



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA**  
**FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA**

**PROSPECÇÃO DE MARCADORES MOLECULARES SEXO-ESPECÍFICOS E  
ANÁLISE DE ESTRUTURA POPULACIONAL DE PIRARUCU (*Arapaima gigas*) NA  
REGIÃO DE SANTARÉM, PARÁ**

**IASSUDARA GARCIA DE ALMEIDA**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM CIÊNCIAS ANIMAIS**

**BRASÍLIA/DF**  
**MARÇO DE 2012**



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA**

**PROSPECÇÃO DE MARCADORES MOLECULARES SEXO-ESPECÍFICOS E  
ANÁLISE DE ESTRUTURA POPULACIONAL DE PIRARUCU (*Arapaima gigas*) NA  
REGIÃO DE SANTARÉM, PARÁ**

**ALUNA: Iassudara Garcia de Almeida**

**ORIENTADOR: Alexandre Rodrigues Caetano**

**CO-ORIENTADOR: Samuel Rezende Paiva**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM CIÊNCIAS ANIMAIS**

**PUBLICAÇÃO: 64/2012**

**BRASÍLIA/DF  
MARÇO DE 2012**

## REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA E CATALOGAÇÃO

**ALMEIDA, I. G. PROSPECÇÃO DE MARCADORES MOLECULARES SEXO-ESPECÍFICOS E ANÁLISE DE ESTRUTURA POPULACIONAL DE PIRARUCU (*Arapaima gigas*) NA REGIÃO DE SANTARÉM, PARÁ..** Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2012, 104. Dissertação de Mestrado.

Documento formal, autorizando reprodução desta dissertação de mestrado para empréstimo ou comercialização, exclusivamente para fins acadêmicos, foi passado pelo autor à Universidade de Brasília e achase arquivado na Secretaria do Programa. O autor e seu orientador reservam para si os outros direitos autorais, de publicação. Nenhuma parte desta dissertação de mestrado pode ser reproduzida sem a autorização por escrito do autor ou do seu orientador. Citações são estimuladas, desde que citada à fonte.

### FICHA CATALOGRÁFICA

ALMEIDA, Iassudara Garcia de. **Prospecção de marcadores moleculares sexo-específicos e análise de estrutura populacional de Pirarucu (*Arapaima gigas*) na região de Santarém, Pará..** Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Brasília, 2012, 104. Dissertação (Mestrado em Ciências Animais) – Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Brasília, 2012.

1. Marcadores moleculares. 2. BSA-RAPD. 3. Estrutura populacional. 4. DNA mitocondrial.

CDD ou CDU  
Agris / FAO

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA**

**PROSPECÇÃO DE MARCADORES MOLECULARES SEXO-ESPECÍFICOS E  
ANÁLISE DE ESTRUTURA POPULACIONAL DE PIRARUCU (*Arapaima gigas*) NA  
REGIÃO DE SANTARÉM, PARÁ**

**IASSUDARA GARCIA DE ALMEIDA**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO SUBMETIDA  
AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
CIÊNCIAS ANIMAIS, COMO PARTE DOS  
REQUISITOS NECESSÁRIOS À OBTENÇÃO DO  
GRAU DE MESTRE EM CIÊNCIAS ANIMAIS**

**APROVADA POR:**

---

**ALEXANDRE RODRIGUES CAETANO, PhD (Embrapa)  
CPF: 187.429.838-60 E-mail: acaetano@cenargen.embrapa.br**

---

**FRANCISCO ERNESTO MORENO BERNAL, PhD (UnB)  
CPF: 000810096-90 E-mail: framobe@unb.br**

---

**PATRÍCIA IANELLA, PhD (Embrapa)  
CPF: 288.482.938-59 E-mail: patricia.ianella@embrapa.br**

**BRASÍLIA/DF, 09 de MARÇO de 2012**

*Dedicatória...*

*“... sem amor eu nada seria.”*

Portanto, dedico esse trabalho aos grandes amores da minha vida:  
**Bruno, Maria do Rosário, Ivanil** (em memória) e **Marcos Vinícius**

## AGRADECIMENTO

Agradeço primeiramente a Deus, por ser a fonte da minha força e perseverança, me movendo, através da fé, em busca dos meus sonhos. Ter um porto seguro é fundamental para poder enfrentar as adversidades impostas pelo caminho escolhido.

Ao Bruno, meu amor, companheiro, amigo, conselheiro, ajudante. Sem você esses dias de escrita teriam sido mais difíceis. Obrigada por todo apoio, pela nova família que formamos: eu, você e a Chica. Poder compartilhar todos os momentos da minha vida com você é muito gratificante e poder compartilhar dos seus momentos é ainda mais. Te amo muito!

À minha mãe Maria do Rosário, pela educação dada a mim a qual formulou o meu caráter e princípios, pelos conselhos dados durante essa etapa para poder enfrentar da melhor forma as dificuldades e obstáculos. Pelas velas de sete dias acesas para iluminar minha mente na reta final. Por todo amor, carinho e advertências. Sem você e o pai eu não seria quem sou hoje.

Ao meu irmão lindo, Marcos Vinícius, pela alegria que passa, até quando está mal humorado. Pelo ombro, conselhos, loucuras, amor, carinho. Você, mesmo com quase dois metros, continuará sendo meu irmãoZINHO por toda a vida, um irmão pra eu cuidar, amar, aconselhar e sentir muita saudade devido a distância.

Ao meu pai, Ivanil, que faz muita falta. Sei que onde quer que esteja, sem dúvida, estará torcendo por mim como sempre torceu em todos os momentos da minha vida. A dor da sua ausência é muito grande, mas é confortada pelas lembranças que deixou.

A grande família Mendes, que me acolheu, ajudou, aconselhou e tornou meus dias mais felizes nessa reta final. Mais um exemplo, junto a minha família, de como uma família deve ser: unida, feliz e acolhedora. Seu Carlos, Cida, Thais, Biazinha, André e Rodrigo: muito obrigada!

Gostaria de agradecer, meu orientador Dr. Alexandre Rodrigues Caetano, por toda ajuda oferecida, todos os conselhos, ensinamentos, compreensão. É um excelente orientador, assim como pessoa. Meu muito obrigada por contribuir de forma direta nessa etapa tão importante profissionalmente.

Ao meu co-orientador, Dr. Samuel Rezende Paiva, pela paciência e atenção, pela ajuda, ensinamentos. Também foi um excelente co-orientador, é um excelente pesquisador e uma ótima pessoa. Obrigada pelos chocolates, que serviam, muitas vezes, para acalmar os ânimos das mulheradas do laboratório.

A todos que contribuíram para a realização desse trabalho, me proporcionando maior conhecimento e maturidade: Patrícia Ianella, Marcos Tucunduva, Raimundo Nonato, Danielle Paiva, Thaísa, Neide.

Aos amigos do laboratório: Gleison, Carol, Regina, Bete, Cecília, Bárbara, Ronyere, Dani, Tati, Paty, Carla, Thaísa, Samuel (Davi), Lu, ao pessoal do LGV e também aos colegas da pós e da Embrapa.

Aos amigos que me apoiaram e deram o ombro em muitos momentos, mesmo estando “longe”: Caroline Destro, Carolina Moraes, Daniele (Sabugo), Paty Mizumoto, Fernanda Prado, Vanessa Carvalho, Mari Marzullo e Veronica.

Ao Seu Helídio e Dona Ana, pelos altos papos no corredor na hora do café.

À Universidade de Brasília, em especial a Danielle (secretária da pós) e a CAPES pela bolsa oferecida durante esse período.

Muito obrigada a todos!

## ÍNDICE

CAPÍTULO 1 .....	1
1. INTRODUÇÃO .....	2
2. OBJETIVOS .....	5
2.1. Objetivos gerais .....	5
2.2. Objetivos específicos .....	5
3. REVISÃO DE LITERATURA .....	6
3.1 Pirarucu .....	6
4. DETERMINAÇÃO E DIFERENCIAÇÃO SEXUAL.....	11
4.1. Determinação do sexo.....	12
4.1.1 Determinação Genética do Sexo.....	12
4.1.1.1 Determinação Cromossômica .....	12
4.1.1.2 Determinação Monogênica e Poligênica.....	13
4.1.2 Determinação Sexual Ambiental.....	14
4.1.2.1 Temperatura.....	14
4.1.2.2 pH .....	15
4.1.2.3 Fatores sociais .....	15
4.2 Diferenciação sexual .....	16
5. MARCADORES MOLECULARES .....	18
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	23
CAPÍTULO 2 .....	32
1. INTRODUÇÃO .....	35
2. MATERIAIS E MÉTODOS .....	37
2.1 Coleta de amostras.....	37
2.2 Extração do DNA .....	37
2.3 Análise de Segregantes Agrupados ( <i>Bulk Segregant Analysis</i> – BSA) .....	37
2.4 Estimativa do nível de polimorfismo RAPD nas amostras testadas .....	39

3. RESULTADOS .....	40
3.1 Análise de Segregantes Agrupados .....	40
3.2 Estimativa do nível de polimorfismo RAPD nas amostras testadas .....	44
4. DISCUSSÃO .....	46
5. CONCLUSÃO .....	50
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	51
CAPÍTULO 3 .....	55
1. INTRODUÇÃO .....	58
2. MATERIALE MÉTODOS .....	60
2.1 Amostragem e extração do DNA .....	60
2.2 Amplificação do DNA e sequenciamento .....	61
2.2 Análise de dados .....	63
3. RESULTADOS .....	65
3.1 Regiões selecionadas .....	65
3.2 ATPase .....	66
3.4 Citocromo Oxidase .....	72
3.5 Citocromo Oxidase + ATPase .....	78
4. DISCUSSÃO .....	83
5. CONCLUSÃO .....	87
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	88

## RESUMO

O pirarucu (*Arapaima gigas*) é considerado um dos maiores peixes de água doce, podendo atingir três metros e peso aproximado de 200 quilos. Este peixe possui grande importância econômica para populações ribeirinhas da Bacia Amazônica, por esse motivo vem sofrendo uma grande exploração comercial resultando na drástica redução de espécimes e consequentemente na variabilidade genética desta espécie. O presente trabalho visa associar duas metodologias, com o objetivo de gerar mais conhecimentos sobre a biologia da espécie que sejam úteis para o desenvolvimento de tecnologias para a criação do pirarucu em cativeiro e sua conservação nas bacias fluviais onde pode ser encontrado. O pirarucu possui o comportamento de formar casais para acasalamento, o que proporciona uma barreira para sua criação em cativeiro, pois a identificação do sexo só é possível no período de maturidade sexual e por meio de métodos inviáveis economicamente e ao bem estar do peixe. Na tentativa de solucionar esse problema foi realizada uma varredura do genoma desta espécie utilizando a metodologia BSA (“Bulk Segregant Analysis”) associada a marcadores RAPD (“Random Amplified Polymorphic DNA”) a fim de prospectar sequências sexo-específicas para o desenvolvimento de um marcador molecular para sexagem de peixes pré-púberes. Foram combinadas amostras de machos e fêmeas para formar bulks sexo-específicos e estes foram avaliados com 566 primers RAPD (Operon®). Foram amplificados 2.609 fragmentos com uma cobertura estimada de um marcador a cada 714Kb. Os resultados sugerem que o pirarucu possui um sistema de determinação sexual não cromossômico ou, alternativamente, que a espécie sofreu perda recente do cromossomo sexual. O pirarucu tem passado por uma drástica redução populacional e conseqüente diminuição da variabilidade genética em algumas regiões da Bacia Amazônica. A fim de determinar o estado dessas populações e sua variabilidade, estudos de dinâmica populacional e estrutura genética têm sido realizados. Nesses estudos, normalmente se trabalha com um N amostral reduzido e uma maior abrangência geográfica. No entanto, com base nos dados obtidos neste trabalho, foi possível observar que uma amostragem maior de apenas uma região pode fornecer resultados semelhantes. A metodologia utilizada fundamentou-se no sequenciamento e análise de duas regiões do mtDNA, ATPase (n=95) e citocromo oxidase (n=97) em indivíduos de quatro populações, geograficamente próximas, na região Santarém – PA. Também foi possível concluir que em se tratando dessa espécie a variabilidade genética encontrada é baixa, no entanto, entre as populações estudadas é possível encontrar certa diferenciação. Além disso,

de acordo com a distribuição das redes de haplótipos observada, é possível sugerir uma recente expansão populacional de peixes oriundos da região Santa Maria. Esses resultados são compatíveis com os poucos trabalhos reportados na literatura sobre essa espécie, comprovando que é possível aumentar o N amostral e reduzir a representatividade geográfica, e assim melhorar a realização de estratégias de manejo locais a partir dos resultados de estudos filogenéticos para análise da estrutura populacional da espécie.

## ABSTRACT

The arapaima (*Arapaima gigas*) is considered one of the largest freshwater fish and can reach three meters and weighing approximately 200 pounds. This fish has great economic importance to coastal communities in the Amazon Basin, for this reason has been undergoing a major commercial operation resulting in drastic reduction of specimens and thus genetic variability in this species. The present work aims to link two methodologies, in order to generate more knowledge about the biology of the species that are useful for the development of technologies for the creation of arapaima in captivity and conservation in river basins where it can be found. The arapaima has behavior to form mating pairs, which provides a barrier to their breeding in captivity, because the sex identification is possible only in the period of sexual maturity and by methods uneconomical and welfare of the fish. In an attempt to solve this problem, we scanned the genome of this species using the methodology BSA ("Bulk Segregant Analysis") associated with RAPD ("Random Amplified Polymorphic DNA") to sex-specific sequences prospect for the development of a molecular marker for sexing fish prepubescent. Samples were combined to form male and female sex-specific bulks and these were evaluated with 566 RAPD primers (Operon ®). 2609 fragments were amplified with an estimated coverage of one marker every 714Kb. The results suggest that pirarucu has a system for determining sex chromosome not or, alternatively, that it has suffered sudden loss of the sex chromosome. The arapaima has undergone a drastic population reduction and consequent reduction of genetic variability in some regions of the Amazon Basin. In order to determine the status of these populations and their variability, studies of population dynamics and genetic structure have been performed. In these studies, usually working with a small sample N and greater geographic coverage. However, based on data obtained in this study we observed that a larger sample of one region can provide similar results. The methodology is based on the sequencing and analysis of two regions of mtDNA, ATPase (n = 95) and cytochrome oxidase (n = 97) in individuals from four populations, geographically close, in the Santarém - PA. It was also concluded that when it comes to this kind of genetic variability found is low, however, among the studied populations is possible to find some differentiation. Moreover, according to the distribution networks of haplotypes observed, it is possible to suggest a recent population expansion of fish from the Santa Maria region. These results are consistent with the few studies reported in the literature on this species, showing that it is possible to increase the sample size N and reduce geographic

representation, and thereby improve the performance of local management strategies from the results of phylogenetic studies for analysis of the structure population of the species.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

### Capítulo 1

- Figura 1** Delimitação da Bacia Amazônica no continente Sul Americano. ....6
- Figura 2** Cariótipo de *Arapaima gigas*. São observados 28 pares cromossômicos, variando entre metacêntricos, submetacêntricos, acrocêntricos e subtelocêntricos. Fonte: Marques et al., 2006. ....9

### Capítulo 2

- Figura 1** Exemplo de fragmentos amplificados com os *primers* RAPD. A letra M representa o *bulk* de machos e a F o *bulk* de fêmeas 40
- Figura 2** (A) Fragmento específico observado no *bulk* de fêmeas amplificado com o *primer* OAB17. As letras M e F representam os *bulks* de machos e fêmeas, respectivamente. (B) Resultado da amplificação do DNA de cada indivíduo contido nos *bulks* de macho e fêmea. 42
- Figura 3** (A) Fragmento específico observado no *bulk* de fêmeas amplificado com o *primer* OPP08. As letras M e F representam os *bulks* de machos e fêmeas, respectivamente (B) Resultado da amplificação do DNA de cada indivíduo contido nos *bulks* de macho e fêmea. 43
- Figura 4** Resultado da eletroforese em gel de agarose 1,5% para cada espécime de pirarucu, mostrando o polimorfismo gerado (setas). ....45

### Capítulo 3

- Figura 1** Representação geográfica dos locais onde foram feitas as amostragens de *Arapaima gigas* na região de Santarém – PA. 60
- Figura 2** Esboço do DNA mitocondrial de *Arapaima gigas* bem como a posição de cada *primer* utilizado neste estudo e seu sentido: *forward* ou *reverse*. ....62
- Figura 3** Rede *Median-Joining* (MJ) construída a partir das sequências da ATPase das populações de *Arapaima gigas* amostradas em Santarém – PA e da sequência disponível no GenBank [EF523611.1]. Os círculos representam os haplótipos identificados e possuem tamanho proporcional a sua frequência e os números em vermelho representam a posição da substituição que diferencia cada haplótipo. O círculo em vermelho representa um vetor médio gerado na análise. ....71
- Figura 4** Representação de uma suposta inserção na região Citocromo oxidase no mtDNA de *Arapaima gigas*. ....74

**Figura 5** Rede *Median-Joining* (MJ) construída a partir das sequências da CO1 das populações de *Arapaima gigas* amostradas em Santarém – PA e da sequência disponível no GenBank [EF523611.1]. Os círculos representam os haplótipos identificados e possuem tamanho proporcional a sua frequência e os números em vermelho representam a posição da substituição que diferencia cada haplótipo. O círculo em vermelho representa um vetor médio gerado na análise. (A) Somente a sequência referência e (B) adição da sequência [FJ418765.1].....76

**Figura 6** Rede *Median-Joining* (MJ) construída a partir da montagem das sequências de CO1 e ATPase das populações de Santarém – PA e da sequência disponível no GenBank [EF523611.1]. Os círculos representam os haplótipos identificados e possuem tamanho proporcional a sua frequência e os números em vermelho representam a posição da substituição que diferencia cada haplótipo. O círculo vermelho representa um vetor médio gerado na análise. ....81

## LISTA DE TABELAS

### Capítulo 2

<b>Tabela 1</b> Relação de primers utilizados para prospecção de fragmento sexo-específico para <i>Arapaima gigas</i> .....	38
---	----

### Capítulo 3

<b>Tabela 1</b> Relação de primers utilizado para o presente trabalho, bem como a sua referência.	61
<b>Tabela 2</b> Sequências do GenBank usadas nas análises de populações de <i>Arapaima gigas</i> . ...	65
<b>Tabela 3</b> Relação de haplótipos identificados para o gene mitocondrial ATPase em populações de <i>Arapaima gigas</i> amostradas neste estudo, posição das substituições observadas e frequência absoluta dos haplótipos nas populações estudadas. ....	67
<b>Tabela 4</b> Diversidade genética intra-populacional de estoques de <i>Arapaima gigas</i> obtidos a partir do gene mitocondrial ATPase coletados de Comunidades da região de Santarém, PA.	68
<b>Tabela 5</b> Relação de haplótipos identificados para o gene mitocondrial ATPase em populações de <i>Arapaima gigas</i> amostradas neste estudo, quando comparadas as sequências disponíveis no GenBank, posição das substituições observadas e frequência absoluta dos haplótipos nas populações estudadas.....	69
<b>Tabela 6</b> Valores de Fst entre pares de populações de <i>Arapaima gigas</i> .....	72
<b>Tabela 7</b> Relação de haplótipo identificados para o gene mitocondrial Citocromo oxidase em populações de <i>Arapaima gigas</i> amostradas neste estudo, mostrando a posição das substituições observadas e frequência absoluta dos haplótipos nas populações estudadas.....	73
<b>Tabela 8</b> Diversidade genética intra populacional de estoques de <i>Arapaima gigas</i> obtidos a partir do gene mitocondrial CO1 coletados de comunidades da região de Santarém - PA.....	75
<b>Tabela 9</b> Relação de haplótipos identificados para o gene mitocondrial Citocromo oxidase em populações de <i>Arapaima gigas</i> amostradas neste estudo quando comparadas as sequências disponíveis no GenBank. ....	77
<b>Tabela 10</b> Valores de Fst entre pares de populações de <i>Arapaima gigas</i> .....	78
<b>Tabela 11</b> Relação de haplótipos identificados para a montagem dos genes mitocondrial ATPase + CO1 em populações de <i>Arapaima gigas</i> amostradas neste estudo, mostrando a posição das substituições observadas e frequência absoluta dos haplótipos nas populações estudadas.....	79

<b>Tabela 12</b> Diversidade genética intra populacional de estoques de <i>Arapaima gigas</i> obtidos a partir da montagem dos genes mitocondrial ATPase + CO1 coletados de comunidades da região de Santarém - PA.....	80
<b>Tabela 13</b> Valores de Fst entre pares de populações de <i>Arapaima gigas</i> .....	82

## **CAPÍTULO 1**

## 1. INTRODUÇÃO

A aquicultura é uma atividade que vem crescendo acentuadamente desde a década de 70 no Brasil e no mundo. Segundo dados gerados pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis – IBAMA (2007), a produção de pescado pelo setor tem aumentado mais intensamente a partir de 1998. Algumas espécies ocupam posição de destaque no Brasil e no mundo, como a Tilápia (*Oreochromis niloticus*), a Truta (*Oncorhynchus mykiss*), o Salmão (*Salmo salar*) e o camarão (*Litopenaeus vannamei*).

O pirarucu (*Arapaima gigas*), espécie nativa da Bacia Amazônica, apresenta determinadas características que lhe conferem potencial para se tornar uma das principais espécies da aquicultura industrial brasileira. Para que isso seja possível, ainda é necessário o desenvolvimento de maiores conhecimentos da fisiologia reprodutiva dessa espécie para consequente produção de alevinos em escala comercial (Ono et al., 2004; Soares & Noronha, 2007). Adicionalmente, estudos para subsidiar políticas e estratégias conservacionistas são necessários a fim de preservar a espécie em seu habitat natural.

O *A. gigas* apresenta excelentes características visadas comercialmente. Dentre elas, destacam-se a qualidade da carne, a ausência de espinhos entremeados na carne, fácil adaptação da espécie aos sistemas de cultivo e rápido crescimento. Em decorrência dessas características, o pirarucu tornou-se um forte atrativo comercial, vista como uma criação promissora pelos piscicultores (Soares & Noronha, 2007).

A elevada pesca comercial e sem controle da espécie culminou em uma diminuição drástica dos estoques de pirarucu em várias bacias fluviais que ele naturalmente habita. Um fator que tem contribuído para a sobre-exploração é a facilidade de pesca, pois o *Arapaima gigas* possui respiração aérea obrigatória, necessitando emergir à superfície a cada 20 minutos. Em destaque, a sobre-exploração ocorre no período de seca quando há maior concentração dos peixes em determinadas regiões dos rios devido à diminuição de suas águas, facilitando sua captura (Soares & Noronha 2007). Dessa forma, para minimizar o impacto provocado pela pesca abusiva da espécie, o IBAMA decretou que o comprimento mínimo para a captura do peixe deve ser acima de um metro e meio total. Além disso, a captura só pode ser feita em regiões de pesca manejada e de produção em cativeiro (Arantes et al., 2007).

A criação de pirarucu em cativeiro não só evita a sobre-exploração como também otimiza a sua comercialização. Essa espécie adapta-se facilmente à criação em tanques rede, pois aceita ração extrudada, suporta baixo teor de oxigênio e variações na

qualidade da água. Assim sendo, é um animal que requer mínimos cuidados, mantendo suas características de rápido crescimento e ganho de peso (Crescêncio, 2001; Imbiriba, 2001; Cavero et al., 2002; Pereira-Filho et al., 2003; Ono et al., 2004).

Apesar de existirem relatos na literatura que destacam as peculiaridades produtivas do pirarucu, as informações referentes à sua fisiologia reprodutiva são escassas, restringindo a elaboração de estratégias de manejo reprodutivo para a espécie (Ono et al., 2004). Uma das principais dificuldades encontradas pelos pescadores e produtores é a distinção do sexo dos animais, pois a espécie não apresenta dimorfismo sexual antes do período reprodutivo, dificultando seu manejo adequado dentro dos tanques de criação (Val & Honczaryk, 1995; Ono et al., 2004; Marques et al., 2006; Lima, 2009).

A capacidade de determinar o sexo de peixes antes do período reprodutivo é de extrema importância para a produção em cativeiro da espécie. A identificação individual do sexo dos reprodutores é indispensável para manutenção da taxa de machos e fêmeas desejada dentro do confinamento. O manejo da proporção de machos e fêmeas nos tanques de reprodutores é essencial para otimizar a produção de alevinos em sistemas aquícolas (Chu-Koo et al., 2009). Uma alternativa para contornar esse problema é o desenvolvimento de marcadores de DNA sexo-específicos que possam ser utilizados para diagnosticar o sexo de peixes pré-púberes. Dentro das metodologias disponíveis para identificação de marcadores moleculares sexo-específicos, destaca-se a BSA – “Bulked Segregant Analysis” (Michelmore et al., 1991), associada com marcadores RAPD – “Random Amplified Polymorphic DNA” (Williams et al., 1990).

Além do desenvolvimento de tecnologias para criação do pirarucu em cativeiro, estudos para determinar o padrão de estruturação e nível de variabilidade genética de populações selvagens da espécie são necessários. A exploração desregulada do pirarucu tem diminuído as populações selvagens das bacias fluviais onde a espécie é encontrada e estudos com marcadores moleculares são necessários para subsidiar a formulação de políticas públicas para o estabelecimento de estratégias de conservação da espécie em seu habitat natural (Eizirik, 1996). A análise do DNA mitocondrial (mtDNA) tem sido utilizada com sucesso em estudos dessa natureza já que o mtDNA possui alta taxa de mutação, grande número de cópias por célula (Ferguson et al., 1995 e Frederico, 2006), o que permite boa precisão para estimativas de variabilidade genética intra e interpopulacional (Parker et al., 1998).

Tendo em vista os dados abordados, este trabalho foi realizado com o objetivo de prospectar marcadores moleculares sexo-específicos a fim de gerar uma ferramenta mais acessível e prática para distinção do sexo e testar a hipótese de que o nível de variabilidade com um N amostral maior em uma área menor pode fornecer resultados similares quando os locais de amostragem são maiores com um N menor, possibilitando um melhor enfoque para estratégias de manejo.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivos gerais

O estudo teve como objetivo prospectar um fragmento genômico sexo-específico para o pirarucu. Essa prospecção foi realizada com foco no desenvolvimento de uma ferramenta molecular para sexagem do pirarucu na fase pré-púbere para melhorar os processos de criação dessa espécie em cativeiro.

Adicionalmente, objetivou-se avaliar os níveis de variabilidade genética e as relações genéticas entre as quatro populações diferentes nas proximidades da cidade de Santarém no Estado do Pará, com um N amostral maior quando comparados aos trabalhos disponíveis na literatura, a fim de gerar resultados similares.

### 2.2. Objetivos específicos

- Identificar fragmentos genômicos ligados ao sexo em pirarucu;
- Estimar a cobertura genômica avaliada;
- Identificar o sistema de determinação sexual do pirarucu;
- Amplificar e sequenciar quatro regiões do mtDNA de pirarucu: ATPase, ND1, Citocromo Oxidase e D-loop;
- Identificar o número e a distribuição geográfica dos haplótipos gerados a partir de um software computacional das quatro regiões do mtDNA entre as populações de *Arapaima gigas*;
- Testar a hipótese de um N amostral maior para apenas uma região da Bacia Amazônica, Santarém – PA, a fim de obter resultados similares aos trabalhos que prospectam a variabilidade genética de pirarucu com um N amostral baixo porém com uma maior abrangência geográfica.

### 3. REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1 Pirarucu

O pirarucu (*Arapaima gigas*) pertencente à ordem Osteoglossiforme, a qual compõe um dos grupos mais primitivos de peixes teleósteos originados no período Jurássico. Além disso, recebe o título de maior peixe de escama de água doce do mundo (Venturieri & Bernardinho, 1999; Lavoué & Sullivan, 2004; Ono et al., 2004 e Scorvo-Filho et al., 2004). Seu habitat natural está localizado na América do Sul, principalmente na Bacia Amazônica (Figura 1), englobando países como Peru, Brasil, Bolívia, Colômbia e Guiana. Conforme a região, o *Arapaima gigas* recebe nomes populares diferentes, como “paiche” no Peru e pirarucu no Brasil. No território brasileiro é possível encontrá-lo nos rios Amazonas, Araguaia-Tocantins e seus afluentes, assim como nas vastas áreas alagáveis de várzeas e igapós associados a eles (Salvo-Souza & Val, 1990; Queiroz & Crampton, 1999; Imbiriba, 2001; Ono et. al, 2004).



**Figura 1:** Delimitação da Bacia Amazônica no continente Sul Americano. Fonte: i3Geo mapas.

Um *Arapaima gigas* adulto possui em média dois metros de comprimento e 80 quilogramas. No entanto, peixes com aproximadamente três metros de comprimento e peso equivalente a 200 quilogramas já foram reportados na literatura (Castello, 2004). A maturação

sexual ocorre entre o terceiro e quinto ano de vida, em uma fase na qual os indivíduos atingem aproximadamente 1,6 metros de comprimento e pesam de 40 a 50 quilogramas (Leão, 2009).

Para suportar a demanda de oxigênio exigida pelo seu grande porte, a bexiga natatória da espécie exerce uma função semelhante ao pulmão, realizando trocas gasosas. Este órgão é altamente vascularizado, segundo relatado por Soares e colaboradores (2006). Em decorrência deste aspecto fisiológico, o pirarucu necessita emergir até a superfície em intervalos de cinco a 15 minutos em busca de oxigênio, o que torna os peixes alvos fáceis para pescadores (Soares et al., 2006), principalmente no período de seca, pois se tornam mais vulneráveis em decorrência do isolamento dos lagos e sua respiração aérea (Castello, 2004; Arantes et al., 2007).

Devido ao seu grande tamanho, excelentes características da carne (ausência de espinhos, baixo teor de gordura, textura firme e coloração levemente rosada) ao aproveitamento de pele, ovos e língua óssea como produtos comerciais, o desenvolvimento de tecnologias para a criação em cativeiro do pirarucu é altamente desejável para os piscicultores (Val & Honczaryk, 1995; Imbiriba, 2001; Ono et al., 2004). O valor de mercado da espécie atrai um número elevado de pescadores que, mesmo com a implementação de mecanismos restritivos de controle da pesca, tem levado a espécie a níveis de sobre-exploração em algumas regiões da Bacia Amazônica.

Para evitar a extinção do pirarucu, em 1986, o Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) estabeleceu um tamanho mínimo de captura: 1,5 metros de comprimento total (Portaria nº 14-N, de 15 de fevereiro de 1993; Arantes, 2009). No ano de 2004, segundo a Normativa nº 34, a captura, comercialização e transporte de pirarucu foram proibidos nos estados do Amazonas, Pará, Acre e Amapá durante o período entre primeiro de dezembro e 31 de maio. Em Rondônia o defeso vai de primeiro de novembro a 30 de abril e em Roraima de primeiro de março a 31 de agosto. Essa norma imposta pelo IBAMA exclui peixes provenientes de pisciculturas devidamente registradas e acompanhados de comprovante de origem e também peixes capturados com autorização do mesmo órgão para fins científicos.

Algumas comunidades ribeirinhas se esforçam em balancear dois pontos importantes: conservação e comercialização sustentável de pirarucu de forma sustentável. Na Reserva de Desenvolvimento Sustentável de Mamirauá – AM por exemplo, pescadores

avaliam anualmente a quantidade de *A. gigas* com o objetivo de estimar o número de espécimes passíveis de serem pescados no ano subsequente (Castello & Stewart, 2010).

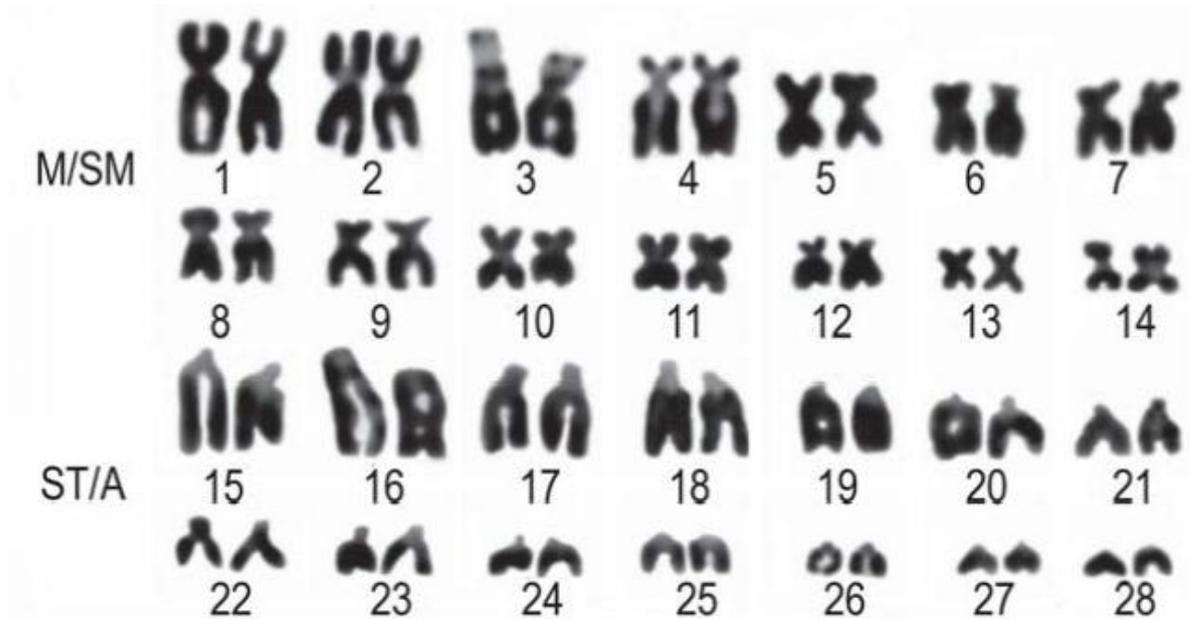
O nível de diversidade genética observado em uma espécie afeta diretamente seu potencial adaptativo e evolutivo e portanto, tem impacto direto sobre políticas de conservação que possam ser elaboradas e aplicadas. A determinação da composição genética de uma espécie e de como ela está estruturada em suas populações é de fundamental importância para que ações de manejo e conservação possam ser implementadas (Frankham et al., 2004). Em um estudo pioneiro de genética de populações em *Arapaima gigas* feito por Hrbek et al. (2005) foram avaliadas seis populações de diferentes localidades da calha principal da Bacia Amazônica e do rio Tocantins. O estudo revelou que existe uma variabilidade genética mais elevada nas áreas distantes dos grandes centros urbanos da Amazônia, ou seja, onde a exploração deste peixe para comercialização é reduzida. Leão (2009) reportou baixos níveis de variabilidade genética de muitos grupos da espécie, principalmente na bacia dos rios Araguaia/Tocantins, e atribuiu as observações à diminuição acentuada de algumas populações devido ao longo histórico de exploração comercial do pirarucu.

A criação em cativeiro do pirarucu oferece uma alternativa para produção e comercialização da espécie que poderá contribuir significativamente com a diminuição da sua exploração. A espécie possui excelentes características para a criação em cativeiro: rápido crescimento (atingindo em média 10 kg no primeiro ano de vida), rusticidade, e baixos requerimentos em relação à concentração de oxigênio dissolvido e à qualidade da água (Crescêncio, 2001; Imbiriba, 2001; Caveró et al., 2002; Pereira-Filho et al., 2003; Ono et al., 2004). No âmbito comercial a carne do pirarucu possui ótima aceitação por apresentar carne com baixo teor de gordura e desprovida de espinhos, além de possuir um filé que representa 60% de seu peso vivo (Imbiriba, 2001 & Ono et al., 2004).

Os principais problemas para viabilizar a criação do pirarucu em cativeiro estão associados ao domínio das estratégias de reprodução deste peixe, para que a produção de alevinos sadios possa ser realizada o ano todo, de forma consistente e com baixos custos (Caveró et al., 2002; Ono et al., 2004). Um dos obstáculos encontrados para o desenvolvimento de métodos avançados de reprodução da espécie está na falta de um método adequado para a sexagem de peixes jovens antes da fase reprodutiva. A diferenciação visual entre os sexos somente é possível durante o período reprodutivo, devido a alguns comportamentos e características. O pirarucu possui o hábito de formar casais para construção

de ninho e acasalamento durante a fase reprodutiva, além disso, o macho adquire uma coloração escura na parte superior da cabeça e dos flancos, o ventre e a parte caudal apresentam uma coloração avermelhada, e uma mancha alaranjada na região inferior da cabeça, entre o opérculo e a cavidade bucal (Ono et al., 2004; Monteiro et al., 2010). No entanto, nem todos os espécimes apresentam essa distinção durante o período reprodutivo (Leão, 2009 e Carreiro et al., 2011).

Além das dificuldades para sexagem deste peixe por meio de dimorfismos externos, o pirarucu também não apresenta diferenciação cromossômica entre machos e fêmeas, sendo que a esta espécie possui um número diplóide  $2n = 56$  em ambos os sexos (Figura 2) (Porto et al., 1992 e Marques et. al, 2006).



**Figura 2:** Cariótipo de *Arapaima gigas*. São observados 28 pares cromossômicos, variando entre metacêntricos / submetacêntricos (M/SM) e acrocêntricos / subtelocêntricos (ST/A). Fonte: Marques et al., 2006.

A biologia reprodutiva do pirarucu foi analisada por Lopez e Queiroz (2009) para determinar uma escala de desenvolvimento gonadal de macho e fêmea. Foi utilizado o meio macroscópico direto para discriminação, no qual as fêmeas apresentaram seis diferentes estágios: I - imaturo, II - maturação inicial, III - maturação avançada, IV - maduro, V - desovado e VI - em repouso. Os machos apresentaram apenas três estágios: I - imaturo, II - em maturação e III - maduro. Tal metodologia pode ser utilizada como ferramenta para

estudos de biologia pesqueira de pirarucus e em programas de monitoramento reprodutivo nos sistemas de manejo de pesca, porém não é possível utilizá-la para distinção do sexo antes do período reprodutivo.

Outros trabalhos buscaram identificar e descrever características moleculares com potencial para distinguir o sexo de indivíduos da espécie. Lima (2009) construiu quatro bibliotecas de EST's (*Expressed Sequence Tags*) a partir da hipófise de indivíduos machos e fêmeas, adultos e jovens a fim de identificar diferenças gênicas entre jovens e adultos, bem como entre machos e fêmeas. No entanto, as diferenças observadas por meio da ontologia dos genes encontrados nessas bibliotecas permitiram afirmar que a expressão gênica ocorre de forma diferenciada em adultos e jovens, porém de forma muito semelhante em machos e fêmeas. Chu-Koo et al (2009) buscaram determinar o sexo de *Arapaima gigas* por meio de detecção da proteína vitelogenina (Vtg) e mensuração dos níveis de esteróides sexuais ( $17\beta$  – estradiol e 11 – Ketotesterona) em amostras de sangue. Os resultados mostram que é possível distinguir machos de fêmeas com seis anos de idade por meio da concentração de Vtg (100% de eficácia) e da proporção dos hormônios 11KT/E2 (95% de eficácia). O autor ainda afirma que essa metodologia também se aplica em peixes com três anos de idade. No entanto, ainda não existe uma metodologia que permita distinguir machos e fêmeas pré-púberes.

A laparoscopia é um método invasivo que permite a identificação de machos e fêmeas, por meio da visualização dos testículos do lado esquerdo e um único ovário fusiforme ao longo da parede abdominal, ambos próximos a bexiga. Com essa técnica é possível visualizar os oócitos e diferenciar seus estágios de desenvolvimento (Carreiro et al., 2011). Apesar da diferenciação sexual via laparoscopia ser possível com níveis de acerto de 100%, a metodologia está restrita a peixes adultos, e apresenta aspectos negativos por ser um procedimento invasivo e estressante para os animais.

Diante dos vários aspectos expostos, é possível concluir que o *Arapaima gigas* possui grande potencial para a criação em cativeiro podendo também contribuir com a conservação desta espécie, ao mesmo tempo em que ações de caracterização de populações selvagens são necessárias para que a preservação da espécie em seu habitat natural possa ser assegurada.

#### 4. DETERMINAÇÃO E DIFERENCIAÇÃO SEXUAL

No planeta existem mais de 24.000 espécies de peixes ocupando os mais diversos habitats aquáticos (Nelson, 1994). Esses animais possuem uma grande diversidade de mecanismos de determinação e diferenciação sexual (Guerrero & Moreno, 2010). Tais diversidades, juntamente com a variabilidade de formas sexuais fazem parte do arsenal de estratégias que permitem sua larga distribuição geográfica.

Os peixes teleósteos apresentam grande diversidade de formas sexuais. Existem espécies unissexuais, hermafroditas e gonocóricas (Bond, 1979; Tabata 2000; Piferrer, 2001 e Blázquez & Samoza, 2010).

Em espécies unissexuais a reprodução é realizada por ginogênese, onde o espermatozóide de um macho de uma espécie bissexual contribui somente para a ativação do desenvolvimento do ovo da espécie unissexual, não havendo nenhuma contribuição genética do espermatozóide (Yamazaki, 1983). Uma das grandes vantagens desse sistema é a possibilidade da colonização de novas áreas por um único indivíduo da espécie. Porém, esse sistema também tem sérias desvantagens, decorrentes principalmente das elevadas taxas de endogamia geradas como consequência inerente do processo de retenção das cromátides irmãs para restabelecimento da ploidia adequada (Purdom, 1993).

O hermafroditismo ocorre quando um indivíduo possui gônadas femininas e masculinas concomitantemente ou sucessivamente durante sua vida. O hermafroditismo sincrônico ou simultâneo é representado por espécies nas quais os peixes possuem tecido gonadal masculino e feminino simultaneamente e ambos são funcionais. O hermafroditismo seqüencial protogínico é representado por espécies onde todos os indivíduos são inicialmente fêmeas e depois se tornam machos. Por outro lado, no hermafroditismo seqüencial protandrômico, todos os indivíduos são inicialmente machos (Purdom, 1993; Tabata, 2000 e Guerrero & Moreno, 2010).

Nas espécies gonocóricas, as gônadas indiferenciadas se desenvolvem em testículos ou ovários, não sofrendo nenhum tipo de metamorfose subsequente que ocasione a reversão do sexo após seu desenvolvimento final (Purdom, 1993; Devlin & Nagahama, 2002 e Guerrero & Moreno, 2010). Esta forma pode ser subdividida conforme o processo de desenvolvimento das gônadas primordiais. As espécies gonocóricas diferenciadas têm suas gônadas diretamente distinguidas em testículos ou ovários durante o desenvolvimento

embrionário, ao contrário das gonocóricas indiferenciadas que possuem gônadas inicialmente com tecido ovariano que, no caso dos machos, é posteriormente convertido em tecido testicular. Portanto, possuem inicialmente gônadas intersexuais (Devlin & Nagahama, 2002).

Quanto aos mecanismos de determinação e diferenciação sexual dos peixes, pode-se dizer que são muitos e complexos. Os principais serão detalhados a seguir.

#### **4.1. Determinação do sexo**

Em sua maioria, os peixes teleósteos são gonocóricos e estes possuem dois mecanismos de determinação do sexo: determinação sexual genética (GSD – *Genetic Sex Determination*) e determinação sexual ambiental (ESD – *Environmental Sex Determination*). Na GSD a determinação do sexo ocorre em função da expressão de vários genes, já na ESD a determinação do sexo ocorre durante o desenvolvimento inicial em resposta a diferentes fatores ambientais (Blázquez & Somoza, 2010).

##### **4.1.1 Determinação Genética do Sexo**

Este sistema pode ser operado por um mecanismo de controle poligênico, genes dominantes que atuam simultaneamente podendo ser autossômicos, ou por genes estritamente ligados aos cromossomos sexuais (Bull, 1985 e Devlin & Nagahama, 2002). A GSD pode ser dividida em cromossômica, monogênica ou poligênica.

###### **4.1.1.1 Determinação Cromossômica**

A determinação cromossômica ocorre quando uma espécie de peixe apresenta cromossomos sexuais (Tabata, 2000). Todavia, em peixes teleósteos a diferenciação cromossômica é considerada um fato raro (Devlin & Nagahama, 2002 e Oliveira & Toledo, 2006). Cromossomos sexuais foram observados em apenas 10% dos peixes já cariotipados (Oliveira e Toledo, 2006).

Sete sistemas de determinação sexual cromossômica já foram descritos para os peixes. Espécies com machos heterogaméticos podem apresentar dois cromossomos sexuais

distintos (XY), perda do cromossomo Y (X0), ou sistemas múltiplos (ex:  $X_1X_2Y$  e  $XY_1Y_2$ ). O mesmo pode ser observado nos casos de espécies com fêmeas heterogaméticas (ZW), deleção do cromossomo W: (Z0) ou múltiplos: ( $ZW_1W_2$ ,  $Z_1Z_2W$ ). Por último, uma espécie de peixe chamado platy (*Xiphophorus* sp.) apresentando um sistema com três cromossomos sexuais distintos (WXZ) foi descrita (Devlin & Nagahama, 2002; Oliveira & Toledo, 2006 e Guerrero & Moreno 2010).

Os sistemas XX/X0 e ZZ/Z0 que ocorrem quando o cromossomo Y – no caso dos machos – ou W – no caso das fêmeas – é perdido durante o processo evolutivo (Guerrero e Moreno, 2010), são considerados raros em peixes (Oliveira & Toledo, 2006). Segundo Delbridge e Graves (1999), o Y fica isolado geneticamente, pois ele é permanentemente heterozigoto e assim perde a possibilidade de recombinar. Dessa forma, esse cromossomo pode ser degradado progressivamente como resultado do acúmulo de mutações, deriva genética ou por efeitos carona de genes degradados (com mutações deletérias) associados à genes com mutações favoráveis (Delbridge e Graves, 1999). O mesmo processo pode ocorrer com o cromossomo W em espécies com fêmeas heterogaméticas.

No caso de sistemas com múltiplos cromossomos (como  $X_1X_2Y$ ), o cromossomo Y é anexado por translocação Robertsoniana (causando deleção ou adição cromossomal) ou por fusão a um cromossomo autossômico. Dessa forma, o número de cromossomos entre machos e fêmeas da mesma espécie é diferente. Esse processo também ocorre em sistemas com fêmeas heterogaméticas ( $Z_1Z_2W$ ) (Uyeno & Miller, 1971; Moreira et al., 1985; Bertollo et al., 1997 e Almeida-Toledo et al., 2000). Como exemplos podem ser citados o gobio americano de água doce *Gobionellus shufeldti* (múltiplo cromossomo X, Pezold, 1984) e o canivete *Parodon affinis* (múltiplo cromossomo W, Moreira Filho et al., 1980).

#### **4.1.1.2 Determinação Monogênica e Poligênica**

No sistema de determinação monogênico o sexo é determinado por um único gene que está localizado em um cromossomo autossômico específico (Devlin & Nagahama, 2002). O sistema de determinação sexual poligênico (também chamado de polifatorial) apresenta genes epistáticos determinantes do sexo. Esses genes podem estar tanto em autossomos como cromossomos sexuais (Kallman, 1984 e Piferrer, 2001).

Segundo Gardner (1975), a herança poligênica é um conceito estatístico, pois um gene em conjunção com outro ou vários genes são capazes de controlar uma característica quantitativa. A determinação poligênica é consequência da ação cumulativa ou aditiva dos alelos dos diferentes genes envolvidos, e na qual cada gene envolvido, influenciado ou não pelo ambiente, produz uma pequena parcela do fenótipo final (Bond, 1979). No caso da determinação do sexo poligênico, o sexo do embrião será o resultado da força relativa combinada de fatores masculinos e femininos presentes nos conjunto de cromossomos de cada parental.

#### **4.1.2 Determinação Sexual Ambiental**

Diversos trabalhos relatam a influência do ambiente na determinação sexual em várias espécies de peixes (Strüssman & Nakamura, 2002; Ramalho et al., 2004; Zhang et al., 2008; Blázquez & Somoza, 2009 e Guerrero & Moreno, 2010).

Fatores como a temperatura, pH, densidade populacional e interações sociais podem influenciar a determinação sexual em diferentes espécies de peixes (Guerrero e Moreno, 2010).

##### **4.1.2.1 Temperatura**

Variações de temperatura, sejam artificiais ou naturais, podem afetar a determinação sexual de algumas espécies de peixes (Guerrero & Moreno, 2010). Os processos envolvidos geralmente são desencadeados no início do desenvolvimento embrionário. Esse processo também é conhecido como determinação do sexo dependente da temperatura – *Temperature Sex Determination* - TSD (Baroiller et al., 1999 e Zhang et al., 2008).

Em geral, uma temperatura intermediária resulta em proporções semelhantes de machos e fêmeas nas espécies cuja determinação sexual é termosensível. Existem relatos de casos onde temperaturas elevadas durante o desenvolvimento inicial podem levar a um número maior de machos, como no caso da tilápia *Oreochromis niloticus* (Abucay et al., 1999 e Ramalho et al., 2004).

Segundo Baroiller e colaboradores (1999), grande parte das espécies termosensíveis possui uma proporção maior de machos quando a temperatura é relativamente

elevada, enquanto a quantidade de fêmeas produzidas só é favorecida quando a temperatura é baixa. A *Medina medina* assim como o peixe-rei *Odontesthes bonariensis* são espécies que possuem maior número de machos quando a temperatura da água é maior (Conover, 1984 e Strüssmann et al., 1996). Em temperaturas entre 15 e 19C, a *O. bonariensis* tem maior produção de fêmea, já aos 29C a proporção de macho é maior (Strüssmann et al., 1996 e Strüssmann & Ito, 2005).

Em tilápias o processo de determinação do sexo é bastante variável, não havendo diferenças entre as espécies. Por exemplo, tanto *Oreochromis mossambicus* quanto *O. aureus* e *O. niloticus* possuem maior desenvolvimento de machos quando a temperatura da água é superior à 35 °C (Baras et al., 2000).

#### **4.1.2.2 pH**

Variações do pH da água podem influenciar a determinação do sexo em algumas espécies de peixes, porém a resposta a esse fator não é tão pronunciada como no caso da temperatura. Em algumas espécies altos valores no pH podem acarretar em uma redução na proporção de machos (Guerrero & Moreno, 2010).

#### **4.1.2.3 Fatores sociais**

A densidade populacional pode afetar a determinação e diferenciação sexual em algumas espécies de peixes. Existem relatos desse mecanismo principalmente em espécies hermafroditas, onde alguns indivíduos podem sofrer reversão sexual dependendo da proporção de machos e fêmeas encontrada no cardume (Baroiller et al., 1999 e Guerrero & Moreno, 2010). Nesses casos, sinais comportamentais são emitidos pelos próprios peixes podendo ser interações comportamentais entre os sexos, tamanho relativo da população, proporção sexual e liberação de ferormônios. No entanto, as vias de percepção desses estímulos são desconhecidas (Guerrero & Moreno, 2010). Há autores que acreditam na possibilidade de alguns desses sinais serem captados visualmente (Shapiro, 1981).

## 4.2 Diferenciação sexual

A diferenciação sexual é classificada como um processo fisiológico que leva as gônadas indiferenciadas a se desenvolverem em ovários ou testículos (Blázquez & Somoza, 2010). O processo de diferenciação das gônadas é extremamente variado em diferentes espécies de peixes, o que pode ser considerado uma consequência da amplitude de mecanismos de determinação sexual também encontrados nesse grupo de vertebrados.

Em geral, a cavidade ovariana se forma a partir do alongamento do tecido somático para o desenvolvimento dos lados distal e proximal da parede gonadal durante a embriogênese. Quando há a união desses dois lados ocorre a formação de uma cavidade ovariana entre a parede peritoneal e as gônadas (Nakamura, 1978). Já no sexo masculino é difícil detectar a diferenciação testicular, pois as gônadas sexuais masculinas permanecem inativas durante o desenvolvimento inicial (Baroiller et al., 1999 e Nakamura, 1978).

Em peixes gonocóricos, as gônadas se desenvolvem na parte dorsolateral da cavidade peritoneal, tendo origem na cavidade cortical onde são desenvolvidos os ovários ou na cavidade medular na qual se originam os testículos (Baroiller et al., 1999 e Nakamura et al., 1998). Durante a diferenciação ovariana ocorre o desenvolvimento do córtex e a degeneração da medula, enquanto que na diferenciação testicular o processo é inverso (Nakamura et al., 1998). No entanto, segundo Baroiller e colaboradores (1999), nos ciclóstomos e teleósteos a parte cortical é capaz de se desenvolver tanto em ovários quanto em testículos.

Na diferenciação das gônadas em ovários, a divisão meiótica nuclear das células somáticas, após a proliferação das células germinativas, tem início em uma fase mais inicial do desenvolvimento em relação à diferenciação em testículos. Esse fenômeno é decorrente da proliferação precoce das células germinativas femininas (Baroiller et al., 1999) e pode ser observado em espécies como a tilápia *Oreochromis mossambicus* (Nakamura, 1978), truta arco-íris *Oncorhynchus mykiss* (Lebrum et al., 1982) e o dojô *Misgurnus anguillicaudatus* (Fujimoto et al., 2010).

No caso do peixe-zebra *Brachydanio rerio* (Takahashi, 1977) e do salmão *Oncorhynchus masou* (Nakahama, 1984) todas as gônadas possuem oócitos na fase de diferenciação sexual, o que indica o direcionamento da diferenciação em ovário. No entanto, posteriormente, parte desses oócitos se degeneram e ocorre o desenvolvimento de tecido

testicular. Esse fenômeno é conhecido como hermafroditismo juvenil e essas espécies são consideradas gonocóricas indiferenciadas (Nakamura et al., 1984 e Jakobsen et al., 2009).

A presença de determinados tipos celulares nos tecidos gonadais pode ser transitória. Em paulistinha *Brachydanio rerio* por exemplo, há uma grande quantidade de ovócitos presente nas gônadas em fases iniciais do desenvolvimento, indicando a diferenciação dos ovários. Porém, muitos indivíduos sofrem uma posterior diferenciação em gônadas testiculares (Nakamura 1977) em fases posteriores do desenvolvimento. O mesmo fenômeno foi relatado em barbo tigre *Barbus tetrazona* (Takahashi & Shimizu, 1983). Portanto pode-se afirmar que a maioria das fêmeas teleósteas possuem um aumento no número de células germinativas e em seguida ocorre a meiose. Em machos esse evento é mais tardio (Nakamura et al., 1998).

Diante de tantas formas de diferenciação e determinação sexual, os mecanismos que definem esses fatores são desconhecidos no pirarucu *Arapaima gigas*. No entanto, vários trabalhos já foram desenvolvidos para identificação do sexo desses peixes, mesmo sem o conhecimento dos fatores que determinam e diferenciam o sexo. Carreiro et al. (2011), por meio de exame de laparoscopia e Chu-Koo et al. (2009) por meio de detecção da proteína vitelogenina (Vtg) e mensuração dos níveis de esteróides sexuais ( $17\beta$ -estradiol e 11-Cetotestosterona), são exemplos de trabalhos recentes que buscam a identificação do sexo em pirarucu.

## 5. MARCADORES MOLECULARES

Em meados do século XX, a genética molecular vem adquirindo espaço no ramo científico. Os primeiros relatos sobre marcadores genéticos eram baseados na morfologia, segundo as leis básicas de herança mendeliana. Porém, os marcadores morfológicos não são eficientes para pesquisas de melhoramento, pois nem sempre são passíveis de identificação e restringem sua utilização a somente algumas espécies de vegetais. Além disso, possuem pouco polimorfismo e podem ser mascarados por efeitos ambientais, ao contrário dos marcadores moleculares que são considerados neutros, fazendo com que as alterações fenotípicas sejam nulas ou irrelevantes (Ferreira & Grattapaglia, 1995).

Com os avanços biotecnológicos, os marcadores moleculares tornaram-se de grande importância para estudos de populações, podendo revelar parâmetros genéticos fundamentais para o melhoramento e a conservação de espécies, auxiliar no manejo reprodutivo, entre outras finalidades. Para tais estudos, o emprego de marcadores moleculares é essencial na determinação da variabilidade genética entre e dentro das populações, raças, espécies ou outros grupos taxonômicos (Telles et al., 2001).

Os marcadores moleculares podem ser classificados em dois grupos conforme a metodologia utilizada para identificá-los, podendo ser (1) por hibridização com sondas de sequência conhecida ou (2) por amplificação do DNA com posterior leitura em géis. Entre os identificados por hibridização, estão os marcadores RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism* – Polimorfismo no comprimento de fragmentos de restrição; (Bostein et al., 1980) e minissatélites ou VNTRs (*Variable Number of Tandem Repeats*; Jeffreys et al., 1985). Os marcadores revelados por meio de amplificação de DNA são RAPD (*Random Amplified Polymorphic* – Polimorfismo de DNA amplificado ao acaso; Willians et al., 1990), SCAR (*Sequence Characterized Amplified Regions* – Região Amplificada de Sequência Caracterizada; Paran & Michelmore, 1993), microsatélites ou SSR (*Simple Sequence Repeats*; Litt & Luty, 1989), AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism* – Polimorfismo no comprimento de fragmentos de amplificação; Vos et al., 1995) e DNA mitocondrial (Avise et al., 1979 e Brown et al., 1979).

Dentre os marcadores baseados na técnica de PCR – Reação em Cadeia da Polimerase (Mullis & Fallona, 1987), ou seja, que precisam da amplificação de parte do DNA, o RAPD tem sido uma das opções para se obter informações genéticas específicas em

genomas desconhecidos. A opção por essa técnica baseia-se na sua facilidade de execução e aplicabilidade para qualquer organismo, além da amplitude do genoma que ele é capaz de amplificar. Entretanto, seu caráter dominante, pois fornece dados qualitativos por apresentar polimorfismo binário, ou seja, presença (homozigoto dominante e heterozigoto) ou ausência (homozigoto recessivo) de banda, e a baixa repetibilidade obtida com este marcador constituem-se em dificuldades reais (Telles et al., 2001; Ferreira & Grattapaglia, 1995).

As características inerentes ao marcador RAPD, responsáveis por sua predileção em determinadas frentes de pesquisa, são: a possibilidade de detectar uma variação sem o conhecimento prévio da sequência, utilização de apenas um *primer*, necessidade de pequena quantidade de DNA e baixo custo (Lacerda et al., 2002).

Além de apresentar grandes vantagens, a técnica RAPD pode ser otimizada quando associada à BSA – *Bulk Segregat Analysis*, em português, Análise de Segregantes Agrupados (Michelmore et al., 1991). Essa técnica resume-se em comparar duas amostras de DNA obtidas a partir do agrupamento do ácido nucleico de indivíduos com características segregantes a fim de identificar um marcador molecular capaz de distingui-los. Esses agrupamentos devem conter quantidades iguais de DNA dos indivíduos portadores das características segregantes. Marcadores polimórficos entre os agrupados podem estar geneticamente ligados ao loco determinante de dada característica (Michelmore et al., 1991). Portanto, a técnica BSA aumenta ainda mais a capacidade de ligação dos marcadores RAPD a genes específicos ou regiões monomórficas para marcadores previamente caracterizados (Michelmore et al., 1991). Outra característica importante da BSA é a possibilidade de proporcionar economia de reagentes e tempo, pois todos os indivíduos utilizados no estudo são agrupados em apenas duas amostras de DNA (Brunelli et al., 2002).

A associação dessas duas técnicas foi extensamente utilizada para identificação e isolamento de marcadores moleculares associados à uma característica de interesse. Em vegetais, o uso dessa metodologia foi utilizada em milho (Brunelli et al., 2002), aspargo (Gebler et al., 2007), eucalipto (Zamprogno et al., 2008), algas (Martinez et al., 1999), entre outros. Devido a fácil aplicabilidade e bons resultados, essa técnica passou a ser aplicada em vertebrados.

Existem vários relatos na literatura que comprovam a utilidade desta técnica para determinação de marcadores ligados às características segregantes, (Iturra et al., 1998; Kovács et al., 2001; Keyvanshokoo et al., 2007; Zamprogno et al., 2008), incluindo de

marcadores sexo específico, tanto em espécies vegetais (Brunelli et al., 2002; Gleber et al., 2007) quanto em animais (Iturra et al., 1998 e Kovács et al., 2001).

Em truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*), a metodologia RAPD-BSA foi utilizada para prospecção de um marcador sexo-específico. De 900 primers RAPD testados, dois (OPA11 e OPP09) foram polimórficos tanto entre os agrupamentos de macho e fêmeas, quanto entre os indivíduos distintos sexualmente. Como consequência, esses marcadores RAPD foram convertidos em sequência caracterizada de região amplificada (SCAR) para serem utilizados como marcadores genéticos e, por meio de PCR, possibilitar a distinção direta entre indivíduos machos de fêmeas (Iturra et al., 1998). Metodologia semelhante foi usada para espécie de bagre africano (*Claria gariepinus*), neste estudo dois primers RAPD (OPO01 e OPM08) mostraram polimorfismo ligado ao sexo, tanto para o agrupamento, quanto para cada indivíduo separadamente. Com isso, os autores geraram dois marcadores sexo-específico para a espécie CGAY1 e CGAY2 (Kovács et al., 2001).

Em esturção beluga (*Huso huso*) a mesma metodologia RAPD-BSA foi utilizada com o objetivo de identificar marcadores moleculares para distinguir macho de fêmea com o intuito de separar as fêmeas para produção de caviar. No entanto, devido a complexidade e não conhecimento de fatores determinantes do sexo, que é bastante variável em peixes, não foi possível detectar nenhum polimorfismo entre os sexos (Keyvanshokoo et al., 2007).

De acordo com o exposto acima, pode-se concluir que a associação das técnicas RAPD com BSA torna a prospecção de um marcador sexo-específico viável. No entanto, vale ressaltar que a determinação sexual em peixe é bastante variável, bem como as formas de diferenciação sexual, tornando a distinção sexual por esta abordagem possível caso a determinação sexual da espécie em questão seja genética.

Em estudos de estrutura genética populacional, o marcador comumente utilizado é o DNA mitocondrial (mtDNA). A descoberta da utilidade do mtDNA como marcador molecular ocorreu no final da década de 70 (Avisé et al., 1979 e Brown et al., 1979), gerando grande impacto em estudos sobre genética de populações e evolução. O mtDNA é uma molécula pequena e circular, fechada covalentemente e seu tamanho varia de 14 a 26 Kb (Billington & Hebert, 1991). Essa molécula possui um conteúdo gênico amplamente conservado, sendo 13 genes codificantes de proteína, 2 genes que codificam RNAs ribossômicos (rRNAs) e 22 que codificam RNAs transportadores (tRNAs) (Hrbek et al., 2007).

O mtDNA possui também uma região não codificante com aproximadamente 1 Kb e rica em sequências adenina (A) / timina (T), nomeada de região controle ou D-loop. Apesar dessa sua característica, é uma região importante, pois contém a origem da replicação da cadeia pesada e promotores de transcrição das cadeias leve e pesada (Clayton, 1982).

Comparado ao DNA nuclear (nDNA), o mtDNA possui uma taxa de substituição de nucleotídeos de cinco a dez vezes maior (Brown et al., 1979 e Harrison, 1989). Isso ocorre devido a menor eficiência dos mecanismos de reparo para corrigir as mutações que ocorrem durante a replicação, ao relaxamento da restrição de função ou seleção e a grande exposição da molécula a danos oxidativos da cadeia respiratória mitocondrial (Mendonça, 2010). Em sua maioria, as mutações observadas no mtDNA são causadas por essa substituição de bases. Tais substituições podem ser classificadas em transição, na qual há troca de uma pirimidina por outra pirimidina ou purina por purina, e transversão, na qual há troca de pirimidina por purina. Além deste tipo de mutação há também as adições e deleções de nucleotídeos (Broughton & Dowling, 1994). Portanto, devido a vulnerabilidade do mtDNA a mutações, este se tornou um marcador molecular amplamente utilizado para análises de variação genética inter e intra populacional.

A variabilidade genética é extremamente importante para uma espécie manter sua vitalidade reprodutiva, resistência a doenças e capacidade de se adaptar a mudanças ambientais. Assim sendo, estudos filogenéticos podem contribuir para a conservação de espécies em risco (Primack & Rodrigues, 2001). O uso de mtDNA para análise filogenética, variabilidade genética e estrutura populacional já foi reportado em vários trabalhos, como exemplo pode-se citar um estudo que foi realizado na Malásia, na qual foi estudada diversidade genética em um tipo de carpa *Tor tambroides* (Esa et al., 2007), outro sobre a variabilidade genética da região controle do mtDNA na sardinha *Scomber scombrus* (Souza et al., 2006), estudo de análise da variação genética do citocromo b em três populações de carapau chileno *Trachurus murphyi* (Zhang et al., 2008 b) e um estudo sobre a filogeografia das raias *Paratrygon aiereba* na região Amazônica (Marques, 2006).

Além de estudos filogeográficos, o mtDNA permite outras aplicações, como investigações forenses. Recentemente, um estudo com barcode na região citocromo oxidase do mtDNA, referente a identificação de espécie, foi realizado para comprovar fraudes na comercialização de peixes. Por meio desta identificação por DNA barcode, Carvalho e colaboradores (2011) provaram que 80% dos peixes comercializados como bagre Surubim

*Pseudoplatystoma corruscans*, coletadas em seis mercados diferentes em Belo Horizonte, eram na verdade peixes de baixo valor comercial ou marinhos.

Hrbeck e colaboradores (2005) conduziram o primeiro estudo populacional com pirarucu utilizando uma amostragem de 120 indivíduos de oito regiões diferentes entre rios da Bacia Amazônica e do rio Tocantins. Foi observado que houve uma maior diversidade haplotípica, ou seja, maior variabilidade genética, em áreas longínquas aos grandes centros da Amazônia. Os autores acreditam que esta diferença é devido, provavelmente, a menor exploração da espécie longe dos grandes centros, permitindo a manutenção da diversidade da espécie.

Um trabalho semelhante foi feito por Leão (2009), no qual foi comprovado que no rio Araguaia a variabilidade genética do pirarucu é baixa. Acredita-se que tal feito pode ser decorrente do efeito de povoamento, ou seja, aumento da população com conseqüente sobrepesca. Além disso, o autor também comprovou que há maior variabilidade genética nos rios da calha principal da Bacia Amazônica quando comparado aos rios tributários decorrente do menor número populacional por estarem afastados dos grandes centros urbanos.

O DNA mitocondrial de pirarucu, seqüenciado por Hrbek e colaboradores (2008), possui um total de 16.433 pares de bases, contendo 13 genes codificantes de proteína – dentre os quais 12 estão localizados na cadeia pesada do mtDNA, dois genes RNA ribossômico e 22 genes RNA transportador.

Apesar dessas inúmeras pesquisas com espécies de peixes, há ainda uma escassez de estudos populacionais referente ao *Arapaima gigas*. Portanto, faz-se necessário ampliar os conhecimentos genéticos sobre o pirarucu. Frente ao grande potencial econômico e características desta espécie, estudos baseados nas metodologias citadas podem fornecer informações que possibilitem não somente avanços nos sistemas de manejo e criação, como também estratégias de conservação dessa importante espécie.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABUCAY, J. S., MAIR, G. C., SKIBINSKI, D. O. F., BEARDMORE, J. A. (1999). Environmental sex determination: the effect of temperature and salinity on sex ratio in *Oreochromis niloticus* L. **Aquaculture**, v. 173, p. 219 – 234.
- ALMEIDA-TOLEDO, L. F., FORESTI, F., DANIEL, M.F., TOLEDO-FILHO, S.A. (2000). Sex chromosome evolution in fish: the formation of the neo-Y chromosome in Eigenmannia (Gymnotiformes). **Chromosoma**, v. 109(3), p.197–200.
- ARANTES, C. C., CASTELLO, L., GARCEZ, D. S. (2007). Variações entre contagens de *Arapaima gigas* (Schinz) (Osteoglossomorpha, Osteoglossidae) feitas por pescadores individualmente em Mamirauá, Brasil. **PANAMJAS – Pan-American Journal of Aquatic Sciences**, v. 2 (3), p. 263-269.
- ARANTES, C. C. (2009). **Ecologia do pirarucu *Arapaima gigas* (Schinz, 1822) na várzea da Reserva de Desenvolvimento Sustentável Mamirauá, Amazonas, Brasil**. Dissertação de mestrado. Universidade Estadual de Santa Cruz. Ilhéus – BA.
- AVISE, J. C., GIBLIN-DAVIDSON, C., LAERM, J., PATTON, J. C., LANSMAN, R. A. (1979). Mitochondrial DNA clones and matriarchal phylogeny within and among geographic populations of the pocket gopher, *Geomys pinetis*. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 76, p. 6694 – 6698.
- BARAS, E., MALBROUCK, C., HOUBART, M., KESTEMONT, P., MÉLARD, C. (2000). The effect of PIT tags on growth and physiology of age-0 cultured Eurasian perch *Perca fluviatilis* of variable size. **Aquaculture**, v. 185, p. 159 – 173.
- BAROILLER, J. F., GUIGUEN, Y., FOSTIER, A. (1999). Endocrine and environmental aspects of sex differentiation in fish. **CMLS Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 55, p. 910 – 931.
- BELLO, N., SÁNCHEZ, A. (1999). The identification of a sex-specific DNA marker in the ostrich using a random amplified polymorphic DNA (RAPD) assay. **Molecular Ecology**, v. 8 (4), p. 667 – 669.
- BERTOLLO, L.A.C., FONTES, M.S., FENOCCHIO, A.S., CANO, J. (1997). The X1X2Y sex chromosomes system in the fish *Hoplias malabaricus* I. G-, C and chromosome replication banding. **Chromosome Res** 5:493–499.
- BILLINGTON, N., HERBET, P. (1991). Mitochondrial DNA diversity in fishes and its implications for introductions. **Canada of Journal Fish and Aquatic Sciences**. 48: 80-94.
- BLÁZQUEZ, M., SAMOZA, G. M. (2010). Fish with thermolabile sex determination (TSD) as models to study brain sex differentiation. **General and Comparative Endocrinology**, v. 166, p. 470-477.
- BOND, C. E. (1979). **Biology of Fishes**, 2 edition, Saunders College Publishing.

- BOSTEIN, D., WHITE, R. L., SKOLNICK, M., DAVIS, R. W. (1980). Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. **American Journal Human Genetic**, v. 32, p. 314 – 331.
- BROWNGHTON, R.E., DOWLING, T.E. (1994). Length variation and mitochondrial DNA of the minnow *Cyprinella spilopleura*. **Genetics**. 138: 179-190.
- BROWN, W. M., GEORGE JUNIOR, M., WILSON, A. C. (1979) Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 76, p. 1967 – 1971.
- BRUNELLI, K.R., SILVA, H. P., CAMARGO, L. E. A. (2002). Mapeamento de genes de resistência quantitativa a *Puccinia polysora* em milho. **Fitopatologia Brasileira**, v. 27, p. 134 – 140.
- BULL, J. J. (1985). Sex determining mechanisms: an evolutionary perspective. **Experientia**, v. 41, p. 1285-1296.
- CASTELLO, L. (2004). Method to Count Pirarucu *Arapaima gigas*: Fishers, Assessment, and Management. **North American Journal of Fisheries Management**. v.24, p.379–389.
- CASTELLO, L., STEWART, D. J. (2010). Assessing CITES non-detriment finding procedures for Arapaima in Brasil. **Journal of Applied Ichthyology**, v. 26(1), p.49 – 56.
- CAVERO, B. A. S., ROUBACH, R., PEREIRA FILHO, M., ITUASSU, D. R., GANDRA, A. L., CRESCÊNCIO, R. (2002). Potential for Cage culture of pirarucu (*Arapaima gigas*) in the Amazon Region. **Global Aquaculture Advocate**, v. 5 (5), p. 56 – 60.
- CHU-KOO, F.; DUGUÉ, R.; AGUILAR, M. A.; DAZA, A. C.; BOCANEGRA, F. A.; VEINTEMILLA, C. C.; DUPONCHELLE, F.; RENNO, J. F.; TELLO, S.; NUÑEZ, J. (2009) Gender determination in the Paiche or Pirarucu (*Arapaima gigas*) using plasma vitellogenin, 17beta-estradiol, and 11-ketotestosterone levels. **Fish Physiol Biochem** 35: 125-136.
- CLAYTON, D. A. (1982) Replication of animal mitochondrial DNA. **Cell** 28:693-705.
- CONOVER, D. O. (1984). Adaptive significance of temperature dependant sex determination in a fish. **Am. Nature.**, v. 123, p. 297 – 313.
- CRESCÊNCIO, R. (2001). **Treinamento alimentar de alevinos de pirarucu, *Arapaima gigas* (Cuvier, 1929), utilizando atrativos alimentares**. Dissertação de Mestrado, INPAUFAM, Manaus, Amazonas. 35pp.
- De GELDER, L., POLACIANO, J. M., JOYCE, P., TOP, E. M. (2007). Stability of a promiscuous plasmid in different hosts: no guarantee for a long-term relationship. **Microbiology**, v. 153, p. 452 – 463.

DELBRIDGE, M. L., GRAVES, J. A. M. (1999). Mammalian Y chromosome evolution and the male-specific functions of Y chromosome-borne genes. **Reviews of Reproduction**, v. 4, p. 101 – 109.

DEVLIN R.H.; NAGAHAMA, Y. (2002). Sex determination and sex differentiation in fish: an overview of genetics, physiological and environmental influences. **Aquaculture** 208, 191 - 364.

EIZIRIK, E. (1996). Ecologia Molecular, genética da conservação e conceito de Unidades Evolutivamente Significativa.

ESA, Y. B., SIRAJ, S. S., DAUD, S. K., RAHIM, K. A. A., JAPNING, J. R. R., TAN, S. G. (2007). Mitochondrial DNA diversity of *Tor tambroides valenciennes* (Cyprinidae) from five natural populations in Malaysia. **Zoological Studies**, v. 47 (3), p. 360 – 367.

FERGUSON, A., TAGGART, J.B., PRODHOL, A., McMELL, O., THOMPSON, C., STONE, C., MCGINNITY, P., HYNES, R.A. (1995). The application of molecular markers to the study and conservation of fish population with special reference to *Salmo*. **J Fish Biol**, v.47, suppl.A, p.103-126.

FERREIRA, M. E. ; GRATTAPAGLIA, D. (1995). **Introdução Ao Uso de Marcadores RAPD e RFLP Em Análise Genética**. EMBRAPA-CENARGEM, Documento 20, 1 ed. Brasília: Lumma, v. 1., p. 221.

FRANKHAM, R., BALLOU, D., BRISCOE, D. A. (2004). **Introduction to conservation genetics**. Cambridge University Press. Ed. 4.

FREderico, R. G. (2006). **Filogeografia e conservação de *Paratrygon aiereba* Dumail (Chondrichthyes: Polamotry gonidae) na região Amazônica**. Dissertação de mestrado. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – Universidade Federal do Amazonas.

FUJIMOTO, T., NISHIMURA, T., GOTO-KAZETO, R., KAWAKAMI, Y., YAMAHA, E., ARAI, KATSUTOSHI (2010). **Sexual dimorphism of gonadal structure and gene expression in germ cell-deficient loach, a teleost fish**. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, v. 107 (40).

GARDNER, E. J. (1975). **Genética**, 5 edição, Editora Interamericana, Rio de Janeiro.

GEBLER, P. WOLKO, L., KNAFLEWSKI, M. (2007). Identification of molecular markers for selection of supermale (YY) asparagus plants. **Journal Applied Genetic**, v. 48 (2), p. 129 – 131.

GUERRERO, S. E. e MORENO, N. M. (2010) Sexual determination and differentiation in teleost fish. **Rev Fish Biology Fisheries** , v. 20, p. 101-121.

Harrison GR (1989) Animal mitochondrial DNA as a genetic marker in population and evolutionary biology. **Trends Ecol Evol** 1989; 4:6-11.

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

HRBEK, T., FARIAS, I. P. (2008). The complete mitochondrial genome of the pirarucu (*Arapaima gigas*, Arapaimidae, Osteoglossiformes). **Genetics and Molecular Biology**, v. 31, p. 293 – 302.

IBAMA (2007). **Estatística da pesca 2007**. Brasil: grandes regiões e unidades da federação. Ministério do Meio Ambiente. Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. Dezembro, Brasília.

IMBIRIBA, E.P. (2001). Potencial de criação de pirarucu, *Arapaima gigas*, em cativeiro. **Acta Amazônica**. Vol. 31 (2), p. 299 – 316.

ITURRA, P.; MEDRANO, J.F.; BAGLEY, M.; LAM, N.; VERGARA, N.; MARIN, J.C. (1998). Identification of sex chromosome molecular markers using RAPDs and fluorescent in situ hybridization in rainbow trout. **Genetic**. Vol. 101, p. 209 – 213.

JAKOBSEN, T., FOGARTY, M. J., MEGREY, B. A., MOKSNESS, E. (2009). **Fish reproductive biology: implications for assessment and management**. Wiley-blackwell, USA.

JEFFREYS, A. J., WILSON, V., THEIN, S. L. (1985). Hipervariable ‘minisatellite’ regions in human DNA. **Nature**, v. 314, p. 67 – 73.

KALLMAN, K.D., (1984). A new look at the sex determination in Poeciliid fishes, p. 95 – 171 in **Evolutionary Genetics of Fishes**, edited by B.J. Turner. Plenum Press, New York.

KEYVANSHOKOOH, S., POURKAZEMI, M., KALBASI, M. R. (2007). The RAPD technique failed to identify sex-specific sequences in beluga (*Huso huso*). **Journal of Applied Ichthyology**, v. 23, p. 1 – 2.

KOVACS, B.; EGEDI, S.; BARFAI, R.; ORBAN, L. (2001). Male-specific DNA markers from African catfish (*Clarias gariepinus*). **Genetica**, 110, p. 267-276.

LACERDA, D. R., ACEDO, M. D. P., FILHO, J. P. L., LOVATO, M. B.. **A técnica RAPD: uma ferramenta molecular em estudos de conservação de plantas**. Universidade Federal de Minas Gerais, 2002.

LAVOUÉ, S. e SULLIVAN, J. P. Simultaneous analysis of Five molecular markers provides a well-supported phylogenetic hypothesis for the living bony-tongue fishes (Osteoglossomorpha: Teleostei). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, 33: 171-185, 2004.

LEÃO, A. S. A. (2009). **Análise da variabilidade genética das populações de pirarucu (*Arapaima gigas*, SCHINZ 1822) dos principais tributários do rio Amazonas através do uso de marcadores microssatélites**. Dissertação de mestrado. Instituto Nacional de

Pesquisas da Amazônia – Universidade Federal do Amazonas – Programa de pós-graduação em biologia tropical e recursos naturais.

LEBRUN, C., BILLARD, R., JALABERT, B. (1982). Changes in the number of germ cells in the gonads of the rainbow trout (*Salmo gairdneri*) during the first 10 post-hatching weeks. **Reprod. Nutr. Dev.**, v. 22, p. 405 – 412.

LIMA, M. P. (2009). **Análise da expressão gênica diferencial na hipófise de Pirarucu (*Arapaima gigas*) em fase reprodutiva e não reprodutiva.** Tese de mestrado. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA. Programa de Pós-graduação em genética, conservação e biologia evolutiva.

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, n.3, p.397-401.

LOPES, K.; QUEIROZ, H. L. (2009). Uma revisão das fases de desenvolvimento gonadal de pirarucu *Arapaima gigas* (Schinz, 1922) por meio da análise macroscópica como uma proposta para unificação destes conceitos e sua aplicação prática nas reservas Mamirauá e Amanã. **UAKARI**, v. 5, n. 1, p. 39-48.

MARQUES, D. K., VENERE, P. C. e JUNIOR, P. M. G. (2006). Chromosomal characterization of the bonytongue *Arapaima gigas* (Osteoglossiformes: Arapaimidae), **Sociedade Brasileira de Ictiologia.**

MARQUES, D. K. S. (2006). **Caracterização genética do pirarucu *Arapaima gigas* (Cuvier) (Teleostei, Osteoglossidae) da bacia Tocantins-Araguaia, Estado do Mato Grosso.** Tese de doutorado. Universidade Federal de São Carlos – Centro de Ciências Biológicas e da Saúde Programa de pós-graduação em Genética e Evolução.

MARTINEZ, E. A.; DESTOMBE, C.; QUILLET, M. C.; VALERO, M. (1999). Identification of random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers highly linked to sex determination in the red alga *Gracilaria gracilis*. **Molecular Ecology** 8: 1533-1538.

MENDONÇA, F. F. (2010). **Filogeografia do gênero *Rhizoprionodon* (Elasmobranchii, Carcharhiniformes) no Atlântico Ocidental utilizando marcadores moleculares do DNA mitocondrial.** Tese de doutorado. Universidade Estadual Paulista – Instituto de Biociências de Botucatu.

MICHELMORE, R.W., PARAN, I., KESSELI, R.V. (1991). Identification of markers linked to disease-resistance genes by bulked segregant analysis: A rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating populations. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 88, p. 9828-9832.

MONTEIRO, L.B.B.; SOARES, M.C.F.; CATANHO, M.T.J.; HONCZARYK, A. (2010). Aspectos reprodutivos e perfil hormonal dos esteróides sexuais do pirarucu, *Arapaima gigas* (Schinz, 1822), em condições de cativeiro. **Acta Amazônica**, v. 40 (3), p. 435 – 450.

- MOREIRA, O., BERTOLLO, L.A.C., GALETTI Jr., P.M. (1985). Karyotypic study of some species of family Parodontidae (Pisces–Cypriniformes). **Caryologia** 38, 47–55.
- MOREIRA FILHO, O., BERTOLLO, L. A. C., GALETTI JUNIOR, P. M. (1980). Evidences for a multiple sex chromosome Pisces, Parodontidae). **Caryologia**, v. 33, p. 83 – 91.
- MULLIS, K., FALOONA, F. (1987). Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase catalyzed chain reaction. **Methods in Enzymology**, v. 155, p. 335-350.
- NAGAHAMA, Y. (1984). Mechanism of gonadotropic control of steroidogenesis in the teleost ovarian follicle. **Gnma Symp. Endocrinol.**, v. 21, p. 167 – 182.
- NAKAMURA, M. (1978). **Morphological an experimental studies on sex differentiation of the gonad of several teleost fishes**. Ph.D. thesis Fac. Fish., Hokkaido University.
- NAKAMURA, M., KOBAYASHI, T., CHANG, X. T., NAGAHAMA, Y. (1998). Gonadal sex differentiation in teleost fish. **The Journal of Experimental Zoology**, v. 281, p. 362 – 372.
- NAKAMURA, A. (1997). Ultrasonic biotelemetry system. **Mar. Sci.**, v. 9 (12), p. 14 – 19.
- NELSON, J. S. (1994). **Fishes of the World**, 3rd edition. John Wiley and Sons, Inc. New York, NY, USA.
- OLIVEIRA, C., TOLEDO, L. F. A. (2006) Evidence of na XX/XY sex chromosome system in the fish *Dormitator maculatus* (Teleostei, Eleotrididae). **Genetics and Molecular Biology**, v. 29 (4), p. 653 – 655.
- ONO, E. A., HALVERSON, M. R., KUBITZA, F. (2004). Pirarucu, o gigante esquecido. **Panorama da Aqüicultura**, v. 14(81), p. 14-25.
- PARAN, I.; MICHELMORE, R.W. (1993). Development of reliable PCR-based markers linked to downy mildew resistance genes in lettuce. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlim, v.85, p.985-993.
- PARKER, P.G., ALLISON, A., SNOW, A.A., SCHUG, M.D., GREGORY, C., BOOTON, G.C., FUERST, P.A. (1998). What molecules can tell us about populations: choosing and using a molecular marker. **Ecology**, v.79, p. 361–382.
- PEREIRA FILHO, M., CAVERO, B. A. S., ROUBACH, R., ITUASSÚ, D. R., GANDRA, A. L., CRESCÊNCIO, R. (2003). Cultivo do pirarucu (*Arapaima gigas*) em viveiro escavado. **Acta. Amazônica**, v. 33 (4), p. 715 – 718.
- PEZOLD, F. (1984). Evidence for multiple sex chromosomes in the freshwater goby, *Gobionellus shufeldti* (Pisces, Gobiidae). **Copeia**, p. 235 – 238.
- PIFERRER, E. (2001). Endocrine sex control strategies for the feminization of teleost fish. **Aquaculture** v. 197, p. 229-281.

- PORTO, J. I. R., FELDBERG, E., NAKAYAMA, C. M., FALCÃO, J. N. (1992). A checklist of chromosome numbers and karyotypes of Amazonian freshwater fishes. **Rev. Hydrobiol. Trop.**, v. 25(4), p. 287 – 299.
- PRIMACK, R.B. & RODRIGUES, E. (2001). **Biologia da Conservação**. Londrina, E. Rodrigues, p. 328.
- PURDOM, C. E. (1993). **Genetics and fish breeding**. Chapman & Hall.
- QUEIROZ, H. L., CRAMPTON, W. G. R. (1999). **Estratégias para o manejo de recursos pesqueiros de Mamirauá**. In QUEIROZ, H.K.; CRAMPTON, W.G.R. Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico. Sociedade Civil de Mairimurá. Tefe, Brasil, p. 108-141.
- RAMALHO, M. A. P., SANTOS, J. B., PINTO, C. A. B. P. (2004). **Genética na agropecuária**, 3 edição. Editora UFPA – Universidade Federal de Lavras.
- SALVO-SOUZA, R. H.; VAL, A. L. O gigante das águas doce. **Ciência Hoje**, v. 11, n. 64, p. 9-12.
- SCORVO FILHO, J. D., ROGAS, N. E. T., SILVA, C. M., KONOIKE, T. (2004). Criação de *Arapaima gigas* (Teleostei osteoglossidae) em estufa e sistema fechado de circulação de água, no estado de São Paulo. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 30 (2), p. 161 – 170.
- SHAPIRO, D. (1981). Size, maturation and the social control of sex reversal in the coral reef fish *Anthias squamipinnis*. **J. Zool**, v. 193, p. 105 – 128.
- SOARES, M. C. F. e NORONHA, E. A. P. (2007). **Pirarucu, *Arapaima gigas*: Uma revisão bibliográfica visando à aqüicultura sustentável**. Universidade Federal Rural de Pernambuco, 1 Congresso Brasileiro de Produção de Peixes Nativos de Água Doce.
- SOARES, J. M., BELETTI, M. E., SANTOS, A. L. Q. (2006). **Estudo ultra-estrutural da bexiga natatória de pirarucu (*Arapaima gigas*)**. Universidade Federal de Uberlândia – Centro de Ciências Biomédicas.
- SOUZA, J. L., SÉVIGNY, J. M. CHANUT, J. P., BARRY, W. F., GRÉGOIRE, F. (2006). High genetic variability in the mtDNA control region of a Northwestern Atlantic teleost, *Scomber scombrus* L.. **Canadian Technical Report of Fisheries and Aquatic Sciences**, 2625.
- STRUSSMANN, C. A., NAKAMURA, M. (2002). Morphology, endocrinology, and environmental modulation of gonadal sex differentiation in teleost fishes. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 26, p. 13 – 29.
- STRUSSMANN, C. A., TAKASHIIMA, F., TODA, K., (1996). Sex differentiation and hormonal feminization in pejerrey *Odontesthes bonariensis*. **Qausculture**, v. 139, p. 31 – 45.

STRUSSMANN, C. A., ITO, L. S. (2005). Where does gonadal sex differentiation begin? Gradient of histological sex differentiation in the gonads of pejerrey, *Odontesthes bonariensis* (Pisces, Atherinidae). **J. Morphol.**, v. 265, p. 190 – 196.

TABATA, Y. A. (2000). Atualização sobre métodos e procedimentos para obtenção de populações monossexo de peixes: Produção de Fêmeas. **Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios**. São Paulo.

TAKAHASHI, T. (1977). Effects of large doses of methyltestosterone on the development of reproductive organs of juvenile guppy, *Poecilia reticulata*. **Bull. Fac. Fish.**, Hokkaido University, v. 28, p. 6-19.

TAKAHASHI, H., SHIMIZU, M. (1983). Juvenile intersexuality in a cyprinid fish, the Sumatra barb, *Barbus tetrazona tetrazona*. **Bull. Fac. Fish** Hokkaido University, v. 34, p. 69 – 78.

TELLES, M. P. C., MONTEIRO, M. S. R., RODRIGUES, F. M., SOARES, T. N., RESENDE, L. V., AMARAL, A. G., MARRA, P. R. (2001). Marcadores RAPD na análise da divergência genética entre raças de bovinos e número de locos necessários para a estabilidade da divergência estimada. **Ciência Animal Brasileira**, p. 87-95.

VAL, A. L.; HONCZARYK, A. (1995). **Criando Peixes na Amazônia**. Manaus: MCT/INPA, p.160.

VENTURIERI, R., BERNARDINO, G. (1999). Pirarucu, espécie ameaçada pode ser salva através de cultivo. **Revista Panorama da Aquicultura**, v. 9(1), p. 13-21.

VOS, P.; HOGERS, R.; BLEEKER, M.; REIJANS, M.; LEE, T. V.; HORNES, M.; FRIJTERS, A.; POT, J.; PELEMAN, J.; KUIPER, M.; ZABEAU, M. (1995). AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. **Nucleic Acids Research**, v. 33, n. 21.

WILLIAMS, J.G.K., KUBELIK, A.R., LIVAK, K.J., RAFALSKI, J.A., TINGEY, S.V. (1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Res**, v.18, p. 6531-6535.

YAMAZAKI, F. (1983). Sex control and manipulation in fish. **Aquaculture**, v. 33, p. 329 – 354.

ZAMPROGNO, K. C., FURTADO, E. L., MARINO, C. L. BONINE, C. A. V., DIAS, D. C. (2008). Utilização de análise de segregantes agrupados na identificação de marcadores ligados a genes que controlam resistência à ferrugem (*Puccinia psidii*) em Eucalyptus spp. **Summa Phytopathologica**, v. 34, p. 253 – 255.

ZHANG, Q., SUN, X., QI, J., WANG, Z., WANG, X., WANG, X., ZHAI, T. (2008). Sex determination mechanisms in fish. **Journal of Ocean University of China**, v. 8 (2), p. 155-160.

ZHANG, M., XU, Y-J., WANG, C-H. (2008 - b). **Genetic variation on mtDNA Cytb sequene of three populations of Chilean jack mackerel, *Trachurus murphyi* from the Southern Pacific.** Chilean Jack Mackerel Workshop.

**CAPÍTULO 2 - Varredura do genoma do Pirarucu (*Arapaima gigas*) para prospecção de marcadores moleculares sexo-específicos**

## RESUMO

O Pirarucu (*Arapaima gigas*) é um dos maiores peixes da Bacia Amazônica, podendo atingir até três metros de comprimento e 200Kg de peso, e apresenta características muito interessantes para o desenvolvimento da piscicultura da espécie: grande rusticidade, elevada taxa de crescimento, elevado rendimento da carcaça, carne desprovida de espinhos e com ótimas qualidades organolépticas. A sexagem do pirarucu só pode ser realizada tardiamente, no período de maturidade sexual, entre três e quatro anos de idade, com base nos hábitos comportamentais e coloração dos animais, ou por ultrassonografia ou métodos cirúrgicos (laparoscopia), os quais são efetivamente inviáveis para uso comercial devido sua alta complexidade e alto risco de execução. O objetivo desse trabalho foi realizar uma varredura do genoma desta espécie utilizando a metodologia BSA (*Bulk Segregant Analysis*) associada a marcadores RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) a fim de prospectar sequências sexo-específicas que permitam o desenvolvimento de uma metodologia de identificação do sexo que possa ser utilizada para sexagem de peixes pré-púberes. Amostras de DNA de machos e fêmeas de pirarucu foram combinadas para formar agrupados sexo-específicos, os quais foram avaliados com um total de 566 *primers* RAPD (Operon®). Um total de 2.609 fragmentos RAPD foram amplificados, representando uma cobertura estimada de um marcador a cada 714Kb, o que equivale a 0,1% do genoma da espécie. Os resultados obtidos sugerem que a espécie possui um sistema de determinação sexual não cromossômico ou, alternativamente, que a espécie teria sofrido uma perda recente do cromossomo portador do gene determinante do sexo. Estudos envolvendo cruzamentos entre indivíduos gerados a partir de tratamentos de reversão sexual com hormônios e/ou produzidos através de indução da ginogênese são necessários para elucidar o mecanismo de determinação sexual da espécie.

## ABSTRACT

The Pirarucu (*Arapaima gigas*) is one of the largest fish of the Amazon Basin, reaching up to three meters in length and 200 kg in weight, and presents many interesting features for the development of fish species: great hardiness, high growth, high yield carcass, meat devoid of thorns and with great organoleptic qualities. The pirarucu sexing can only be performed later in the period of sexual maturity between three and four years old, based on behavioral habits and coloration of animals, or by ultrasound or surgical methods (laparoscopy), which are effectively unavailable for commercial use due to its high complexity and high complexity and high execution risk. The aim of this study was to scan the genome of this species using the methodology BSA (Bulk Segregant Analysis) associated with RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) in order to prospect for sex-specific sequences that allow the development of a methodology for identification of sex can be used for sexing fish pre-pubescent. DNA samples from male and female pirarucu were combined to form sex-specific bulks, which were evaluated with a total of 566 RAPD primers (Operon ®). A total of 2.609 RAPD fragments were amplified, representing an estimated coverage of one marker every 714 kb, which is equivalent to 0,1% of the genome of the species. The results obtained suggest that the species has a system of non-chromosome carrying the sex-determining gene. Studies involving crosses between individuals generated from sex reversal treatments with hormones and/or produced through the induction of ginogenesis are needed to elucidate the mechanism of sex determination of the species.

## 1. INTRODUÇÃO

O *Arapaima gigas*, conhecido popularmente como pirarucu, pertence à ordem Osteoglossiforme, família Osteoglossidae (Nelson, 1994 e Imbiriba, 2001). Seu habitat compreende os rios e várzeas das bacias Amazônica e Araguaia-Tocantins (Lima, 2009). O pirarucu é o maior peixe de escama de água doce do mundo, havendo relatos na literatura de exemplares adultos medindo três metros de comprimento e pesando mais de 200Kg (Ono et al., 2004).

A espécie possui características que a tornam atrativa para a criação em cativeiro com fins comerciais: apresenta alta rusticidade, carne desprovida de espinhos com baixo teor de gordura, e alto rendimento de carcaça - o filé de pirarucu representa cerca de 60% do peso vivo. A carne do pirarucu tem ótima aceitação no mercado consumidor das regiões onde é pescado e apresenta alto valor comercial. Adicionalmente, o *A. gigas* possui boa adaptação ao cativeiro, podendo chegar a pesar até 10 kg no primeiro ano de vida (Imbiriba 2001; Ono et al., 2004).

Apesar das vantagens citadas, a escassez de conhecimentos básicos sobre as necessidades nutricionais e a fisiologia reprodutiva da espécie dificulta o desenvolvimento de tecnologias para sua produção em larga escala em ambiente manejado. A produção de alevinos em cativeiro ainda é extremamente restrita e representa uma das maiores barreiras para o desenvolvimento da piscicultura comercial da espécie (Ono et al., 2004).

Um importante desafio para a criação deste animal em cativeiro é a falta de métodos para realizar a sexagem de indivíduos pré-púberes, pois a espécie não apresenta qualquer dimorfismo sexual nessa fase, o que dificulta o manejo adequado de reprodutores (Ono et al., Lima, 2009, Chu-Koo et al., 2009 e Carreiro et al., 2011). O pirarucu apresenta o comportamento de formar casais na época reprodutiva, período no qual os machos disputam entre si o território de acasalamento e as fêmeas. O estresse provocado por um manejo inadequado dos reprodutores, representado pela utilização de números desproporcionais de machos e fêmeas nos tanques de reprodução, pode comprometer a produção de alevinos (Lima, 2009 e Carreiro et al., 2011). Portanto, o desenvolvimento de métodos para identificação sexual precoce dessa espécie é altamente necessário.

A identificação sexual do pirarucu só pode ser realizada tardiamente, no período de maturidade sexual, o qual ocorre entre três e quatro anos de idade, com base nos hábitos comportamentais e coloração dos animais (Ono et al., 2004; Lima, 2009 e Monteiro et al., 2010). Machos adultos em fase reprodutiva possuem coloração escurecida na cabeça, avermelhada na cauda e uma mancha alaranjada na região inferior da cabeça, entre o opérculo e a cavidade bucal no entanto, nem todos os machos apresentam esse dimorfismo (Ono et al., 2004 e Monteiro et al., 2010). A falta de dimorfismo evidente na fase de pré-maturação sexual dificulta o desenvolvimento de procedimentos de manejo de estoques de reprodutores.

Os métodos disponíveis para sexagem de animais imaturos sexualmente, como o exame laparoscópico ou a ultrasonografia, são efetivamente inviáveis para uso em empreendimentos comerciais de larga escala devido os altos riscos de execução e complexidade (Honzaryk & Inoue, 2009). Portanto, um procedimento simples e de baixo custo para identificação do sexo de animais pré-púberes tem potencial para trazer grandes benefícios para o desenvolvimento sustentável de sistemas de produção comercial da espécie.

A identificação de marcadores moleculares sexo-específico para o pirarucu seria de grande utilidade para o desenvolvimento de ensaios diagnósticos para sexagem de peixes pré-púberes, a exemplo de outras espécies de peixes como: a truta arco-íris, *Oncorhynchus mykiss* (Iturra et al., 1998); a tilápia, *Oreochromis niloticus* (Bardakci, 2000); o bagre africano, *Clarias gariepinus* (Kovács et al., 2001); e o esturjão beluga, *Huso huso* (Keyvanshokooh et al. 2007).

Tendo em vista o acima exposto, esse trabalho teve como objetivo a prospecção de marcadores sexo-específicos para o pirarucu com a utilização da metodologia de Análise de Segregantes Agrupados (*Bulk Segregant Analysis – BSA*, Michelmore et al., 1991) com marcadores RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*, Willians et al., 1990), a fim de gerar informações que permitam elucidar o sistema de determinação sexual do pirarucu, e possibilitar o desenvolvimento de um ensaio molecular para sexagem de animais pré-púberes.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 Coleta de amostras

As amostras utilizadas foram coletadas no município de Santarém no Estado do Pará, em três comunidades distintas (Santa Maria – MA, Tapará-pixuna - PI e Mucurituba - MU) para diversificar as amostragens, em novembro de 2008, com as devidas autorizações dos órgãos ambientais (licença N° 16623-1 e código de autenticação 37735557 de 2008 a 2009, Anexo 1). Peixes adultos foram capturados, abatidos e eviscerados para sexagem com base na morfologia dos órgãos sexuais. Amostras de sangue dos animais capturados foram coletadas em tubos com EDTA e mantidas sob refrigeração até o processamento para extração de DNA.

### 2.2 Extração do DNA

A extração do DNA foi realizada com kits “96 Wells genomic DNA extraction Kit” (RBC Bioamérica), de acordo com o protocolo do fabricante, adaptado para o volume de amostra (de 200µl para 50µl). As amostras de DNA extraídas foram quantificadas com aparelho nanodrop (Nanodrop ND1000).

### 2.3 Análise de Segregantes Agrupados (*Bulk Segregant Analysis*– BSA)

Com base nas estimativas de otimização do número de indivíduos necessários para integrar cada grupo ou *bulk* de amostras, previamente estabelecidas (Michelmore et al., 1991, Fu, 2003), amostras de 11 fêmeas e 12 machos foram utilizadas para formação dos *bulks* sexo-específicos. Quantidades equimolares de DNA de cada indivíduo foram combinadas para compor cada agrupamento, os quais foram diluídos a uma concentração final de 3ng/ul.

Os *bulks* de macho e fêmea foram analisados com um total de 566 *primers* RAPD Operon® (tabela 1). As reações de PCR foram realizadas em duplicata com as seguintes condições: 2µM de *primer*, 2,5mM dNTP, 25mM MgCl<sub>2</sub>, 0,5U de Taq Polymerase Promega®, 3ng de DNA, Tampão 1X em um volume final de 10µL. Os parâmetros de termociclagem

utilizados foram: 3 min a 94°C, 40 ciclos de 15 seg a 95°C, 30 seg a 35°C e 1 min a 72°C, e um passo final de 7 min a 72°C.

**Tabela 1:** Relação de primers utilizados para prospecção de fragmento sexo-específico para *Arapaima gigas*

Primer	Primers do Kit Operon®																			
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
OPA	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
OPAA	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
OPAB	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
OPAD	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x			x			
OPAE	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
OPAF	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
OPAG	x	x	x	x	x	x	x	x	x			x	x	x	x	x	x	x	x	x
OPAI		x		x		x			x	x		x	x	x	x	x	x	x	x	x
OPAX	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
OPB	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
OPBA	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
OPC	x	x	x	x	x	x		x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x		x
OPD	x	x	x	x	x	x	x		x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
OPE	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
OPF	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x		x	x	x	x	x	x
OPG	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x			x	x	x	x	x	x	x
OPH												x				x		x		
OPI	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x			x	x	x	x	x	x	x
OPJ	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
OPK	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
OPL	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
OPM	x	x	x		x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
OPN	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
OPO	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
OPP	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
POR	x	x		x		x	x	x		x		x	x	x		x	x	x	x	x
OPS	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
OPT	x		x	x	x	x	x		x	x		x	x		x	x	x	x	x	x
OPU	x		x			x				x					x	x				x
OPV	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x			x	x	x	x	x	x	x
OPW	x	x	x	x	x	x	x	x	x		x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
OPX	x		x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
OPY		x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
OPZ	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x

Os produtos de PCR foram separados por eletroforese em tampão 1X TBE – Tris Borato EDTA, com tensão de 140V por três horas, em géis de agarose 1,5% e corados com

Brometo de Etídio. Os géis foram visualizados em transiluminador UV e fotodocumentados com equipamento EagleEye (EagleEye II – Stratagene).

Dois *primers* que amplificaram fragmentos diferenciados entre os agrupamentos de macho e fêmea foram utilizados para amplificar individualmente as amostras de cada um dos indivíduos utilizados no estudo.

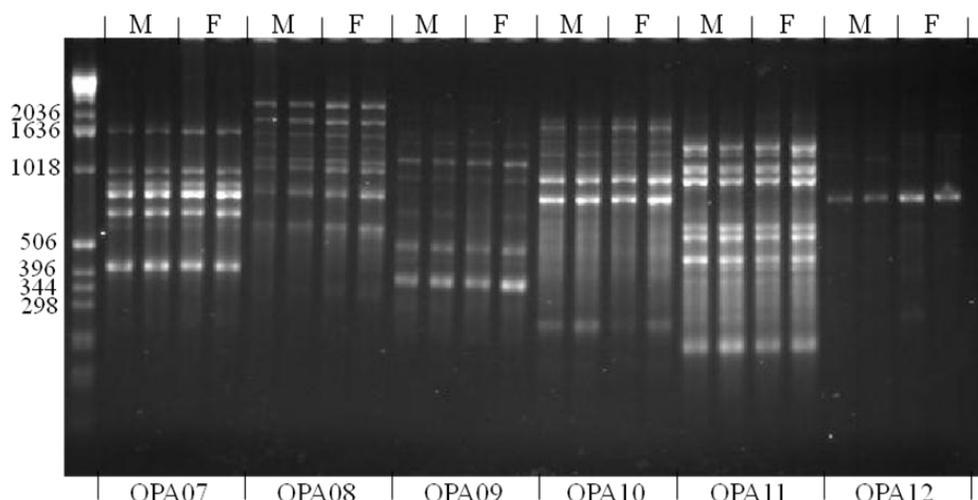
#### **2.4 Estimativa do nível de polimorfismo RAPD nas amostras testadas**

Vinte e dois *primers* RAPD, selecionados aleatoriamente, foram utilizados para estimar o nível de polimorfismo médio nas amostras de machos e fêmeas de pirarucu utilizados nos experimentos de BSA (OPAB17, OPB08, OPN04, 09, 11-13, 15, 16, OPO07, 08, 10-16 e 18-20 e OPP08). Amostras de DNA de cada um dos 12 machos e 11 fêmeas foram amplificadas individualmente, e os fragmentos de RAPD foram separados em géis de agarose, com os mesmos parâmetros utilizados anteriormente. O número total de fragmentos e o número total de fragmentos polimórficos foram determinados nestes 22 marcadores e posteriormente extrapolados para o total de 566 *primers* utilizado, estimando o número de fragmentos polimórficos para todos os *primers* utilizados no experimento.

### 3. RESULTADOS

#### 3.1 Análise de Segregantes Agrupados

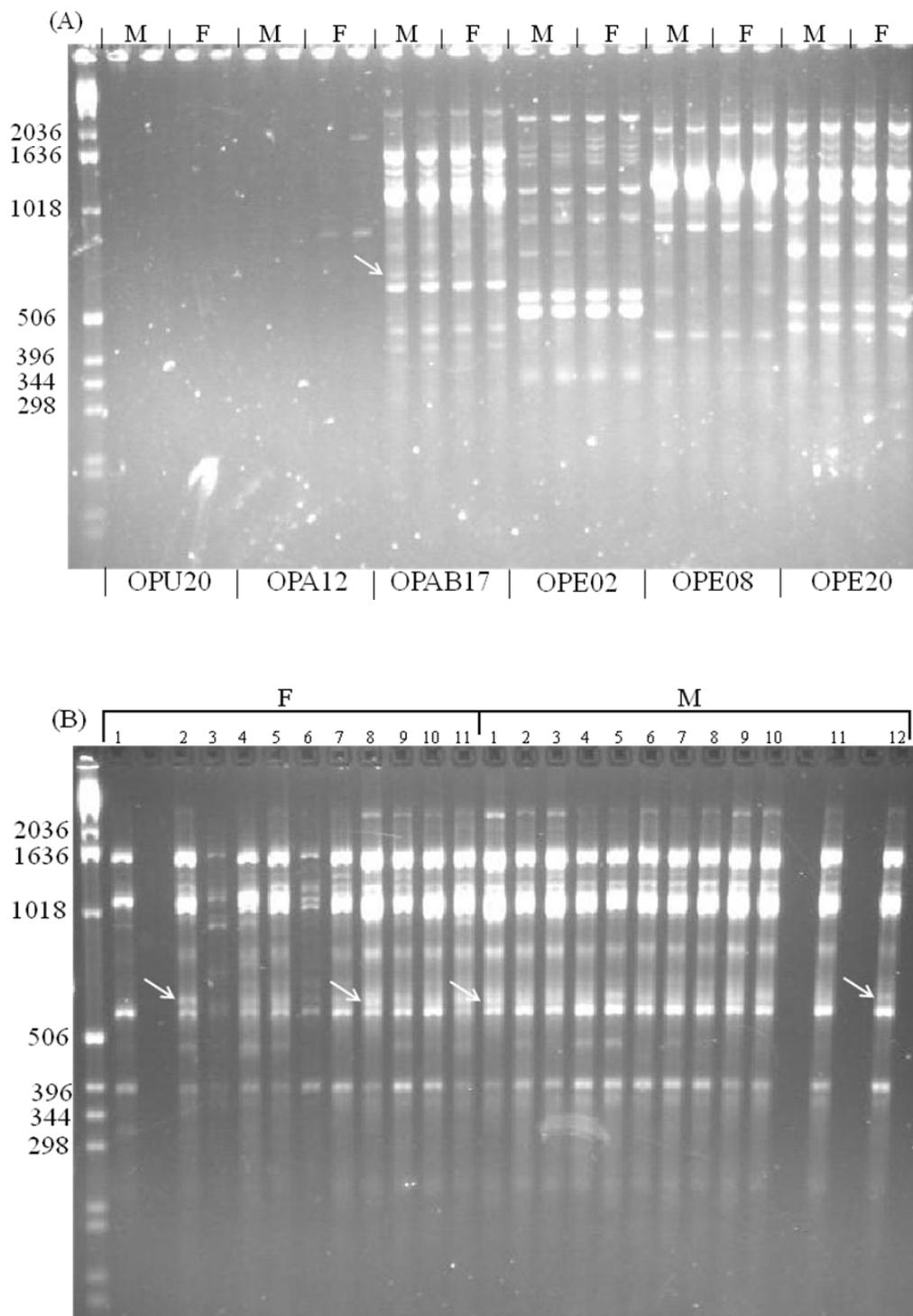
Um total de 2.609 fragmentos RAPD foi amplificado com os 566 *primers* testados (Figura 1). Setenta por cento dos *primers* RAPD amplificaram pelo menos um fragmento, sendo que 70 *primers* não geraram nenhum fragmento.



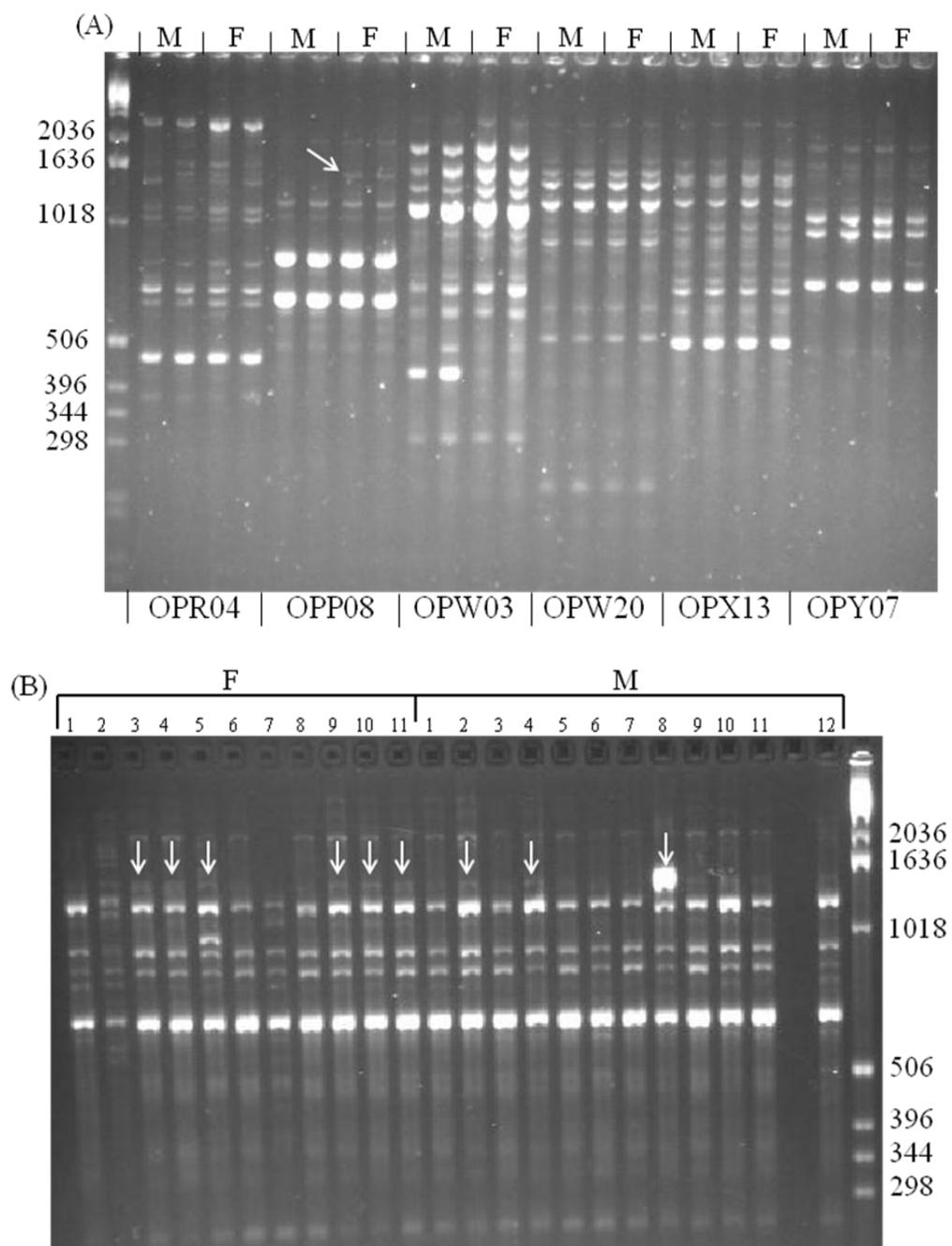
**Figura 1:** Exemplo de fragmentos amplificados com os *primers* RAPD. A letra M representa o agrupado de machos e a F o agrupado de fêmeas.

Dois *primers* amplificaram fragmentos sexo-específicos na fase de avaliação dos *bulks*. O *primer* OPAB17 amplificou um fragmento específico de aproximadamente 700pb apenas no *bulk* de machos (Figura 2-A). A avaliação individual das amostras de macho e fêmea revelou que o fragmento em questão foi encontrado em vários indivíduos, inclusive em algumas fêmeas (Figura 2-B). O *primer* RAPD OPP08 amplificou um fragmento específico de aproximadamente 1.500pb apenas no *bulk* de fêmeas (Figura 3-A). A avaliação individual de

cada amostra de macho e fêmea revelou um padrão de amplificação diferente do observado originalmente e nenhum fragmento sexo-específico foi observado (Figura 3-B).



**Figura 2:** (A) Amplificação de seis marcadores RAPD, evidenciando a banda diferenciada entre os agrupados de macho (M) e fêmea (F) no *primer* OPAB17. (B) Resultado da amplificação do DNA de cada indivíduo contido nos *bulks* de macho e fêmea.



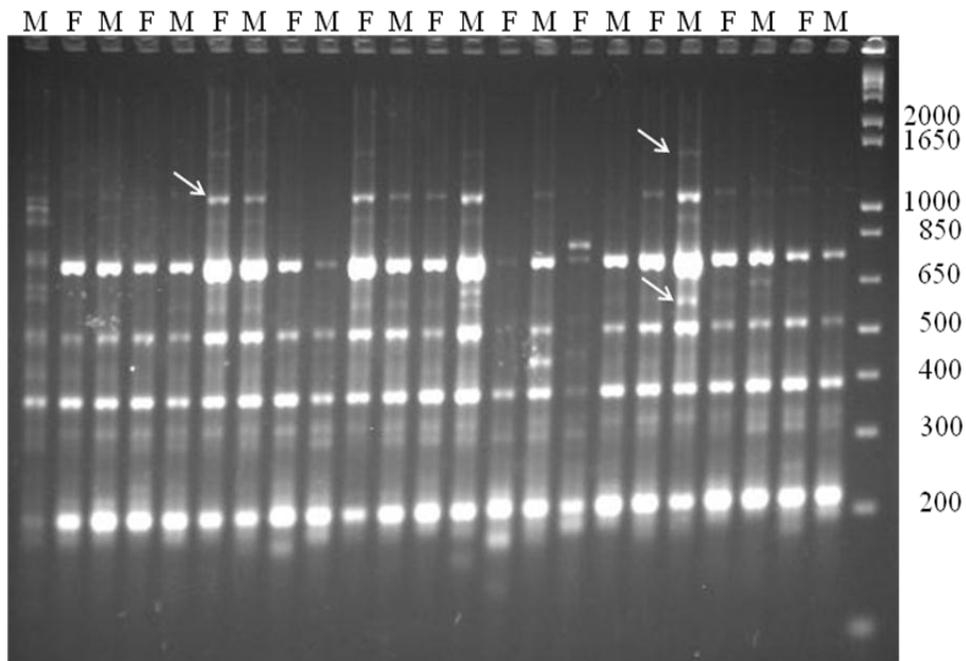
**Figura 3:** (A) Amplificação de seis marcadores RAPD, evidenciando a banda diferenciada entre os agrupados de macho (M) e fêmea (F) no *primer* OPP08. (B) Resultado da amplificação do DNA de cada indivíduo contido nos agrupados de macho e fêmea.

### 3.2 Estimativa do nível de polimorfismo RAPD nas amostras testadas

Os 22 *primers* utilizados para avaliação do nível de polimorfismo intraespecífico observado nos indivíduos amostrados geraram um total de 214 fragmentos RAPD. Destes, 110 (51,4%) fragmentos apresentaram padrão polimórfico nas 23 amostras de pirarucu avaliadas (Figura 4). Estes resultados foram utilizados para estimar a cobertura genômica alcançada com os experimentos de BSA. O número total de fragmentos RAPD polimórficos segregando nas amostras incluídas no estudo ( $n$ ) pôde ser estimado através da fórmula:

$$n = x.(y \div z)$$

onde  $x$  é o número total de fragmentos RAPD amplificados com os 566 *primers* RAPD durante os experimentos de BSA, e  $y$  e  $z$  representam respectivamente, o número total e o número de fragmentos RAPD polimórficos, amplificados nas 23 amostras de machos e fêmeas com os 22 *primers* utilizados no estudo de avaliação do nível de polimorfismo médio. Considerando que um total de 2.609 fragmentos RAPD foi amplificado no estudo de BSA, podemos estimar que um total de 1.341 fragmentos polimórficos estavam segregando nas amostras avaliadas.



**Figura 4:** Resultado da eletroforese em gel de agarose 1,5% para cada espécime de pirarucu, mostrando o polimorfismo gerado (setas).

O conteúdo nuclear haplóide do *A. gigas* foi estimado em 0,98 picogramas por Hinegarner e Rosen (1972). A partir desta informação e usando a fórmula descrita por Dolezel et al. (2003), é possível estimar o tamanho em pares de base deste genoma:  $0,978 \times 10^3 \times 0,98\text{pg} = 958,44\text{Mpb}$ . Dessa forma, podemos inferir que os experimentos realizados resultaram no mapeamento médio de um fragmento RAPD polimórfico a cada 714Kpb (958.440Kpb/1.341fragmentos polimórficos).

#### 4. DISCUSSÃO

A identificação de marcadores moleculares sexo-específicos para o pirarucu representa uma questão essencial para o desenvolvimento e a aplicação de metodologias inovadoras para a criação desta espécie em cativeiro. O desenvolvimento de um método rápido e eficaz para a sexagem de peixes pré-púberes é extremamente necessário para implementação de rotinas adequadas de manejo de estoques de reprodutores de espécies que não apresentam dimorfismo sexual evidente, como o pirarucu. A impossibilidade de identificar o sexo de peixes juvenis não permite a seleção eficaz da proporção adequada de machos e fêmeas para estabelecimento de plantéis de reprodutores. Em outras espécies, como o esturjão (*Huso huso*), métodos moleculares (Keyvanshokoo et al., 2007) e cirúrgicos (Falahatkar et al., 2011) foram desenvolvidos para sexar peixes juvenis e permitir o manejo diferenciado de machos e fêmeas, os quais são destinados a produção de carne e ovos (caviar), respectivamente (Falahatkar et al., 2011).

Tecnologias baseadas em tratamentos hormonais para reversão sexual de alevinos e/ou da indução artificial da ginogênese por meio de choques térmicos ou hiperbáricos foram desenvolvidas para gerar populações monosexo de algumas espécies de peixes (Tabata, 2000; Lee & Donaldson 2001; Bombardelli et al., 2004; Borges, 2004). Em alguns casos, esses métodos têm sido largamente adotados pelo setor produtivo, em consequência dos ganhos produtivos obtidos (Tabata, 2000; Bombardelli et al., 2004). A aplicação dessas tecnologias depende também de um método molecular que permita identificar o loco de determinação sexual da espécie, para que “supermachos” (YY) ou “superfêmeas” (WW), dependendo do sistema de determinação sexual da espécie, possam ser identificados e utilizados como reprodutores.

Um número elevado de sistemas de determinação do sexo foi descrito para diferentes espécies de peixes, incluindo sistemas de determinação genética e sistemas dependentes de temperatura. Os sistemas genéticos podem ser exclusivamente cromossômicos (com machos heterogaméticos – XY ou fêmeas heterogaméticas – ZW), sistema cromossômico influenciado por genes autossômicos, ou de caráter poligênico. Além disso, os peixes são a única classe de vertebrados onde é possível encontrar hermafroditismo natural, simultâneo ou sequencial em um número significativo de espécies (Matsuda, 2003). Adicionalmente, diferentes

sistemas de determinação sexual podem ser encontrados em espécies pertencentes ao mesmo gênero, como no caso das tilápias, as quais podem apresentar sistema de determinação XY (*Oreochromis niloticus*) ou ZW (*O. aureus*), conforme descrito por Campos-Ramos et al. (2001).

Cromossomos sexuais heteromórficos já foram observados em mais de 176 espécies de peixes de diferentes grupos (Devlin & Nagahama 2002), inclusive em espécies pertencentes à família do pirarucu, como o *Osteoglossum bicirrhosum* (Uyeno & Miller, 1971). No entanto, o *A. gigas* não apresenta cromossomos sexuais diferenciados (Marques et al., 2006), indicando que, caso a espécie apresente um sistema de determinação sexual cromossômico, a região genômica diferenciada associada ao loco determinador do sexo (*Sex Determining Locus*) apresenta tamanho reduzido, não identificável morfologicamente. Estudos sobre o sistema de determinação sexual atuante no pirarucu são inexistentes, sendo perfeitamente possível que o *A. gigas* possua qualquer um dos sistemas encontrados nesta classe de vertebrados.

Estratégias empregadas para prospectar marcadores moleculares sexo-específicos no pirarucu devem considerar toda a diversidade e complexidade das questões expostas. O estudo realizado levou em consideração os pontos citados, e poderia ter identificado fragmentos sexo-específico, caso o sistema de determinação sexual do pirarucu fosse XY ou ZW. A recuperação de sequências presentes exclusivamente em um genoma, de forma que muitos fragmentos de DNA possam ser analisados simultaneamente, podem ser usadas para comparar os padrões de fragmentos obtidos entre machos e fêmeas. Dentre as técnicas disponíveis para a identificação de sequências presentes exclusivamente em um genoma, o BSA-RAPD representa uma abordagem simples e de baixo custo. As estimativas de cobertura genômica obtidas para o presente estudo revelaram que, se a espécie possui realmente um sistema cromossômico de determinação sexual, o Loco de Determinação Sexual deve estar contido em um fragmento genômico de tamanho reduzido, contendo menos de 714Kpb, o que equivale a menos de 0,1% do genoma.

Embora fatores genéticos provavelmente regulem a determinação do sexo da maioria dos peixes, é possível afirmar que um número relativamente reduzido de teleósteos possui cromossomos sexuais morfologicamente distintos (Arkhipchuck, 1995). Considerando-se os mecanismos de evolução de cromossomos sexuais descritos (Graves & Shetty, 2001, Graves 2008) e o fato do *A. gigas* ser uma espécie pertencente a um dos grupos mais antigos de teleósteos, o qual teve origem no período Jurássico (Queiroz & Crampton, 1999; Lavoué &

Sullivan, 2004; Ono et al. 2004; Scorvo-Filho et al., 2004), é possível sugerir que o sistema de determinação sexual da espécie não é do tipo XY ou ZW, pois os cromossomos sexuais já deveriam ter acumulado diferenças significativas, como pode ser observado em outras espécies (Graves & Shetty, 2001 e Graves 2008).

Alternativamente, também é possível que o *A. gigas* tenha recentemente perdido o cromossomo portador do loco determinante do sexo. Os processos de redução do conteúdo do cromossomo heterogamético e de perda de função dos genes nele localizados têm sido amplamente descritos na literatura, sendo consenso que a sua degeneração é resultante da supressão da recombinação causada pela aquisição do gene determinante do sexo, seguido de acúmulo de mutações (Graves, 1995; Rice, 1987; Charlesworth & Charlesworth, 2000; Steinemann & Steinemann, 2000; Lahn et al, 2001; Graves, 2006 e Graves et al., 2006). Assim, é plausível que a espécie esteja nos estágios iniciais da evolução de um novo sistema cromossômico sexual, iniciado por outro loco determinante do sexo, como já fora observado em espécies de mamíferos. Como exemplo, pode-se citar o relato de duas espécies de roedores do gênero *Elliomys* que tiveram o cromossomo Y inteiramente perdido e não possuem o gene SRY (que corresponde ao loco determinante do sexo em mamíferos – Just et al., 1995). Graves e Shetty (2001) sugerem que talvez um novo gene determinante do sexo tenha surgido nestas espécies levando à redundância do SRY e do próprio cromossomo Y, que foi degradado completamente.

Desta maneira, os resultados obtidos podem indicar que a espécie possui um sistema de determinação sexual não exclusivamente cromossômico ou, alternativamente, que a espécie teria sofrido uma perda recente do cromossomo portador do gene determinante do sexo, estando no início do processo evolutivo de um novo sistema cromossômico. Os resultados obtidos também não permitem eliminar a hipótese do *A. gigas* apresentar um sistema de determinação sexual ambiental, sob regulação de fatores como temperatura, fotoperíodo, e pH da água.

A Análise de Segregantes Agrupados com marcadores RAPD foi utilizada com grande sucesso em estudos para identificação de marcadores sexo-específicos em diferentes espécies (Iturra et al., 1998, Bardakci, 2000, Gebler et al., 2007; Mariotti et al., 2009; Casas et al., 2011). Essa metodologia, mesmo no contexto atual onde o seqüenciamento e reseqüenciamento de genomas completos está se tornando trivial devido à redução dos custos de

geração de dados, ainda apresenta uma alternativa simples, de baixo custo, e com potencial para apresentar resultados positivos. Marcadores moleculares RAPD foram largamente utilizados em estudos de mapeamento e caracterização genética desde sua concepção, mas apresentam a baixa repetibilidade como uma de suas principais características desfavoráveis (Ferreira & Grattapaglia, 1995). A inconsistência dos resultados obtidos com o *primer* OPAB17 pode ser considerada uma provável consequência dessa questão.

Estudos para avaliar a estrutura do pareamento cromossômico em complexos sinaptonêmicos podem ser úteis para identificação de regiões sexo-específicas em cromossomos somáticos, impossíveis de serem identificadas com técnicas tradicionais de citogenética (Campos-Ramos et al., 2001; Carrasco et al., 1999). Adicionalmente, experimentos envolvendo cruzamentos entre indivíduos gerados a partir de tratamentos de reversão sexual com hormônios e/ou produzidos por meio da indução artificial da ginogênese têm sido utilizados para elucidar os mecanismos de determinação sexual de um número elevado de espécies de peixes (Van Eennennaam et al., 1999; Lee & Donaldson, 2001). A realização de tais experimentos permitirá elucidar o mecanismo de determinação sexual da espécie e assim possibilitará o estabelecimento de uma estratégia adequada para prospecção de marcadores moleculares úteis para o desenvolvimento de uma metodologia de sexagem de peixes pré-púberes.

## 5. CONCLUSÃO

As estimativas de cobertura genômica obtidas revelaram que, se a espécie possui realmente um sistema cromossômico de determinação sexual, o Loco de Determinação Sexual deve estar contido em um fragmento genômico de tamanho reduzido, contendo menos de 714Kpb, o que equivale a menos de 0,1% do genoma. Os resultados obtidos sugerem que a espécie possui um sistema de determinação sexual não cromossômico ou, alternativamente, que a espécie teria sofrido uma perda recente do cromossomo portador do gene determinante do sexo. Estudos envolvendo cruzamentos entre indivíduos gerados a partir de tratamentos de reversão sexual com hormônios e/ou produzidos com processos de ginogênese induzida são necessários para elucidar o mecanismo de determinação sexual da espécie.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARKHIPCHUK V.V. (1995). Role of chromosomal and genome mutations in the evolution of bony fishes. **Hydrobiol J** 31: 55–65.

BARDAKCI, F. (2000). The use of random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers in sex discrimination in Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus* (Pisces: Cichlidae). **Turkish Journal of Biology**, Kavaklidere, v. 24, n. 1, p. 169-175.

BOMBARDELLI, R.A.; HOYASHI, C.; MEURER, F. (2004). **Aplicação de métodos diretos e indiretos para a produção de população monossexo na tilapicultura**. Arquivo de Ciências Veterinárias e Zoologia. UNIPAR, Umuarama. Vol. 7 (1), p. 57 – 68.

BORGES, A.M. (2004). **Efeito da temperatura da água na produção de populações monossexo de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) da linhagem Chitralada**. Programa de Pós graduação – Universidade de Brasília, Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária.

CAMPOS-RAMOS R.; HARVEY S.C.; MASABANDA J.S.; CARRASCO L.A.; GRIFFIN D.K.; McANDREW B.J.; BROMAGE N.R.; PENMAN D.J. (2001). Identification of putative sex chromosomes in the blue tilapia, *Oreochromis aureus*, through synaptonemal complex and FISH analysis. **Genetica** 111: 143–153.

CARRASCO, L.A.P.; PENMAN, D.J.; BROMAGE, N. (1999). Evidence for the presence of sex chromosomes in the Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) from synaptonemal complex analysis of XX, XY and YY genotypes. **Aquaculture** 173, 207-218.

CARREIRO, C. R. P., FURTADO NETO, M. A., MESQUITA, P. E. C., BEZERRA, T. A. (2011). Sex determination in the giant fish of Amazon Basin *Arapaima gigas* (Osteoglossiformes, Arapaimatidae), using laparoscopy. **Acta Amazonica**, v. 41 (3), p. 415 – 420.

CASAS, L.; SANCHEZ, L.; ORBAN, L. (2011). **Marine biology research**. Volume: 7 Issue: 4, p. 378-387.

CHARLESWORTH, B.; CHARLESWORTH, D. (2000). The degeneration of Y chromosome. Philosophical Transaction **Royal Society London BiolScience**, v. 355, p. 1563-1572.

CHU-KOO, F. DUGUÉ, R., AGUILAR, M. A., DAZA, A. C., BOCANEGRA, F. A., VEINTEMILLA, C. C., DUPONCHELLE, F., RENNO, J. F., TELLO, S., NUNEZ, J. (2009). Gender determination in the Paiche or Pirarucu (*Arapaima gigas*) using plasma vitellogenin, 17B-estradiol and 11-ketotestosterone levels. **Fish Physiol. Biochim**, v. 35, p. 125 – 136.

DEVLIN R.H.; NAGAHAMA, Y. (2002). Sex determination and sex differentiation in fish: an overview of genetics, physiological and environmental influences. **Aquaculture** 208, 191 - 364.

DOLEZEL, J.; BARTOS, J.; VOGLMAYR, H.; GREILHUBER, J. (2003). Nuclear DNA content and genome size of trout and human. Wily-Liss, **Inc. Cytometry** part A 51A, p. 127-128.

FALAHATKAR, B.; GILANI, M.H.T.; FALAHATKAR, S.; ABBASALIZADEH, A. (2011). Laparoscopy, a minimally-invasive technique for sex identification in cultured great sturgeon Husohuso Original Research Article **Aquaculture**, Volume 321, Issues 3-4, 1 December, p. 273-279.

FERREIRA, M. E. ; GRATTAPAGLIA, D. (1995). **Introdução Ao Uso de Marcadores RAPD e RFLP Em Análise Genética**. EMBRAPA-CENARGEM, Documento 20, 1 ed. Brasília: Lumma, v. 1., p. 221.

FU, YONG-BI (2003). **Applications of bulking in molecular characterization of plant germplasm: a critical review**. *Plant Genetic Resources*, August, vol. 1, p. 161-167.

GEBLER, P.; WOLKO, L.; KNAFLEWSKI, M. (2007). Identification of molecular markers for selection of supermale (YY) asparagus plants. **Journal Applied Genetic**. Vol. 48(2), p.129-31.

GRAVES, J.A.M. (1995). The origin and function of the mammalian Y chromosome and Y-borne genes – an evolving understanding. **BioEssays**, v.17, p. 311-320.

GRAVES, J.A.M.; SHETTY, S. (2001). Sex from W to Z – evolution of vertebrate sex chromosomes and sex determining genes. **Journal of Experimental Zoology**, v. 290, p. 449-462.

GRAVES, J.A.M. (2006). Sex chromosome specialization and degeneration in mammals. **Cell**, v. 124, p. 901-914.

GRAVES, J.A.M.; KOINA, E.; SANKOVIC, N. (2006). How the gene content of the human sex chromosomes evolved. **Current Opinion in Genetics & Development**, v. 16, p. 1-6.

GRAVES, J.A.M. (2008). Weird animal genomes and the evolution of vertebrate sex and sex chromosomes. **Annu Rev. Genetic** V. 42, p. 565 – 586.

HINEGARDNER, R. and ROSEN, D.E. (1972). Cellular DNA content and the evolution of teleostean fishes. **Am. Nat.** 106(951), p. 621-644.

HONCZARYK, A.; INOUE, L.A.K.A. (2009). Anestesia do pirarucu por aspersão direta nas brânquias do eugenol em solução aquosa. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 39, n.2, p. 577-579.

IMBIRIBA, E.P. (2001). Potencial de criação de pirarucu, *Arapaima gigas*, em cativeiro. **Acta Amazônica**. Vol. 31 (2), p. 299 – 316.

ITURRA, P.; MEDRANO, J.F.; BAGLEY, M.; LAM, N.; VERGARA, N.; MARIN, J.C. (1998). Identification of sex chromosome molecular markers using RAPDs and fluorescent in situ hybridization in rainbow trout. **Genetic**. Vol. 101, p. 209 – 213.

JUST, W.; RAU, W.; VOGEL, W. (1995). Absence of SRY in species of vole *Ellobius*. *Nature genetics*. Vol. 11, p. 117-118.

KEYZANSHOKOOH, S.; POURKAZEMI, M.; KALBASSI, M.R. (2007). The RAPD technique failed to identify sex-specific sequences in beluga (*Huso huso*). **Journal of Applied Ichthyology**. Vol. 23, p. 1 – 2.

KOVÁCS, B.; EGEDI, S.; BARFAI, R.; ORBAN, L. (2001). Male-specific DNA markers from African catfish (*Clarias gariepinus*). **Genetica**, 110, p. 267-276.

LAHN, B.T.; PEARSON M.N.; JEGALIAN, K. (2001). The human Y chromosome in the light of evolution. **Nature Reviews Genetics**, v. 2, p. 207-216.

LAVOUÉ, S.; SULLIVAN, J.P. (2004). Simultaneous analysis of Five molecular markers provides a well-supported phylogenetic hypothesis for the living bony-tongue fishes (Osteoglossomorpha: Teleostei). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 33, p.171-185.

LEE, C. S. & DONALDSON, E. M. (2001). General discussion on reproductive biotechnology in fish aquaculture. **Aquaculture**, v. 193, p. 303 – 320.

LIMA, M.P. (2009). **Análise da expressão gênica diferencial na hipófise de pirarucu (*Arapaima gigas*) em fase reprodutiva e não reprodutiva**. Instituto Nacional de pesquisas da Amazônia. Programa de pós graduação em genética, conservação e biologia evolutiva. Manaus.

MARIOTTI, B.; MANZANO, S.; KEJNOVSKÝ, E.; VYSKOT, B.; JAMILENA, M. (2009). Accumulation of Y-specific satellite DNAs during the evolution of *Rumex acetosa* sex chromosomes. **Molecular Genetic Genomics**, v. 281, p. 249 – 325.

MARQUES, D.K.; VENERE, P.C.; JUNIOR, P.M.G. (2006). **Chromosomal characterization of the bonytongue *Arapaima gigas* (Osteoglossiformes: Arapaimidae)**, Sociedade Brasileira de Ictiologia.

MATSUDA, M. (2003). **Sex determination in fish: lessons from the sex-determining gene of the teleost medaka, *Oryzias latipes***. *Development Growth differentiation*, v. 45, p. 397 – 403.

MICHELMORE, R.W.; PARAN, I.; KESSELI, R.V. (1991). Identification of markers linked to disease-resistance genes by bulked segregant analysis: A rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating populations. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 88, p. 9828-9832.

MONTEIRO, L.B.B.; SOARES, M.C.F.; CATANHO, M.T.J.; HONCZARYK, A. (2010). Aspectos reprodutivos e perfil hormonal dos esteróides sexuais do pirarucu, *Arapaima gigas* (Schinz, 1822), em condições de cativeiro. **Acta Amazônica**, v. 40 (3), p. 435 – 450.

NELSON, J. S. (1994). **Fishes of the World**, 3rd edition. John Wiley and Sons, Inc. New York, NY, USA.

ONO, E. A., HALVERSON, M. R., KUBITZA, F. (2004). Pirarucu, o gigante esquecido. **Panorama da Aqüicultura**, v.14(81), p. 14-25.

QUEIROZ, H. L., CRAMPTON, W. G. R. (1999). **Estratégias para o manejo de recursos pesqueiros de Mamirauá**. In QUEIROZ, H.K.; CRAMPTON, W.G.R. Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico. Sociedade Civil de Mairimurá. Tefe, Brasil, p. 108-141.

RICE, W.R. (1987). Genetic hitch-hiking and the evolution of reduced genetic activity of the Y sex chromosome. **Genetics**, v. 116, p. 161-167.

SCORVO FILHO, J. D., ROGAS, N. E. T., SILVA, C. M., KONOIKE, T. (2004). Criação de *Arapaima gigas* (Teleostei osteoglossidae) em estufa e sistema fechado de circulação de água, no estado de São Paulo. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 30 (2), p. 161 – 170.

STEINEMANN, M., STEINEMANN, S. (2000). Common mechanisms of Y chromosome evolution. **Genetica**, v. 109, p. 105-111.

TABATA, Y. A. (2000). **Atualização sobre métodos e procedimentos para obtenção de populações monossexo de peixes: Produção de Fêmeas**. Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios. São Paulo.

UYENO, T., MILLER, R.R. (1971). Multiple sex chromosomes in a Mexican Cyprinodontidae fish. **Nature**, v. 231, p. 452-453.

VAN EENNENNAAM, L., VAN EENENNAAM, J. P., MEDRANO, J. F., DOROSHOV, S. I. (1999). Evidence of female heterogametic genetic sex determination in white sturgeon. **The Journal of Heredity**, v. 90, p. 231-233.

WILLIAMS, J.G.K., KUBELIK, A.R., LIVAK, K.J., RAFALSKI, J.A., TINGEY, S.V. (1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Res**, v. 18, p. 6531-6535.

**CAPÍTULO 3 – AVALIAÇÃO ESTRUTURA GENÉTICA DE POPULAÇÕES DE  
PIRARUCU (*Arapaima gigas*) NA REGIÃO DE SANTARÉM, PA, BRASIL.**

## RESUMO

O pirarucu (*Arapaima gigas*) possui grande importância econômica na Bacia Amazônica e, aos poucos, vem ganhando espaço nacional de forma que há uma carência de estudos genéticos voltados para expansão dessa crescente demanda, seja para auxiliar programas de conservação, manejo ou melhoramento genético da espécie. Desta forma, o presente trabalho visou testar a hipótese de que amostragens maiores em uma região limitada da Bacia Amazônica (Santarém, PA), podem ser usadas como indicativo de confirmação de grande parte da diversidade genética do pirarucu dentro de toda a Bacia Amazônica. A amostragem foi realizada em quatro comunidades diferentes: Santa Maria (N=47), Pixuna (N=26), Mucurituba (N=09) e Itapera (N=17). Os resultados obtidos a partir do sequenciamento de mais de 2000 pares de bases de duas regiões do genoma mitocondrial (ATPase e citocromo oxidase I) sugerem que a variabilidade genética encontrada é relativamente baixa mas, no entanto, foi possível distinguir uma pequena estruturação genética que pode ser derivada da população encontrada na calha principal do rio Amazonas. Esses resultados são compatíveis com os poucos trabalhos reportados na literatura sobre essa espécie, comprovando ser possível aumentar o N amostral e reduzir a representatividade geográfica, otimizando assim a realização de estudos filogenéticos para análise da estrutura populacional de pirarucu, possibilitando, conseqüentemente, uma resposta mais rápida para o tipo de manejo e preservação da espécie para a região analisada.

## ABSTRACT

The arapaima (*Arapaima gigas*) has great economic importance in the Amazon basin and gradually has been gaining ground National so that there is a lack of genetic studies aimed at expansion of this growing demand, is to assist population management and conservation programs, and genetic improvement species. Thus, this study aims to test the hypothesis that larger samples in a limited region of the Amazon Basin (Santarém, PA), can be used as an indication of confirmation of much of the genetic diversity of Arapaima within the entire Amazon Basin. Sampling was conducted in four different communities: Santa Maria (N = 47), Pixuna (N = 26), Mucurituba (N = 09) and Itapera (N = 17). The results from the sequencing of more than 2000 base pairs in two regions of the mitochondrial genome (ATPase and cytochrome oxidase I) suggest that the genetic variability found is relatively low however, it was enough to identify a low level of genetic structure which could be attributed mainly to the populations found in the main channel of the Amazon River. These results are consistent with previous reports for this species, which indicate that it is possible to increase sample size and reduce geographic representation, thus optimizing the performance of phylogenetic studies for analysis of pirarucu population structure, allowing therefore faster diagnostics for the management and preservation programs required of the species for the region analyzed.

## 1. INTRODUÇÃO

O peixe *Arapaima gigas* (Schinz, 1822), conhecido popularmente como pirarucu, é uma espécie nativa da Bacia Amazônica. Esta espécie é considerada o maior peixe de escamas de água doce devido ao seu grande porte, podendo atingir três metros e pesar 200 quilos (Castello, 2004).

Desde o século XVIII, o pirarucu sofre exacerbada exploração na região a fim de suprir a demanda alimentar da população (Hrbek et al., 2005). Devido a isso, o *A. gigas* sofreu uma drástica redução populacional, a ponto de ser necessária a intervenção de órgãos Federais, como o IBAMA – Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. Este órgão, em 2010, listou a espécie como sobre explorada no livro vermelho de espécies de peixe ameaçadas de extinção (Rosa & Lima, 2010). Baseado em dados do IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística), Aveline & Costa (1992) já relatavam que esta espécie estava ameaçada de extinção. Para tentar conhecer melhor o pirarucu estudos genéticos (Hrbek et al., 2003; Marques, 2003; Hrbek et al., 2005 e Hrbek et al., 2007), fisiológicos (Ferreira et al., 2010) e relacionados ao manejo (Camargo & Camargo, 2010) vem sendo feitos para se conhecer melhor a espécie e assim poder conservá-la com níveis de pesca aceitáveis.

A variabilidade genética é importante para manter a vitalidade reprodutiva, resistência a doenças e capacidade de se adaptar a mudanças ambientais, pois esta leva a adaptações ambientais e evolutivas. Desta forma a identificação de diversidade genética e como ela esta organizada espacialmente fornece dados interessante para estudos voltados à conservação de espécies (Primack & Rodrigues, 2001). Segundo Eizirik (1996) para a utilização de estratégias adequadas para a conservação de uma espécie é necessária a reconstrução de um padrão evolutivo para a mesma ou de uma determinada população. Para tanto, o uso de marcadores moleculares se torna uma ferramenta adequada captar/ quantificar tais padrões.

Polimorfismos encontrados no DNA mitocondrial, por exemplo, tem sido utilizados como marcadores moleculares para fins de estudos populacionais desde a década de 80 (Avise et al., 1979, Avise 2000, Martins et al., 2003), pois o mtDNA possui como característica alta taxa de mutação – de cinco a dez vezes maior que o DNA nuclear, grande

número de cópias por célula, alta taxa evolutiva, e herança materna (Ferguson et al., 1995; Brown et al., 1979; Harrison, 1989 e Frederico, 2006). Em pirarucu, um estudo populacional pioneiro realizado por Hrbek et al. (2005), nas Bacias Amazônica e do Tocantins com uma amostragem de 120 indivíduos, sugeriu uma correlação entre aumento de variabilidade genética à medida que se aumenta a distância geográfica das principais cidades/ comunidades humanas localizadas nas calhas principais desses rios. Tal padrão foi justificado pela menor exploração da espécie em locais onde a população humana é reduzida. Além deste estudo, muitos outros fazem uso de amostragens reduzidas de forma a abranger uma maior representatividade geográfica (Carvalho-Costa, 2009, Hrbek et al., 2005; Costa, 2010) e poucos estudos fazem uma amostragem maior de uma localidade de forma a testar se o N amostral pode influenciar no resultado a ser obtido.

Considerando que os resultados de Hrbek et al. (2005) sugerem uma baixa estrutura filogeográfica para espécie *Arapaima gigas*, o presente trabalho tem como objetivos tanto testar a hipótese de que amostragens maiores em uma região limitada da Bacia Amazônica (Santarém, PA) podem ser usadas como indicativo da diversidade genética existente dentro de grandes bacias hidrográficas para espécies de grande porte de peixe, bem como contribuir com mais informações de origem genética para auxiliar/otimizar programas de conservação e melhoramento desta espécie na Bacia Amazônica.

## 2. MATERIALE MÉTODOS

### 2.1 Amostragem e extração do DNA

Amostras de sangue de pirarucu foram coletadas entre o ano de 2008 e 2009, em quatro comunidades distintas, no município de Santarém no Estado do Pará: Santa Maria - MA (n= 47), Pixuna - PI (n= 26), Mucurituba - MU (n= 09) e Itapera - MI (n= 17) (Figura 1). O sangue coletado foi armazenado em tubo Vacutainer® contendo EDTA, e posteriormente transferido para tubo Eppendorf® onde foi mantido a -20°C. A extração do DNA foi feita a partir de modificações no protocolo proposto por Miller et al. (1988), tais como o acréscimo de algumas etapas como: adição de duas lavagens com solução bloodylisis; uso de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico e KCl, e retirada de algumas etapas do protocolo original como: adição de NaCl e Tris-HCl. Após essa etapa o DNA foi quantificado em espectrofotômetro (Nanodrop), diluído a 3ng/μl, e esta quantificação foi conferida em gel de agarose a 1%.



**Figura 1:** Representação geográfica dos locais onde foram feitas as amostragens de *Arapaima gigas* na região de Santarém – PA.

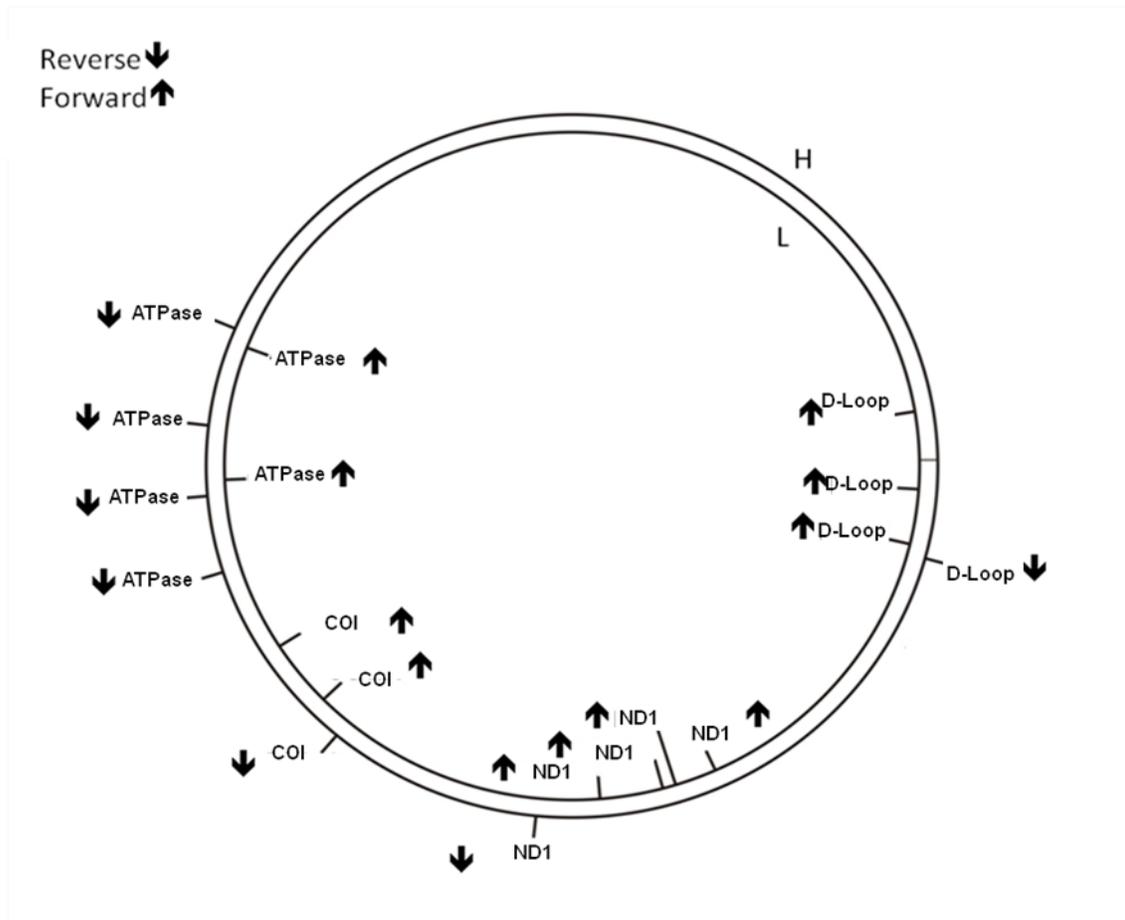
## 2.2 Amplificação do DNA e sequenciamento

Quatro regiões do DNA mitocondrial foram selecionadas para amplificação por meio da Reação em Cadeia pela Polimerase – PCR, são elas: ATP sintase subunidade 08 (ATPase), citocromo oxidase B (COI), NADH desidrogenase subunidade 1 ND1e região controle (D-loop) (Tabela 01). A localização de cada região dentro do DNA mitocondrial do pirarucu pode ser observada na figura 2.

**Tabela 1:** Relação de primers utilizado para o presente trabalho, bem como a sua referência

Nome	Sequência Forward	Sequência Reverse	Fonte
<b>ATPase</b>	5'-TGGGTGTTAAAATAGATGC-3'	5'-GAGGAGAGCRGCRGATGCCCC-3'	Hrbek et al., 2005
	5'-TGAAACTGACCATGACACTAAG-3'*	5'-CTTAGTGTCATGGTCAGTTTCA-3'*	Hrbek et al., 2005
	5'-GTTAGTGGTCAKGGGCTTGGRTC-3'	5'-AAYCCTGARACTGACCATG-3'	Quenouille et al., 2004
<b>COI</b>	5'-GCATTTCCGCGAATAAATAA-3'	5'-GAAAAGCAGGTTCTTCAAATG-3'	Hrbek et al.,2008
	5'-TACATRGGAATRGTATGAGC-3'*		Hrbek et al.,2008
<b>NADH</b>	5'-TACGACCTCGATGTTGGATCAGG-3'	5'-GGAAGCACTARGAGTTTTGA-3'	Hrbek et al.,2008
	5'-CCGGCCAATGCAAAAAGACCTAA-3'*	5'-GAAACAAACCGAGCCCCYTT-3'*	Hrbek et al.,2008
<b>D-loop</b>	5'-CTCYACCCCTGACTCCCAAAG-3'	5'-GGCGGATACTTGCATGT-3'	Hrbek et al.,2008
	5'-GGCATTGGTTCCTATTTTCAGG-3'*		Hrbek et al.,2008

\* Primers internos



**Figura 2:** Representação do DNA mitocondrial de *Arapaima gigas* bem como a posição de cada primer utilizado neste estudo e seu sentido: *forward* ou *reverse*.

A amplificação dos fragmentos de DNA usando os primers citados foi realizada com o Kit Qiagen® Q Solution. Os reagentes utilizados para a reação foram Mix para PCR (50%), tampão Q solution (10%), 0,5µl de cada primer a 10µM, 1,5µl de DNA a 3ng/µl e água livre de RNase em um volume final de 10µl.

Para a reação de sequenciamento 5µl da reação da PCR foram purificados com 1µl de ExoSAP-IT® (USB® *Product Affymetrix*) a 37°C por 30, minutos e 80°C por 20 minutos. Posteriormente a reação de seqüenciamento foi feita seguindo o protocolo do kit BigDye® v.3 (*Applied Biosystems*). Em seguida, a reação de seqüenciamento foi purificada com 3µl de EDTA a 125mM e 25µl de etanol a 100% e posterior centrifugação a 4°C por 30 minutos

a 3.000 rpm. Uma segunda etapa foi feita adicionando 30µl de etanol 70% e posterior centrifugação – 4°C por 15 minutos a 3.000 rpm. A solução foi descartada e o DNA foi ressuspensionado com 10µl de formamida Hi-Di. A eletroforese capilar da reação de sequenciamento foi realizada no ABI Prism 3100 Genetic Analyzer® (*Applied Biosystems*).

## 2.2 Análise de dados

As sequências geradas foram analisadas por meio do programa SeqScape (versão 2.5 *Applied Biosystems*) e editadas manualmente. O software MEGA versão 5.02 (Kumar et al., 2008) para edição e alinhamento das amostras com a sequência referência publicada por Hrbek et al. (2008), acesso NCBI/ GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)[EF523611.1].

Após alinhamento múltiplo com o programa ClustalW as sequências foram organizadas em três conjuntos de análise:

- 1 - sequências geradas neste trabalho de cada região do mtDNA padronizada e analisadas de forma independente;
- 2 - sequências geradas neste trabalho de cada região do mtDNA padronizada e analisadas em conjunto com sequências provenientes do GenBank;
- 3 - sequências geradas neste trabalho de todas as regiões do mtDNA concatenadas e analisadas em conjunto com sequências provenientes do GenBank.

O processo de análise de cada conjunto de dados foi realizado a partir da execução das seguintes etapas:

- 1 - foram identificados os sítios polimórficos (SNPs – *Single Nucleotide Polimorphism*), composição nucleotídica e diversidade haplotípica usando o programa DNAsp versão 5 Rozas et al. (2003) e Arlequin versão 3.5 (Excoffier & Lischer, 2010);
- 2 - para quantificar a diferenciação genética entre as populações foi utilizado o índice de fixação ( $F_{st}$ ) e sua significância foi estimada por meio de 1.000 permutações (Arlequin v. 3.5);

3 - a Análise de Variância Molecular (AMOVA) foi realizada para verificar a proporção da variação genética dentro e entre as populações de *Arapaima gigas* (Arlequin v. 3.5);

4 - a proximidade filogenética dos haplótipos identificados foi analisada por meio da construção de uma rede haplotípica pelo programa Network versão 4.1.1.2 (*Fluxus Technoloty Ltd* – [www.fluxus-engineering.com](http://www.fluxus-engineering.com)), usando o método *Median-Joining* (MJ) (Bandelt et al., 1999).

### 3. RESULTADOS

#### 3.1 Regiões selecionadas

As ampliações das regiões D-loop e ND1 não geraram resultados satisfatórios e foram excluídas do estudo. Os primers da ATPase (1), ATPase (2) e da citocromo oxidase foram padronizados com sucesso a partir das temperaturas de anelamento iguais a 59°C, 53°C e 50°C respectivamente. A tabela 2 resume todas as sequências usadas do GenBank neste estudo.

**Tabela 2:** Sequências do GenBank usadas nas análises de populações de *Arapaima gigas*

<b>GENE</b>	<b>ACESSO</b>	<b>TAMANHO DA SEQUÊNCIA</b>	<b>AUTOR</b>
<b>mtDNA</b>	EF523611.1	16433	Hrbek et al., 2008
	AY081891.1	1143	Hrbek et al., 2005
	AY081892.1	1143	Hrbek et al., 2005
	AY081893.1	1143	Hrbek et al., 2005
	AY081894.1	1143	Hrbek et al., 2005
	AY081895.1	1143	Hrbek et al., 2005
	AY081896.1	1143	Hrbek et al., 2005
<b>ATPase</b>	AY081897.1	1143	Hrbek et al., 2005
	AY081898.1	1143	Hrbek et al., 2005
	AY081899.1	1143	Hrbek et al., 2005
	AY081900.1	1143	Hrbek et al., 2005
	AY081901.1	1143	Hrbek et al., 2005
	AY081902.1	1143	Hrbek et al., 2005
	AY081903.1	1143	Hrbek et al., 2005
<b>CO1</b>	FJ418765.1	657	Ardura et al., 2010

### 3.2 ATPase

Foram amplificados e sequenciados 99 indivíduos, de forma que, quatro deles (MA02, MA11, MI11 e MU04) foram descartados por não apresentarem resultados satisfatórios no sequenciamento, mesmo após a execução de replicatas.

Foi obtido um total de 1.059 nucleotídeos do gene mitocondrial ATPase em cada um dos 95 espécimes de *Arapaima gigas*. Essa região está localizada na posição entre 7.731 a 8.790 do mtDNA completo do pirarucu [EF523611.1] (Hrbek et al., 2008). Foi observado um total de nove SNPs (*Single nucleotide polymorphism* – Polimorfismo de base única), constituindo um do tipo *singleton* (Tabela 3). Cinco haplótipos foram observados de forma que o mais frequente (H13) esteve presente em todas as populações analisadas. A população MA foi a que apresentou maior diversidade de haplótipos (N=4), enquanto as demais populações apresentaram dois haplótipos.



A diversidade nucleotídica ( $\pi$ ) dentro das populações variou de 0,00035 (+/- 0,00009) a 0,00243 (+/- 0,00096), sendo a maior na comunidade de Mucurituba (MU). A menor diversidade haplotípica ( $h$ ) foi observada para a comunidade Itapera (MI) e maior foi observada para comunidade de Santa Maria (MA) (Tabela 4). Segundo Excoffier e colaboradores (1992), a diversidade nucleotídica refere-se a uma estimativa corrigida de divergência entre as sequências, enquanto que a diversidade haplotípica é uma medida que considera a frequência e o número de haplótipos entre os indivíduos.

**Tabela 4:** Diversidade genética intra-populacional de estoques de *Arapaima gigas* obtidos a partir do gene mitocondrial ATPase de indivíduos coletados de Comunidades da região de Santarém, PA

PARÂMETROS	COMUNIDADES			
	MA	MU	MI	PI
Nº seqüências	45	8	16	26
Nº sítios polimórficos	9	6	6	1
Diversidade Nucleotídica ( $\pi$ )	0,00149 (+/- 0,00046)	0,00243 (+/- 0,00096)	0,00184 (+/- 0,00071)	0,00035 (+/- 0,00009)
Número de Haplótipos	4	2	2	2
Diversidade Haplotípica ( $h$ )	0,5283 (+/- 0,0673)	0,4286 (+/- 0,1687)	0,3250 (+/- 0,1251)	0,3692 (+/- 0,0911)

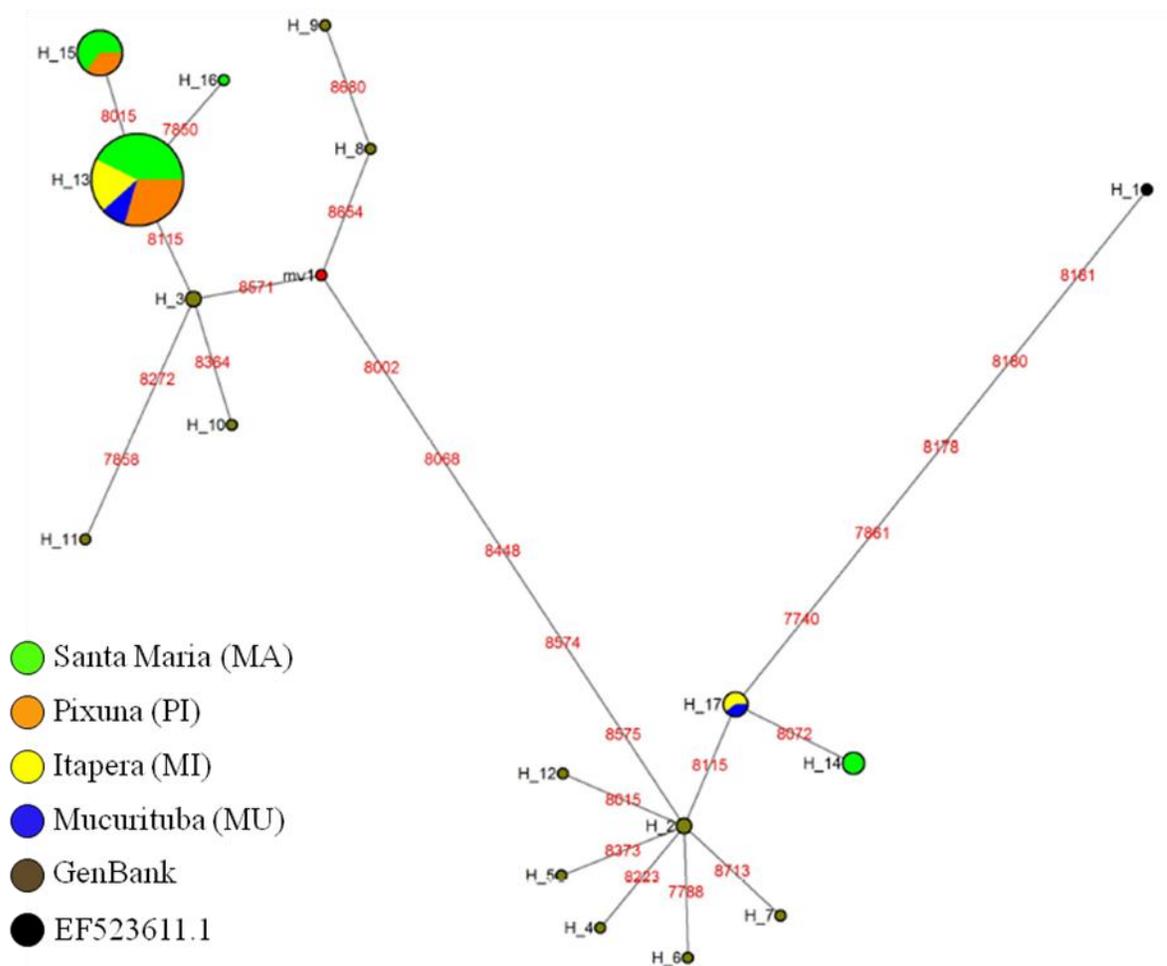
Após quantificar a diversidade genética intra-populacional das populações de pirarucu, foram realizadas comparações entre as sequências obtidas neste trabalho com as sequências disponíveis no GenBank. Um total de 17 haplótipos foram identificados nessa análise (Tabela 5).

**Tabela 5:** Relação de haplótipos (H) identificados para o gene mitocondrial ATPase nas populações de *Arapaima gigas* amostradas neste estudo, comparadas as sequências disponíveis no GenBank, posição das substituições observadas e frequência dos haplótipos nas populações estudadas

	POSIÇÃO mtDNA																								
	7	7	7	7	7	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8			
	7	7	8	8	8	0	0	0	0	1	1	1	1	2	2	3	3	4	5	5	5	6	6	7	
	4	8	5	5	6	0	1	6	7	1	7	8	8	2	7	6	7	4	7	7	7	5	8	1	
	0	8	0	8	1	2	5	8	2	5	8	0	1	3	2	4	3	8	1	4	5	4	0	3	
<b>EF523611.1*</b>	<b>T</b>	<b>T</b>	<b>C</b>	<b>G</b>	<b>T</b>	<b>C</b>	<b>C</b>	<b>C</b>	<b>G</b>	<b>C</b>	<b>C</b>	<b>A</b>	<b>C</b>	<b>C</b>	<b>C</b>	<b>C</b>	<b>C</b>	<b>T</b>	<b>A</b>	<b>G</b>	<b>T</b>	<b>A</b>	<b>C</b>	Hrbek et al. 2008	
H2	C	.	.	.	C	.	.	.	.	T	T	C	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	Hrbek et al. 2005
H3	C	.	.	.	C	T	.	T	.	T	T	C	A	.	.	.	.	T	A	G	A	.	.	.	Hrbek et al. 2005
H4	C	.	.	.	C	.	.	.	.	T	T	C	A	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	Hrbek et al. 2005
H5	C	.	.	.	C	.	.	.	.	T	T	C	A	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	Hrbek et al. 2005
H6	C	C	.	.	C	.	.	.	.	T	T	C	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	Hrbek et al. 2005
H7	C	.	.	.	C	.	.	.	.	T	T	C	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	Hrbek et al. 2005
H8	C	.	.	.	C	T	.	T	.	T	T	C	A	.	.	.	.	T	.	G	A	C	.	.	Hrbek et al. 2005
H9	C	.	.	.	C	T	.	T	.	T	T	C	A	.	.	.	.	T	.	G	A	C	G	.	Hrbek et al. 2005
H10	C	.	.	.	C	T	.	T	.	T	T	C	A	.	.	A	.	T	A	G	A	.	.	.	Hrbek et al. 2005
H11	C	.	.	A	C	T	.	T	.	T	T	C	A	.	T	.	.	T	A	G	A	.	.	.	Hrbek et al. 2005
H12	C	.	.	.	C	.	T	.	.	T	T	C	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	Hrbek et al. 2005
H13	C	.	.	.	C	T	.	T	.	.	T	C	A	.	.	.	.	T	A	G	A	.	.	.	Presente estudo
H14	C	.	.	.	C	.	.	.	A	.	T	C	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	Presente estudo
H15	C	.	.	.	C	T	T	T	.	.	T	C	A	.	.	.	.	T	A	G	A	.	.	.	Presente estudo
H16	C	.	T	.	C	T	.	T	.	.	T	C	A	.	.	.	.	T	A	G	A	.	.	.	Presente estudo
H17	C	.	.	.	C	.	.	.	.	.	T	C	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	Presente estudo

A rede haplotípica gerada para ATPase destaca dois haplogrupos principais (Figura 3). O Haplogrupo que apresentou mais sequências do presente estudo foi o representado pelo haplótipo 13 (H13). Dos oito haplótipos identificados para este haplogrupo, cinco são referentes ao trabalho de Hrbek e colaboradores (2005). É importante notar que o presente trabalho não apresentou nenhum haplótipo em comum em relação às sequências disponíveis no GenBank (Tabela 5). O haplótipo 15 possui uma variação na posição 8.015 presente apenas em amostras coletadas em Santa Maria e Pixuna, e o haplótipo 16 possui apenas indivíduos da região de Santa Maria.

O segundo haplogrupo, representado principalmente pelo Haplótipo 17 (H17) apresentou nove haplótipos, de forma que apenas dois foram identificados nas populações deste estudo. O haplótipo mais distante é representado pela sequência contida no DNA mitocondrial completo H1 (Hrbek et al., 2008) e seis referem-se a ATPase sequenciada por Hrbek e colaboradores (2005). Estas últimas apresentaram um claro padrão de estrela que por sua vez se conectou com o H17 deste estudo, e apresentou apenas um nucleotídeo de diferença. O haplótipo 14 foi encontrado apenas em amostras da região de Santa Maria e o H17 foi encontrado apenas em indivíduos de Itapera e Mucurituba. É possível notar que o haplótipo 1, referente a parte da sequência do mtDNA completo, se distanciou por pelo menos cinco substituições do restante dos haplótipos deste haplogrupo, inclusive dos haplótipos gerados por outro trabalho do mesmo autor (Hrbek et al., 2005).



**Figura 3:** Rede *Median-Joining* (MJ) construída a partir das sequências da ATPase das populações de *Arapaima gigas* amostradas em Santarém – PA e da sequência disponível no GenBank [EF523611.1]. Os círculos representam os haplótipos identificados e possuem tamanho proporcional a sua frequência e os números em vermelho representam a posição da substituição que diferencia cada haplótipo. O círculo em vermelho representa um vetor médio gerado na análise.

A Análise de Variância Molecular mostrou que 5,49% ( $p < 0,06354$ ) de toda variação observada foi em razão de diferenças entre as populações estudadas. A matriz de  $F_{st}$ , gerada para comparar as populações aos pares, mostrou uma maior diferenciação genética entre Itapera (MI) e Pixuna (PI) e Mucurituba (MU) e Pixuna (PI) (Tabela 6).

**Tabela 6:** Valores de Fst entre pares de populações de *Arapaima gigas*.

MATRIZ DE Fst – ATPase				
	Santa Maria (MA)	Itapera (MI)	Mucurituba (MU)	Pixuna (PI)
Santa Maria (MA)	0,000			
Itapera (MI)	0,032	0,000		
Mucurituba (MU)	0,053	0,000	0,000	
Pixuna (PI)	0,018	0,183*	0,296*	0,000

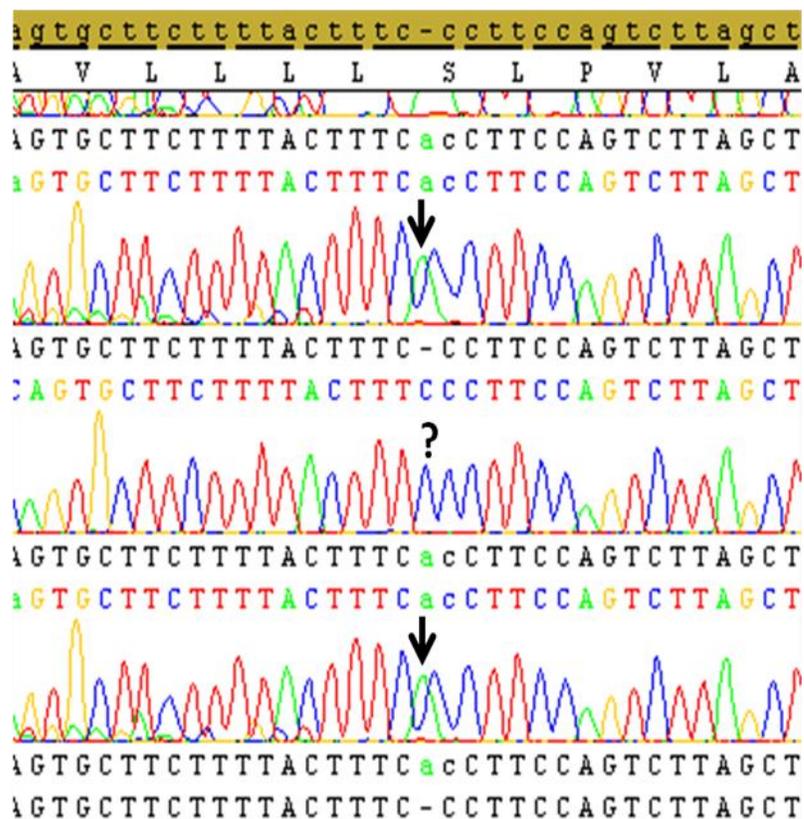
\* Valores significativos ( $P < 0,05$ )

### 3.4 Citocromo Oxidase

Noventa e nove indivíduos foram analisados, dos quais apenas dois foram descartados (MA02 e PI17) por não apresentarem resultados satisfatórios no sequenciamento, mesmo após a execução de replicatas. O tamanho do fragmento gerado a partir da amplificação com o primer para essa região foi de 1.148 pares de bases. Sua posição quando alinhada ao mtDNA completo (Hrbek et al., 2008) vai da base de 5.802 a 6.949. Apenas uma sequência adicional foi obtida no GenBank para posterior comparação [FJ418765.1] (Ardura et al., 2010). Foram identificados sete SNPs, sendo um singleton, ou seja, apenas um indivíduo apresentava polimorfismo, os demais SNPs foram do tipo transição e a partir destes foram identificados 07 haplótipos (Tabela 7). Uma inserção foi observada em 17 indivíduos na posição 6.067 (Figura 4), e não foi considerado nas análises de diversidade intra e inter-populacional.

**Tabela 7:** Relação de haplótipos (H) identificados para o gene mitocondrial Citocromo oxidase em populações de *Arapaima gigas* amostradas neste estudo, posição das substituições observadas e frequência dos haplótipos nas populações estudadas

HAPLOTIPO	POSIÇÃO mtDNA							FREQUENCIA DOS HAPLÓTIPOS NOS LOCAIS AMOSTRADOS				
	5865	6153	6195	6300	6378	6642	6690	MA	MI	MU	PI	Total
<b>EF523611.1</b>	<b>T</b>	<b>T</b>	<b>C</b>	<b>G</b>	<b>T</b>	<b>C</b>	<b>C</b>					
H02	.	.	.	.	.	.	.	20	12	4	16	53
H03	C	C	.	A	.	.	.	4	4	2	.	10
H04	.	.	.	.	C	.	.	12	.	.	6	18
H05	.	.	T	.	.	.	.	10	.	.	3	13
H06	.	.	.	.	.	.	T	.	1	.	.	1
H07	.	.	.	.	.	T	.	.	.	3	.	3



**Figura 4:** Inserção identificada na região Citocromo oxidase no mtDNA de *Arapaima gigas*.

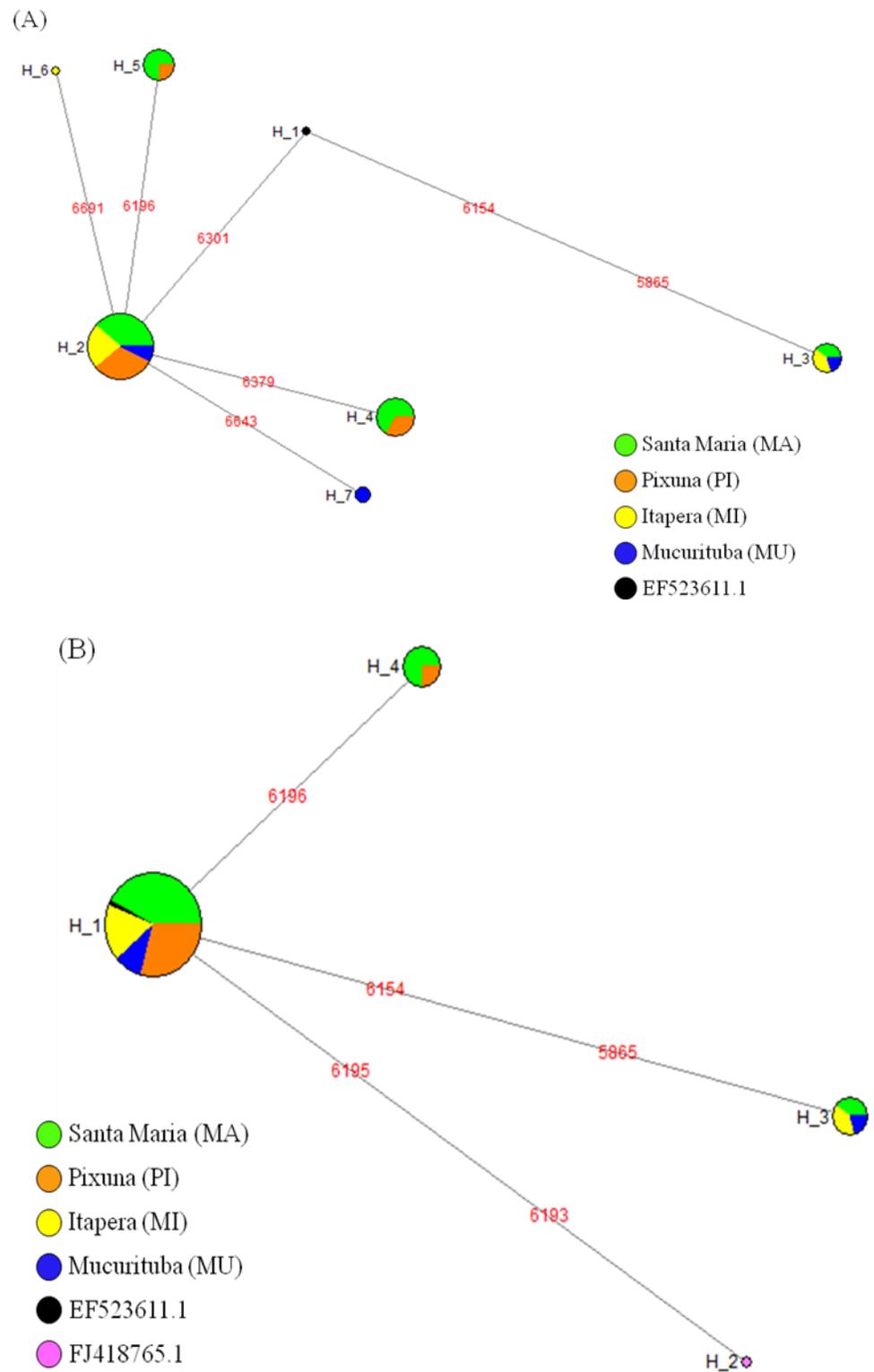
O valor da diversidade nucleotídica da região COI, variou de 0,00052 (+/- 0,00011) a 0,00145 (+/- 0,00042). Quando comparado à sequência referência, esse valor foi também menor do que 1% o que reafirma a correta classificação taxonômica de todas as amostras deste estudo. A diversidade haplotípica variou de 0,4706 (+/-0,1177) a 0,7222 (+/- 0,0967), a comunidade com menor valor foi Itapera (MI). Santa Maria (MA), Mucurituba (MU) e Pixuna (PI) tiveram a diversidade haplotípica moderada, ou seja, acima de 0,5 (Tabela 8).

**Tabela 8:** Diversidade genética intrapopulacional de estoques de *Arapaima gigas* obtidos a partir do gene mitocondrial COI de indivíduos coletados de comunidades da região de Santarém - PA

PARÂMETROS	COMUNIDADES			
	MA	MU	MI	PI
Nº seqüência	46	9	17	25
Nº sítio polimórfico	5	4	4	2
Diversidade Nucleotídica ( $\pi$ )	0,00107 (+/- 0,00017)	0,00145 (+/- 0,00042)	0,00110 (+/- 0,00030)	0,00052 (+/- 0,00011)
Número de haplótipos	4	3	3	3
Diversidade Haplotípica ( $h$ )	0,7034 (+/- 0,0369)	0,7222 (+/- 0,0967)	0,4706 (+/- 0,1177)	0,5400 (+/- 0,0886)

Para realizar a análise de Rede de haplótipos, além da sequência referência do genoma mitocondrial (EF523611) foi considerada também a sequência do GenBank obtida por Ardura et al. (2010) (Figura 5). Para tal comparação foi necessária uma redução no tamanho do fragmento para permitir o perfeito alinhamento entre as sequências. A redução foi de 753 pares de base, o que resultou em um fragmento com apenas 394 pares de bases. Também foi necessário reduzir a sequência de Ardura e colaboradores (2010), no sentido 5' – 3', perdendo 267 pares de base. Com a adição desta sequência foi observado uma diminuição no número de SNPs para seis, um aumento do número de substituições do tipo singleton e uma diminuição no número de haplótipos (Tabela 9)

As duas redes de haplótipos obtidas apresentaram um padrão de estrela simples, não evidenciando, aparentemente, a formação de haplogrupos distintos como nas análises com a ATPase (Figura 5). Desta forma os haplótipos mais distantes (duas substituições) foram H3 (Figura 5A) e o próprio H3 e H2 (Ardura et al., 2010) (Figura 5B). Ainda é importante destacar na Figura 5B que a sequência de Hrbek e colaboradores (2007) ficou agrupada juntamente as amostras deste estudo (H1), enquanto a sequência do Citocromo oxidase obtida por Ardura e colaboradores (2010) manteve-se isolada (Figura 5B).



**Figura 5:** Rede *Median-Joining* (MJ) construída a partir das sequências da COI das populações de *Arapaima gigas* amostradas em Santarém –

PA e da sequência disponível no GenBank [EF523611.1]. Os círculos representam os haplótipos identificados e possuem tamanho proporcional a sua frequência e os números em vermelho representam a posição da substituição que diferencia cada haplótipo. O círculo em vermelho representa um vetor médio gerado na análise. (A) Somente a sequência referência e (B) adição da sequência [FJ418765.1].

**Tabela 9:** Relação de haplótipos identificados para o gene mitocondrial Citocromo oxidase em populações de *Arapaima gigas* amostradas neste estudo quando comparadas as sequências disponíveis no GenBank.

Haplótipos	POSIÇÃO mtDNA					Referência
	5865	6154	6193	6195	6196	
H1	T	T	A	A	C	Presente estudo/ Hrbek et al., 2007
H2	.	.	C	C	.	Ardura et al., 2010
H3	C	C	.	.	.	Presente estudo
H4	.	.	.	.	T	Presente estudo

Os dados gerados pela AMOVA, somente com as sequências utilizadas neste trabalho, mostraram uma variação de 8,66 ( $P < 0,00293$ ) entre as populações. A matriz de  $F_{st}$  mostrou uma maior diferenciação genética entre Santa Maria e Itapera, Santa Maria e Mucurituba, Itapera e Pixuna e também entre Mucurituba e Pixuna (Tabela 10).

**Tabela 10:** Valores de Fst entre pares de populações de *Arapaima gigas*

MATRIZ DE Fst – CITOCROMO OXIDASE I				
	Santa Maria (MA)	Itapera (MI)	Mucurituba (MU)	Pixuna (PI)
Santa Maria (MA)	0,000			
Itapera (MI)	0,098*	0,000		
Mucurituba (MU)	0,131*	0,000	0,000	
Pixuna (PI)	0,001	0,186*	0,234*	0,000

\* Valores significativos ( $P < 0,05$ )

### 3.5 Citocromo Oxidase + ATPase

A última estrutura de análise foi formada com a análise conjunta dos dois fragmentos sequenciados. A concatenação gerou um fragmento de 2.207 pares de bases. Foram identificados 16 tipos de mutações, na qual 15 eram transições e uma transversão. Dentre as 95 sequências de *A. gigas*, foi observado um total de 16 SNPs (constituindo dois singleton) e oito haplótipos (Tabela 11). A única sequência disponível no GenBank que foi utilizada foi o genoma mitocondrial referência da espécie (Hrbek et al., 2008).

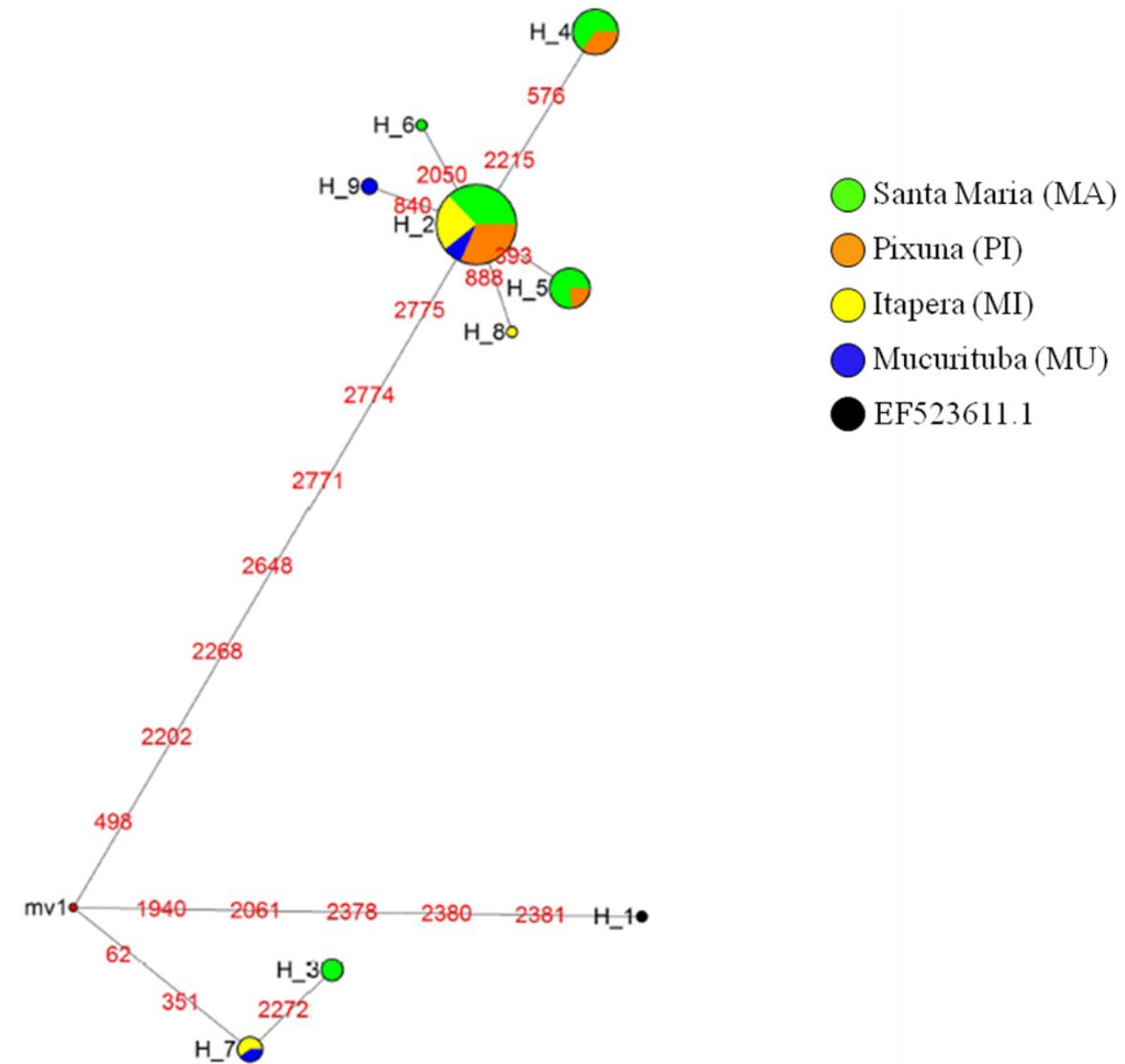


O valor da diversidade nucleotídica dentro das populações para análise da região *COI* + ATPase, variou de 0,00044 (+/- 0,00009) a 0,00194 (+/- 0,00067), e a diversidade haplotípica variou de 0,4250 (+/-0,1326) a 0,7202 (+/- 0,0378), na qual a única comunidade classificada como baixa foi a de Itaperá (MI), enquanto Pixuna (PI), Mucurituba (MU) e Santa Maria (MA) mantiveram-se moderada (Tabela 12).

**Tabela 12:** Diversidade genética intra populacional de estoques de *Arapaima gigas* obtidos a partir da montagem dos genes mitocondrial ATPase + CO1 coletados de comunidades da região de Santarém - PA

PARÂMETROS	COMUNIDADES			
	MA	MU	MI	PI
Nº seqüência	45	8	16	25
Nº sítio polimórfico	14	10	10	3
Diversidade Nucleotídica ( $\pi$ )	0,00127 (+/- 0,00031)	0,00194 (+/- 0,00067)	0,00138 (+/- 0,00051)	0,00044 (+/- 0,00009)
Número de haplótipos	5	3	3	3
Diversidade Haplotípica ( $h$ )	0,7202 (+/- 0,0378)	0,7143 (+/- 0,1227)	0,4250 (+/- 0,1326)	0,5400 (+/- 0,0886)

De forma similar aos resultados obtidos com a sequencia da ATPase, foi possível observar dois haplogrupos na rede haplotípica (Figura 6). O haplótipo referente à sequência do mtDNA completo (H1) manteve-se isolado assim como nas análises separadas de ambas as regiões e ficou mais próximo do haplogrupo formado pelos haplótipos 3 e 7. O haplótipo dois foi observado em indivíduos de todas as populações. No haplogrupo principal, a exceção de Pixuna, todas demais populações apresentaram haplótipos diagnósticos (H6, H8 e H9), que são haplótipos exclusivos de indivíduos de determinado local. Esse padrão não se repetiu no outro haplogrupo, havendo a presença de apenas um haplótipo diagnóstico para a comunidade de Santa Maria (MA) no H3 (Figura 6).



**Figura 6:** Rede *Median-Joining* (MJ) construída a partir da montagem das sequências de CO1 + ATPase das populações de Santarém – PA e da sequência disponível no GenBank [EF523611.1]. Os círculos representam os haplótipos identificados e possuem tamanho proporcional à sua frequência e os números em vermelho representam a posição da substituição que diferencia cada haplótipo. O círculo vermelho representa um vetor médio gerado na análise.

Os dados gerados pela AMOVA, somente com as sequências utilizadas neste trabalho, mostraram uma variação de 5,95 ( $P < 0,03030$ ) entre as populações. A matriz de  $F_{st}$  mostrou uma maior diferenciação genética entre Itapera e Pixuna e Mucurituba e Pixuna (Tabela 13).

**Tabela 13:** Valores de Fst entre pares de populações de *Arapaima gigas*

<b>MATRIZ DE Fst – CITOCROMO OXIDASE I + ATPase</b>				
	Santa Maria (MA)	Itapera (MI)	Mucurituba (MU)	Pixuna (PI)
Santa Maria (MA)	0,000			
Itapera (MI)	0,048	0,000		
Mucurituba (MU)	0,077	0,000	0,000	
Pixuna (PI)	0,010	0,168*	0,261*	0,000

\* Valores significativos ( $P < 0,05$ )

#### 4. DISCUSSÃO

O pirarucu faz parte da dieta tradicional dos ribeirinhos Amazônicos e vem sofrendo um processo de sobrexploração nas últimas décadas. Consequentemente, essa espécie tem se tornado escassa em algumas regiões, e segundo Goulding (1979) parece ter sido extinta em algumas áreas de seu habitat natural. Com base na condição demográfica atual deste peixe, a realização de um manejo adequado, sem desconsiderar a manutenção da atividade sócio-econômica da população dessa região, visando a conservação é necessária para preservação da espécie.

Para se obter um bom manejo é necessário conhecimento prévio sobre a fisiologia, ecologia e comportamento de uma dada espécie, pois torna-se possível a administração de processos conservacionistas (Danzmann et al., 1991). Como exemplo, referente ao pirarucu, pode-se ressaltar a Reserva de Desenvolvimento Sustentável de Mamirauá, em que a comunidade local e científica atuam juntas a fim de contribuir com a preservação da espécie e ao mesmo tempo usá-la para fins comerciais. Os lagos dessa região são monitorados, a pesca é feita de forma rotacional e a contagem de peixes é feita a fim de se obter estimativas das quantidades de peixes passíveis de serem comercializados após o período de defeso (Queiroz & Crampton, 1999, Castello, 2004, Viana et al., 2007 e Castello & Stewart, 2010).

Recentemente, vários estudos filogenéticos (Hrbek et al., 2005, Ribeiro, 2006, Frederico, 2006, Hrbek et al., 2008, Leão, 2009, Mendonça, 2010) que podem ser usados como suporte aos planos de conservação, vem sendo realizados no Brasil, contudo ainda há uma grande lacuna de informações para elaboração de programas de conservação e manejo dessa espécie abrangendo grande parte da região Amazônica. Desta forma, o presente estudo, apesar de geograficamente restrito, permitiu sugerir que para uma espécie de baixa estruturação filogeográfica (*Arapaima gigas*), a realização de uma amostragem maior em apenas um local é suficiente para identificar praticamente todas as principais fontes de variabilidade genética existentes da espécie dentro de uma mesma Bacia hidrográfica. Com isso, essa hipótese pode auxiliar e acelerar a elaboração de planos de conservação, focando na região de estudo/risco.

É possível observar que os resultados obtidos por esse trabalho estão alinhados com os relatos disponíveis na literatura que demonstram um baixo nível de estruturação

populacional da espécie, e que foram realizados com uma amostragem geográfica mais ampla (Hrbek et al., 2005, Hrbek et al., 2007, Leão, 2009). O padrão de baixa estruturação populacional observada pode ser consequência da longa sobrexploração sofrida pelo pirarucu, associada ao padrão de migrações curtas realizadas pela espécie (Hrbek et al., 2005, Isaac et al., 1993).

O trabalho de Hrbek e colaboradores (2005) mostra uma variabilidade genética mais elevada entre populações em áreas distantes aos grandes centros urbanos, em regiões onde a caça predatória é menor, e na reserva sustentável de Mamirauá. Além deste autor, Leão (2009) utilizou 11 marcadores microsatélites para estimar níveis de variabilidade genética de 436 amostras de pirarucu divididas em 18 localidades da Bacia Amazônica e duas da Bacia Araguaia-Tocantins. Como resultado, o autor observou uma maior variabilidade genética em populações nos rios da calha principal da Bacia Amazônica se comparados aos rios tributários da mesma.

A alta variabilidade genética é um fator que contribui para a preservação de qualquer espécie, enquanto espécies com baixa variabilidade genética dependem de estudos aprofundados sobre suas populações para melhor adequar seu manejo e normas de conservação. Portanto, a diversidade genética pode ser considerada um requisito básico para manutenção de uma espécie em ambiente natural, sem interferência humana (Primack & Rodrigues, 2001).

Os resultados obtidos mostram uma moderada diferenciação genética dentro das populações amostradas. Segundo Wright (1978), valores de  $F_{st}$  entre 0 e 5%, 5 e 15%, 15 e 25%, e maiores que 25% são indicativos de diferenciação genética baixa, moderada, alta e elevada, respectivamente. As estimativas de  $F_{st}$  obtidas foram de 5,5% (ATPase), 8,7% (Citocromo Oxidase) e 5,9% (Citocromo oxidase + ATPase). Estes resultados indicam uma moderada diferenciação genética entre as populações, assim como reportado no trabalho de Hrbek et al. (2005).

Leão (2009) sugere que na calha principal do rio Amazonas, mesmo perto dos grandes centros urbanos onde a pesca é mais intensa, a diversidade genética observada nas espécies de peixes nativas é maior em relação aos rios tributários. Ele afirma que isso ocorre devido ao fato da calha atuar como uma área de encontro entre indivíduos de diferentes áreas, devido ao processo cíclico de cheias que ocorre na região, facilitando assim o deslocamento dos indivíduos. Esse padrão pode ser observado em estudos com outras espécies de peixe da Amazônia. Santos et al. (2007) utilizou a região controle do mtDNA de tambaqui (*Colossoma*

*macropomum*) para avaliar amostras obtidas em cinco regiões distintas da calha principal do rio Amazonas, encontrando níveis altos de variabilidade genética e diversidade haplotípica. Um estudo conduzido por Machado (2009) com curimatã (*Prochilodus nigricans*), por meio de análise da região controle do mtDNA, revelou elevados índices de variabilidade genética tanto na calha principal do Rio Amazonas quanto em seus tributários.

Diante das informações expostas acima, é possível notar uma baixa estrutura populacional, no entanto, a diversidade genética para essas populações de pirarucu na região de Santarém é relativamente alta. Uma possível explicação para o observado, é a de que, apesar de ser considerado um peixe sedentário incapaz de realizar grandes migrações, essa espécie é favorecida pela época das cheias, que possibilita o fluxo gênico com espécimes de localidades próximas. Os resultados obtidos com a análise de rede de haplótipos reforçam essa hipótese, e é possível observar nos resultados das análises das duas regiões do mtDNA que há haplótipos isolados para regiões mais próximas. O haplótipo 15 da ATPase nas regiões Pixuna (PI) e Santa Maria (MA) e o haplótipo 17 nas regiões Mucurituba (MU) e Itapera (MI). No caso da citocromo oxidase, é possível encontrar dois haplótipos isolados para MA e PI (H5 e H4, respectivamente).

Os resultados obtidos não diferem dos resultados apresentados por Hrbek et al. (2005) e Leão (2009), no entanto, ambos os trabalhos tiveram um tamanho amostral menor, em um número mais elevado de localidades mais dispersas geograficamente. Ao contrário desses dois autores, esse trabalho mostrou que apesar de centralizar a amostragem em apenas uma região, um número maior de amostras pode gerar os mesmos resultados. Hrbek e colaboradores (2005), que realizaram um estudo com regiões do mtDNA onde uma condiz com a do presente estudo, a região da ATPase. Em seu trabalho foi encontrado dois haplogrupos para todas as populações de várias regiões da Bacia Amazônica, ele afirma ser a dinâmica populacional mais importante apesar de não haver nenhuma distância significativa entre distância geográfica e diferenciação genética. Para a mesma região o presente estudo também encontrou dois haplogrupos.

Para a região citocromo oxidase I, o trabalho na qual disponibilizou a sequência referência é o de Ardura e colaboradores (2010), embora o autor tenha direcionado suas análises para solucionar fraudes em mercados, usando a técnica de “barcode”, os resultados mostraram que a espécie estudada condizia com a nossa, comprovando o fato de que nossos animais são todos da mesma espécie. Os resultados apresentados para essa região

são condizente com os dados apresentados para a região da ATPase, na qual a variabilidade genética é moderada, apresentando um valor para  $F_{st}$  igual a 0,08664.

A associação de sequências contidas no GenBank serviu como ferramenta de comparação entre os trabalhos. Para ATPase, apesar das sequências disponíveis não serem somente de indivíduos de Santarém, foi possível estabelecer os mesmo parâmetros abordados por Hrbek et al. 2005. No entanto, para a região Citocromo oxidase I, foi necessária a redução de ambas as sequências, tanto a do presente trabalho quanto a disponível no GenBank, para melhor alinhamento, com isso foi possível confirmar que cada espécime estudado estava ligado a espécie *Arapaima gigas*.

De acordo com Reed & Frankham (2003), pode-se dizer que a diversidade genética está intimamente ligada à evolução, permitindo melhores adaptações em decorrência às mudanças pela qual são expostas. Quando há uma diminuição na diversidade genética de uma população, com o passar dos anos esta pode se tornar suscetível à extinção devido a fatores inevitáveis, como o endocruzamento, perda de heterozigosidade ou baixíssimos níveis de variação genética na qual a espécie não se torna capaz em responder à pressão seletiva (Flagstad et al., 2003, Randi et al., 2003). No entanto, um manejo adequado e um controle eficaz da exploração pesqueira da espécie podem favorecer bons resultados no que concerne à manutenção da variabilidade genética, principalmente quando há a possibilidade de focar regiões realmente necessitadas de um manejo adequado para recuperar a variabilidade da espécie local.

## 5. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos, quando comparados a outros trabalhos com amostragem de maior abrangência geográfica e menor número de amostras por localidade, não apresenta diferenças. Essas observações não descartam a hipótese de que é possível obter-se estimativas confiáveis da estrutura genética de determinada espécie com uma amostragem maior de um número reduzido de regiões geográficas.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARDURA, A., LINDE, A.R., MOREIRA, J.C., GARCIA-VARQUEZ, E. (2010). DNA barcoding for conservation and management of Amazonian commercial fish. **Biological Conservation**, v. 143, p. 1438-1443.
- AVISE, J. C., GIBLIN-DAVIDSON, C., LAERM, J., PATTON, J. C., LANSMAN, R. A. (1979). Mitochondrial DNA clones and matriarchal phylogeny within and among geographic populations of the pocket gopher, *Geomys pinetis*. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 76, p. 6694 – 6698.
- AVISE, J.C. (2000) **Phylogeography: The History and Formation of Species**. Harvard University Press, Cambridge, MA.
- BANDELT, H. J., FORSTER, P., ROHL, A. (1999). Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. **Molecular Biology and Evolution**, v.16:37-48.
- BROWN, W. M., M. GEORGE, JR., and A. C. WILSON. (1979). Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 76, p. 1967- 1971.
- CAMARGO, S.A.F., CAMARGO, T.R.L. (2010). **O manejo da pesca do Pirarucu *Arapaima gigas* na fronteira Peru, Brasil e Colômbia**. Encontro Nacional do CONPEDI, Fortaleza – CE.
- CARVALHO-COSTA, L. F., PIORSKI, N. M., OROTÍ, G., GALETTI JR., P. M. (2009) . **Análise da estrutura genética e demografia histórica em populações do bagre de água doce *Pseudoplatystoma cf punctifer* (Teleostei: Pimelodidae) de dois rios do Estado do Maranhão**. In: VI Congresso de Meio Ambiente da AUGM, São Carlos.
- CASTELLO, L. (2004). Method to Count Pirarucu *Arapaima gigas*: Fishers, Assessment, and Management. **North American Journal of Fisheries Management**, v.24, p.379–389.

CASTELLO, L., STEWART, D. J. (2010). Assessing CITES non-detriment finding procedures for Arapaima in Brazil. **Journal of Applied Ichthyology**, v. 26(1), p. 49-56.

COSTA, L. F. C. (2010). **Estudo de sistemática molecular e de biogeografia histórica do bagre de água doce *Pseudoplatystoma Bleeker, 1862 (Pimelodidae)* na América do Sul.** Tese de doutorado. Pós-graduação em ecologia e recursos naturais. Universidade Federal de São Carlos.

DANZMANN, R. G., IHSSSEN, P. E., HERBERT, P. D. N. (1991). Genetic discrimination of wild and hatchery populations of brook char, *Salvelinus fontinalis* (Mitchill), in Ontario using mitochondrial DNA analysis. **Journal of Fish Biology**, v. 39 (A), p. 69 – 77.

EIZIRIK, E. (1996). **Ecologia Molecular, genética da conservação e conceito de Unidades Evolutivamente Significativa.**

EXCOFFIER, L., SMOUSE P. E., QUATTRO, J. M. (1992). Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: Application to human mitochondrial DNA restriction data. **Genetics**, v. 131, p. 479-491.

EXCOFFIER, L., LISHER, H. E. L., (2010). Arlequin suite ver. 3.5: A nex series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. **Molecular Ecology Resources**, v. 10, p. 564 – 567.

FERGUSON, A., TAGGART, J.B., PRODHOL, A., McMELL, O., THOMPSON, C., STONE, C., MCGINNITY, P., HYNES, R.A. (1995). The application of molecular markers to the study and conservation of fish population with special reference to *Salmo*. **J Fish Biol**, v.47, suppl.A, p.103-126.

FERREIRA, R.C.P., NUNES, D.M., VOGLEY, F., SOARES, M. C., CASTILHO, P.C. (2010). **Temperatura estomacal do Pirarucu (*Arapaima gigas*, Cuvier, 1829) durante a digestão de diferentes itens alimentares.** X Jornada de Ensino Pesquisa e Extensão – JEPEX/UFRPE, Recife.

FLAGSTAD, T.; WALKER, C.W.; VILÀ, C.; SUNDQVIST, A. K.; FERNHOLM. B.; HUFTHAMMER A. K.; WIIG, T.; KOYOLA, I.; ELLEGREN, H. (2003). Two centuries of the Scandinavian wolf population: patterns of genetic variability and migration during an era of dramatic decline. **Molecular Ecology**, v. 12, p. 869-880.

FREDERICO, R. G. (2006). **Filogeografia e conservação de *Paratrygon aiereba* Dumail (Chondrichthyes: Polamotry gonidae) na região Amazônica**. Dissertação de mestrado. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – Universidade Federal do Amazonas.

GOULDING, M. (1979). **A ecologia da pesca no rio Madeira**. CNPq/INPA. Manaus. 172p.

HARRISON, R.G. (1989). Animal mitochondrial DNA as a genetic marker in population and evolutionary biology. **Trends in Ecology and Evolution**, v. 4, p. 6 – 11.

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

HRBEK, T., CROSSA, M., FARIAS, I. P. (2007). Conservation Strategies for *Arapaima gigas* (Schinz, 1822) and the Amazonian várzea Ecosystem.

HRBEK, T., FARIAS, I. P. (2008). The complete mitochondrial genome of the pirarucu (*Arapaima gigas*, Arapaimidae, Osteoglossiformes). **Genetics and Molecular Biology**, v. 31:1, p. 293-302.

ISAAC V. J., ROCHA V. L. C., MOTA S. A. (1993). **Considerações sobre a legislação da “piracema” e outras restrições da pesca da região do Médio Amazonas**. Pp.188-211. In: Furtado, L., Leitão, W., Melo, F. (Eds.). Povos das águas: realidade e perspectiva na Amazônia. Belém: MPEG; UFPA. 292p.

KUMAR, S., NEI, M., DUDLEY, J., TAMURA, K. (2008). MEGA: A biologist-centric software for evolutionary analysis of DNA and protein sequences. **Brief. Bioinform.**, v. 9(4), p. 299-306.

LEÃO, A. S. A. (2009). **Análise da variabilidade genética das populações de pirarucu (*Arapaima gigas*, SCHINZ, 1822) dos principais tributários do rio Amazonas através do uso de marcadores microssatélites.** Dissertação de mestrado INPA/UFAM, Manaus.

MACHADO, V. N. (2009). **Análise da variabilidade genética do curimatã *Prochilodus nigricans* (Agassiz, 1829) na calha do rio Amazonas e seus principais tributários.** Mestrado, UFAM, Manaus.

MARQUES, D.K.S. (2003). **Caracterização genética do pirarucu *Arapaima gigas* (Cuvier) (Teleostei, Osteoglossidae) da Bacia Tocantins-Araguaia,** Estado do Mato Grosso.

MARTINS, C., WASKO, A. P., OLIVEIRA, C., FORESTI, F. (2003). Mitochondrial DNA variation in wild populations of *Leporinus elongatus* from the Paraná River Basin. **Genetic and molecular biology.** V. 26: 1, p. 33-38.

MENDONÇA, F. F. (2010). **Filogeografia do gênero *Rhizoprionodon* (Elasmobranchii, Carcharhiniformes) no Atlântico Ocidental utilizando marcadores moleculares do DNA mitocondrial.** Instituto de Biociências de Botucatu. Universidade Estadual Paulista.

MILLER, S.A., DYKES, D.D., POLESKY, H.F (1988). A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. **Nucleic Acids Research,** v.16, p.1215.

PRIMACK, R.B. & RODRIGUES, E. (2001). *Biologia da Conservação.* Londrina, E. Rodrigues, 328p.

QUEIROZ, H. L., CRAMPTON, W. G. R. (1999). **Estratégias para o manejo de recursos pesqueiros de Mamirauá.** In QUEIROZ, H.K.; CRAMPTON, W.G.R. Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico. Sociedade Civil de Mairimurá. Tefe, Brasil, p. 108-141.

QUENOUILLE, B., BERMINGHAM, E., PLANES, S. (2004). Molecular systematics of the damselfishes (Teleostei : Pomacentridae): Bayesian phylogenetic analyses of mitochondrial and nuclear DNA sequences. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v.31 (1), p. 66–88.

RANDI, E.; DAVOLI, F.; PIERPAOLI, M.; PERTOLDI, C.; MADSEN, A.B.; LOESCHCKE, V. (2003). Genetic structure in otter (*Lutra lutra*) populations in Europe: implications for conservation. **Animal Conservation**, v. 6, p. 93-100.

REED, D.H.; FRANKHAM, R. (2003). Correlation between fitness and genetic diversity. **Conservation Biology**, v.17, p. 230-237.

RIBEIRO, J. (2006). **Filogeografia de *Mimagoniates microlepis* (Teleostei, Characidae, Glandulocaudinae) de riachos da planície costeira e do primeiro planalto paranaense, baseada em marcadores moleculares RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*)**. Dissertação de mestrado. Pós-graduação em Ciências Biológicas, Zoologia, Setor de Ciências Biológicas. Universidade Federal do Paraná.

ROSA, R. S., LIMA, F. C. T. (2010). Livro vermelho da fauna brasileira ameaçada de extinção: os peixes brasileiros ameaçados de extinção, p. 13.

ROZAS, J., SÁNCHEZ-DELBARRIO, J. C., MESSEGUER, X. ROZAS, R. (2003) DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. **Bioinformatics**, v.19, p.2496–2497.

SANTOS, M. C. F.; RUFFINO, M. L.; FARIAS, I. P. (2007). High levels of genetic variability panmixia of the Tambaqui *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1816) in main channel of the Amazon River. **Journal of Fish Biology**, v.71(A), p.33-44.

VIANA, J. P., CASTELLO, L., DAMASCENO, J. M. B., AMARAL, E. S. R., ESTUPIÑÁN, G. M. B., ARANTES, C., BATISTA, G. S., GARCEZ, D. S., BARBOSA, S. (2007). **Manejo comunitário do pirarucu *Arapaima gigas* na reserva de desenvolvimento sustentável de Mamirauá Amazonas, Brasil**.

**WRIGHT, S. (1978). Evolution and the Genetics of Population, Variability Within and Among Natural Populations.** The University of Chicago Press, Chicago.