio de Hardy-Weinberg. Neste mesmo programa, as medidas de estruturação genética foram realizadas utilizando-se a Análise de Variância Molecular (AMOVA). Adicionalmente

também obtivemos os dados de coeficientes de endogamia (F_{IS}) e de diferenciação genética (F_{ST}). A significância dos métodos foi avaliada por testes de permutação (1000 réplicas) e todos os níveis de significância para os testes envolvendo comparações múltiplas foram ajustados seguindo a correção de Bonferroni (Rice 1989).

4. Resultados e Discussão

4.1. Caracterização e Transferibilidade dos locos de microssatélites para *Brycon amazonicus*

Todos os *primers* em teste amplificaram para quase todas as temperaturas testadas, sendo que para alguns foi selecionada a temperatura de acordo com a intensidade e qualidade de bandas (tamanho em pares de bases) amplificadas (Tabela 2).

Para estimar a variabilidade genética do matrinxã *Brycon amazonicus*, foram testados 11 pares de *primers* de microssatélites desenvolvidos para outras espécies de *Brycon*. Depois de transferidos e caracterizados para *Brycon amazonicus*, os resultados das genotipagens mostraram que de todos os *primers* apenas o Bh 8 não obteve sucesso para amplificação e determinação de tamanho de alelos. Após a formação da matriz de dados com os tamanhos dos alelos, verificou-se que todos os locos foram polimórficos com número de alelos variando de três (loco Bh 6) a nove (loco Bh 17) (Tabela 2).

Tabela 2. Otimização dos 11 pares de *primers* de locos microssatélites.

Locos	Nº de indivíduos	Tamanho (pb)	Nº de Alelos	Temperatura de anelamento
Bh 8	8	-	-	50-62 °C
Bo M13	8	189 – 203	8	62 °C
Bh 5	8	218 – 232	5	62 °C
Bh 15	8	149 – 169	6	62 °C
Bh 17	8	188 – 238	9	50-65 °C
Bo M7	8	187 – 197	6	50-62 °C
Bo M5	8	121 – 145	7	50-52 °C
Bo M2	8	132 – 158	8	50-65 °C
Bo M6	8	147 – 169	7	62 °C
Bo M1	8	185 – 207	5	62 °C

Bh 6	8	195 – 207	3	62 °C
-------------	---	-----------	---	-------

4.2 Caracterização das amostras populacionais do matrinxã

Foi genotipado um total de 145 indivíduos procedentes de três localidades da natureza e três estações de piscicultura do Estado do Amazonas, utilizando-se dez locos de microssatélites. A diversidade genética, a partir das análises com base nos locos estudados, resultou num total de 122 alelos, com uma média de 12,2 alelos por loco (Tabela 5). O loco que apresentou o menor número de alelo foi o Bh6 (sete alelos) e o maior número de alelo (20) foi encontrado no loco BoM1 (Tabela 3).

Considerando o conjunto de locos para cada uma das localidades, verificou-se que em Balbina foi encontrado o menor número de alelos (74) e na estação de piscicultura da Fazenda Experimental da UFAM, o maior número de alelos com 100. Por conseguinte, estas duas localidades apresentaram a menor e maior diversidade genética média (0.7568 ± 0.3977 em Balbina e 0.8424 ± 0.4384 na Fazenda Experimental da UFAM). O coeficiente de endogamia intra-populacional (F_{IS}) mostrou uma diferenciação genética moderada apenas para Tefé (0.1428)(Tabela 5), isto pode ser devido ao sistema de reprodução, onde cruzamento entre parentes pode estar ocorrendo, se causas biológicas estiverem atuando. Isto também pode ser resultado de efeitos de amostragem, como por exemplo, coleta de indivíduos de mesmo cardume, visto que indivíduos da espécie *Brycon amazonicus* andam em cardumes.

Tabela 3. Índices genéticos para os 10 locos de microssatélites.

Locos	Varição de tamanho (pb)	A _T	H _O	H _E
BoM7	180 – 214	17	0.6597	0.8776
BoM5	119 – 161	18	0.7724	0.8622
BoM13	188 – 210	11	0.5310	0.8423
Bh5	206 – 238	12	0.4620	0.8629
Bh17	220 – 264	14	0.7310	0.8259
BoM2	140 – 158	10	0.7931	0.8460
Bh15	149 – 173	9	0.3241	0.6468
Bh6	190 – 208	7	0.4275	0.7665
BoM6	146 – 182	17	0.8896	0.8620
BoM1	175 – 229	20	0.4755	0.8849

Nota: A_T= número total de alelos, H_O= heterozigidade observada, H_E= heterozigidade esperada.

Valores semelhantes referentes a heteroziguidade foram encontrados em trabalhos com outras espécies do gênero *Brycon*, utilizando os mesmos locos de microssatélites, como por exemplo, o estudo feito por Barroso *et al.* (2003) sobre a estrutura genética de *Brycon opalinus* de sete populações da natureza e uma de cativeiro ao longo da bacia do Paraíba do Sul, usando sete locos de microssatélite, contendo também uma população oriunda do rio Negro. Outro estudo foi feito por Sanches & Galetti Jr. (2006) para acessar dados de estrutura genética e comparar a variabilidade genética de populações da natureza com uma de cativeiro (Tabela 4).

Tabela 4. Comparação de valores de heteroziguidade entre espécies do gênero *Brycon*.

LOCO	Ho - He			
	<i>Brycon amazonicus</i> (presente estudo)	<i>Brycon opalinus</i>	<i>Brycon opalinus</i> (população do rio Negro)	<i>Brycon insignis</i>
BoM1	0,475 – 0,884	0,601 – 0,868	0,393 – 0,923	1,000 – 0,868
BoM2	0,793 – 0,846	0,397 – 0,876	0,318 – 0,936	0,516 – 0,716
BoM5	0,772 – 0,862	0,688 – 0,862	0,788 – 0,898	–
BoM6	0,889 – 0,862	0,542 – 0,883	0,560 – 0,904	–
BoM7	0,659 – 0,877	0,710 – 0,892	0,482 – 0,966	–
BoM13	0,531 – 0,842	0,558 – 0,756	0,619 – 0,813	1,000 – 0,825

Com relação as localidades estudadas a heteroziguidade observada (H_O) variou de 0.580 em Tabatinga a 0.697 em Tefé. A heteroziguidade esperada (H_E), que é equivalente a diversidade gênica, sendo definida como a probabilidade de que dois alelos amostrados aleatoriamente em uma amostragem, não seja idêntico por descendência (Nei, 1987), mostrou-se menor em Balbina ($H_E= 0.756$) e maior na Fazenda Experimental da UFAM ($H_E= 0.842$). (Tabela 5). A heteroziguidade média total (todos os locos) para todas as amostras de cativeiro foi de 0.801 ± 0.080 , sendo que esta medida pode ser usada para caracterizar a diversidade genética das matrizes dessa espécie utilizadas no cativeiro. Na natureza, a heteroziguidade média total para caracterizar geneticamente a espécie foi de 0,827. Estes valores indicam alta variabilidade genética quando comparadas com outras espécies de peixes amazônicos (Batista, 2009; Rodrigues 2009; Santos 2010). Além disso, a homogeneidade nas medidas de variabilidade genética entre as localidades amostradas sugere que os indivíduos provenientes do cativeiro apresentam níveis de variabilidade satisfatórios para a “saúde genética” de seus descendentes (Tabela 5).

Tabela 5. Parâmetros genéticos para cada localidade amostrada.

Localidade	N	A _T	A _R	Média da diversidade gênica	Média de H _O – H _E	F _{IS}
Tabatinga	20	91	9.1	0.8085 ± 0.4258	0.580 – 0.808	0.2880
Tefé	20	94	9.4	0.8020 ± 0.4226	0.697 – 0.819	0.1428
Manaus	17	85	8.5	0.8074 ± 0.4273	0.594 – 0.807	0.2702
Piscicultura Águas Claras	30	95	9.5	0.7991 ± 0.4176	0.581 – 0.805	0.2776
Fazenda Experimental (UFAM)	30	100	10	0.8424 ± 0.4384	0.596 – 0.842	0.2953
Estação de Balbina	28	74	7.4	0.7568 ± 0.3977	0.607 – 0.756	0.2007
TOTAL	145	122	12.2	0.8241 ± 0.4238	0.606 – 0.827	

Nota: N=tamanho amostral, A_T=número total de alelos, A_R=riqueza alélica, H_O=heterozigosidade observada, H_E=heterozigosidade esperada, F_{IS}=coeficiente de endogamia intrapopulacional.

Análises para o teste de equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) mostraram que quatro locos estão em desequilíbrio para quatro localidades. O loco BoM1 está em desequilíbrio para todas as localidades. O desequilíbrio de Hardy-Weinberg encontrado para a maioria dos locos, pode ser em decorrência do excesso de homozigotos ou de heterozigotos nos referidos locos. Os locos BoM2 e BoM6 foram os únicos que mostraram-se em EHW para todas as localidades (Tabela 6).

Análises para o desequilíbrio de ligação mostraram-se significantes ($P < 0,0011$) entre os locos BoM5 e BoM6 para todas as localidades. A estação de Balbina foi a localidade que apresentou um maior número de desequilíbrio de ligação entre pares de locos (Tabela 7). Os resultados dos valores do F_{IS} (Tabela 5) resultaram em altos valores indicando um maior nível de endogamia do que o esperado para uma amostragem ao acaso.

Os resultados obtidos podem estar relacionados com a característica do comportamento da espécie que sempre migra em cardumes, tais cardumes podem conter indivíduos mais relacionados do que o esperado para uma amostragem aleatória. Ou seja, os indivíduos podem ter sido provenientes de um acasalamentos não aleatórios (captura de indivíduos de um mesmo cardume).

	BoM7	BoM5	BoM13	Bh5	Bh17	BoM2	Bh15	Bh6	BoM6	BoM1
N	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20
NA	11	10	8	10	10	6	5	6	12	13
HO	0.4500	0.8500	0.4000	0.5500	0.7000	0.7500	0.4500	0.2500	0.9500	0.4500
HE	0.8769	0.8282	0.8294	0.8769	0.8705	0.7576	0.6435	0.7246	0.8141	0.8538
<i>P</i>	0.0000	0.9008	0.0000	0.0065	0.0169	0.8392	0.0763	0.0000	0.5477	0.0001
N	19	20	20	20	20	20	20	20	20	19
NA	13	12	8	10	10	7	6	4	12	12
HO	0.7894	0.8000	0.9000	0.6000	0.7000	0.9000	0.2500	0.5500	0.8500	0.6315
HE	0.8975	0.8410	0.8461	0.8666	0.8230	0.7987	0.6641	0.7448	0.8333	0.8805
<i>P</i>	0.1219	0.6232	0.8443	0.0070	0.3192	0.5391	0.0000	0.2542	0.6873	0.0011
N	17	17	17	17	17	17	17	17	17	17
NA	10	11	8	7	9	7	5	4	13	11
HO	0.7058	0.8823	0.7058	0.4117	0.6470	0.7647	0.1764	0.1764	0.9411	0.5294
HE	0.8823	0.9073	0.8164	0.8235	0.7985	0.8164	0.6238	0.5989	0.9126	0.8948
<i>P</i>	0.3596	0.2901	0.4817	0.0008	0.1956	0.5352	0.0000	0.0001	0.4164	0.0027
N	30	30	30	30	30	30	30	30	30	29
NA	11	14	8	9	9	8	5	5	13	13
HO	0.6000	0.7000	0.4000	0.4000	0.8666	0.6333	0.2666	0.5333	0.8666	0.5517
HE	0.8231	0.8666	0.7915	0.8022	0.8384	0.7915	0.5904	0.7745	0.8841	0.8874
<i>P</i>	0.0343	0.0014	0.0000	0.0000	0.1722	0.2005	0.0000	0.0451	0.0275	0.0000
N	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30
NA	11	12	9	10	10	10	6	6	14	12
HO	0.6000	0.7000	0.5666	0.3666	0.7666	0.8333	0.3333	0.4333	0.9000	0.4666
HE	0.8830	0.8932	0.8559	0.8644	0.8333	0.8887	0.6672	0.7819	0.8785	0.8785
<i>P</i>	0.0000	0.0600	0.0016	0.0000	0.2423	0.0867	0.0001	0.0004	0.7980	0.0000
N	28	28	28	28	28	28	28	28	28	28
NA	9	11	5	8	9	7	5	6	8	6
HO	0.8214	0.7857	0.3571	0.5000	0.6428	0.8928	0.4285	0.5000	0.8571	0.2857
HE	0.8396	0.8026	0.7415	0.8272	0.6396	0.7941	0.5694	0.7805	0.7954	0.7779
<i>P</i>	0.3764	0.3024	0.0000	0.0000	0.0011	0.1550	0.0084	0.0000	0.1887	0.0000

Nota: N= número de indivíduos, NA= número de alelos, HO= heterozigosidade observada, HE= heterozigosidade esperada, *P*= significância para o Equilíbrio de Hardy-Weinberg, * Nível de significância após correção de Bonferroni ($P < 0.005$).

Tabela 7. Desequilíbrio de ligação entre pares de locos

Localidade	Desequilíbrio de ligação	Número de pares de locos em desequilíbrio de ligação
Tabatinga	BoM5-BoM6/ BoM13-BoM1	4
Tefé	BoM5-BoM6/ Bh17-BoM6/ Bh5-BoM1/ Bh17-BoM1	5
Manaus	BoM5-BoM6	1
Piscicultura Águas Claras	BoM5-BoM6/ BoM13-BoM1	5
Fazenda Experimental – UFAM	BoM5-BoM6/ Bh17-BoM6	3
Balbina	BoM5-BoM6/ BoM13-BoM1/ Bh5-BoM1/ Bh17-BoM1	10

4.3. Distribuição da diversidade genética em matrinxã

A Análise de Variância Molecular AMOVA foi utilizada para estimar a variação genética dentro e entre as seis localidades, utilizando-se nove locos de microssatélites (foi retirado da análise o loco BoM1 por estar em desequilíbrio de Hardy-Weinberg para todas as localidades), evidenciando estrutura genética significativa ($F_{ST} = 0.0260$ e $P < 0,05$). Os resultados mostraram que a menor variação genética (2,60%) encontra-se entre as localidades e mais que 90% entre todos os indivíduos, sugerindo baixa diferenciação genética entre as localidades amostradas. No entanto, considerando somente as amostras populacionais da natureza, encontrou-se ausência de estrutura populacional (Tabela 8).

Tabela 8. Análise da Variância Molecular AMOVA para matrinxã.

Localidades	Entre populações	Entre indivíduos / Dentro das populações	Dentro de indivíduos	Índice de fixação
Natureza	0.93	22.99	76.08	$F_{ST} = 0,00929$
Cativeiro	3.74	25.12	71.15	$F_{ST} = 0,03736$ ($P < 0,05$)
Toda amostragem	2.60	24.50	72.90	$F_{ST} = 0.02605$ ($P < 0,05$)

A comparação par a par de F_{ST} entre as localidades reforçou os resultados da AMOVA, mostrando um grau moderado de diferenciação genética entre todas as localidades. Estes resultados podem estar associados com o fato de que alguns locos exibiram excesso de

homozigotos, e como o F_{ST} é calculado com base na frequência de alelos, então provavelmente se evidencia o máximo da diferenciação genética (Tabela 9).

Tabela 9. Valores de F_{ST} par a par entre as localidades amostradas.

	Tabatinga	Tefé	Manaus	PAC	FEX	Balbina
Tabatinga	-					
Tefé	0.0093	-				
Manaus	0.0226	0.0155	-			
PAC	0.0231	0.0223	0.0223	-		
FEX	0.0236	0.0047	0.0192	0.0242	-	
Balbina	0.0601	0.0347	0.0599	0.0749	0.0268	-

Nota: PAC=Piscicultura Águas Claras, FEX=Fazenda Experimental da UFAM. Os valores em destaque foram significantes após correção de Bonferroni (P= 0,0033).

5. Referências

- BARROSO, R. M.; HILSDORF, A. W. S.; MOREIRA, H. L. M. MELLO, A. M.; GUIMARÃES, S. E. F.; CABELLO, P. H.; TRAUB-CSEKO, Y. M. Identification and characterization of microsatellites loci in *Brycon opalinus* (Cuvier, 1819) (Characiforme, Characidae, Bryconinae). *Molecular Ecology Note* 3, 297-298, 2003.
- BERNARDINO, G.; SENHORINI, J. A.; BOCK, C. L. Propagação artificial do matrinxã *Brycon cephalus* (Günther, 1869) (Teleostei, Characidae). *Boletim Técnico CEPTA*, v.6. n.2, p.1-9, 1993.
- CASTAGNOLLI, N. *Criação de peixes de água doce*. Jaboticabal: FUNEP. 189p. 1992.
- DE WOODY, J. A.; SCHUPP, J.; KENEFIC, L.; BUSCH, J.; MURFITT, L.; KEIM, P. Universal method for producing ROX-labeled size Standards suitable for automated genotyping. *Biotechniques* 37, 348-352. 2004.
- EXCOFFIER, L.; LISCHER, H. E. L. Arlequin suite version 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources* 10, 564-567. 2010.
- FILHO, L. C. S.; BATISTA, V. S. Dinâmica populacional da matrinxã *Brycon amazonicus* (Characidae) na Amazônia Central. *Zoologia* 26 (2): 195-203, 2009.
- FRANKHAM, R.; BALLOU, J. R.; BRISCOE, D. A. *Introduction to Conservation Genetics*. Cambridge University Press. Cambridge, England. 617p. 2002.
- GOMES, L. C.; URBINATI, E. C. Criação de Matrinxã. In: BALDISSEROTTO, B; GOMES LC. (Org.). *Espécies nativas para piscicultura no Brasil*. v. 1, p. 149-174, Santa Maria, 2005.
- GOULDING, M. *Ecologia de pesca do rio Madeira*. CNPq/INPA, Manaus, 172p. 1979.
- GOULDING, M. *The Fishes and the Forest: Explorations in Amazon Natural History*. University of California Press, Berkeley. 280p. 1980.
- GOLDSTEIN, D.B.; SCHLOTTERER, C. *Microsatellites: evolution and applications*, Oxford University Press, New York, NY. 352p. 1999.
- HEDRICK, P. W. Recent Developments in Conservation Genetics. *Forest Ecology and Management*. 197: 3–19. 2004.
- HOSHIBA, M. A. *Enriquecimento da alimentação das larvas de Matrinxã (Brycon amazoicus) com aminoácidos. Influência no crescimento inicial e sobrevivência das larvas* – UNESP: Campus do Jaboticabal/SP, 2007.
- LEE, W.J.; KOECHER, T.D. Microsatellite DNA markers for genetic mapping in the tilapia, *Oreochromis niloticus*. *J. Fish Biology* 49: 169-171, 1996.
- LIMA, F. C. T. Subfamily Bryconinae (Characins, Tetras). In: REIS, R.E; KULANDER, S. O; FERRARIS JR, C. J. (Orgs.) *Check List of the Freshwater Fishes of South and Central America*. EDPURCS, Porto Alegre. p. 174-181, 2003.

- LIU, Z. J.; CORDES, J. F. DNA Marker Technologies and Their Applications in Aquaculture Genetics. *Aquaculture*. 238 1-37, 2004.
- MUIR, J. F.; ROBERTS, R. J. *Recent advances in aquaculture IV*. Blackwell Scientific Publications. London, 340p. 1993.
- NEI, M. *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia University Press, New York, NY, USA. 512p. 1987.
- PARKER, P. G.; SNOW, A. A.; SCHUG, M.D.; BOOTON, G.C.; FUERST, P.A. What molecules can tell us about populations: choosing and using a molecular marker. *Ecology* 79: 361–382, 1998.
- PRITCHARD, J. K.; STEPHENS, M.; DONNELLY, P. Inference of Population Structure Using Multilocus Genotype Data. *Genetics*, 155: 945–959. 2000.
- RICE, W. R. Analyzing tables of statistical tests. *Evolution* 43, 223-225, 1989.
- SANTOS, G. M.; FERREIRA, E. J. G.; ZUANON, J. A. S. *Peixes Comerciais de Manaus – IBAMA-AM/ProVárzea*, 2006.
- SANCHES, A.; GALETTI Jr., P. M. Microsatellites loci isolated in the freshwater fish *Brycon hilarii*. *Molecular Ecology Notes* 6, 1045-1046, 2006.
- SCHOLOTTERER, C.; PEMBERTON, J. En: *Molecular Approaches to Ecology and Evolution*. Eds. Desalle R. & Schierwater B. Birkhäuser, Basel. The use of microsatellites for genetic analysis of natural populations – a critical review. pp. 71-86, 1998.
- SMITH, M. *A pesca no rio Amazonas*. Manaus, CNPq/INPA. 154p, 1979.
- SUNNUCKS, P. Efficient genetic markers for population biology. *Trends Ecol. Evol.* **15**: 199-203, 2000.
- VAN OOSTERHOUT, C.; HUTCHINSON, W. F.; WILLS, D. P. M.; SHIPLEY, P. MICRO-CHECKER: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes*, v. (4) 535-538p. 2004.
- WARD, R. D.; GRAVE, P. M. Appraisal of molecular genetic techniques in fisheries. In: *Molecular genetics in fisheries*. (Carvalho, G. R.; Pitcher, T.J.). p. 29-5. 1995.

6. Cronograma de Atividades

Nº	Descrição	Ago 2011	Set	Out	Nov	Dez	Jan 2012	Fev	Mar	Abr	Mai	Jun	Jul
	Extrações de DNA	R	R	R	R	R	R						
	Amplificações nas regiões microssatélites via PCR		R	R	R	R	R						

	Análises genéticas				R	R	R	R	R	R	R	R	
	Elaboração do Resumo e Relatório Final												R
	Preparação da Apresentação Final para o Congresso												R

R= Realizado

E= Em execução

P= Pendente