

**SAMUEL REZENDE PAIVA**

**INFLUÊNCIA DE OBSTÁCULOS NATURAIS NA DIVERGÊNCIA DE  
POPULAÇÕES DE *Astyanax bimaculatus* NA BACIA DO RIO DOCE-MG**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, para obtenção do título de “Magister Scientiae”.

VIÇOSA  
MINAS GERAIS - BRASIL  
2001

**SAMUEL REZENDE PAIVA**

**INFLUÊNCIA DE OBSTÁCULOS NATURAIS NA DIVERGÊNCIA DE  
POPULAÇÕES DE *Astyanax bimaculatus* NA BACIA DO RIO DOCE-MG**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, para obtenção do título de “Magister Scientiae”.

APROVADA: 13 de agosto de 2001.

---

Prof<sup>ª</sup>. Simone Eliza F. Guimarães  
(Conselheira)

---

Prof. Sérgio H. Brommonschenkel  
(Conselheiro)

---

Prof. Alexandre W.S. Hilsdorf

---

Prof<sup>ª</sup>. Ana Lúcia Salaro

---

Prof. Jorge A. Dergam dos Santos  
(Orientador)

*Aos meus pais Márcia e Arnaldo  
Por acreditarem em mim e por todo o amor!*

## **AGRADECIMENTOS**

À Universidade Federal de Viçosa, pela oportunidade de realização deste curso.

À Coordenação de Aperfeiçoamento do Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa de estudos a mim concedida.

À Companhia Força e Luz Cataguases Leopoldina pelo apoio e financiamento das coletas no rio Matipó.

Ao professor, ou melhor, ao meu grande amigo Jorge Abdala Dergam dos Santos, pela confiança, pelo incentivo, e pela orientação.

À professora Simone Eliza Facioni Guimarães pelo incentivo, pelas valiosas sugestões e pela grande confiança durante todo o trabalho.

Ao professor Sérgio Hermínio Brommonschenkel, por aceitar ser meu conselheiro e pela compreensão.

Ao professores Alexandre Wagner Silva Hilsdorf e Ana Lúcia Salaro por terem aceitado participar da banca examinadora.

Ao pessoal do Museu de Zoologia “João Moojen de Oliveira”. Em especial ao Zé Lélis pela amizade, confiança e grande ajuda nas coletas; ao Zé Braz pela amizade, entretenimento e ajuda na limpeza das tralhas de coleta; e ao professor Renato Feio, pela grande amizade, confiança e apoio em todas as horas.

Ao Laboratório de Biologia Molecular de Insetos, nas pessoas do professor Lúcio Campos e Vander pelos empréstimos de *primers* RAPD.

Aos meus amigos Pablo (Hermano), Márcio (Batman) e Vander (Bobó) por tudo...convivência, paciência, brigas, alegrias e tristezas.

À Virgínia, pela grande amizade, apoio e pelos inesquecíveis anos que passamos juntos.

À bióloga Flávia, pela amizade, ajuda nas coletas e na análise morfológica dos lambaris.

A Danielle, pelo amor, carinho, confiança, apoio e por ter aparecido e continuar fazendo parte da minha vida.

Aos amigos do Laboratório de Biotecnologia Animal: Jane (Chapeuzinho), Carlos (Marginal), Amauri (Réptil), Carla, Frederico (Juninho), Kleibe (Kleidy), Marciane, Viviane, Luciana, Alex, Guilherme (Zangado) e Fausto. Pelos extraordinários momentos de vivência, amizade e festas.

Aos amigos do curso de Genética e Melhoramento: Ana Paula (Inhame), Eduardo (Homim), Gisele, João e André pelas excelentes e impagáveis horas de estudo e pela amizade.

Ao Aldrin (avp) pela grande amizade e essenciais auxílios nas análises estatísticas dos dados morfológicos.

Ao Ricardo e Alexandre (Bodão), pela amizade e pelas imprescindíveis aulas de *Starcraft*.

A toda Nação Rubro-Negra que, direta ou indiretamente, contribuiu para a realização deste trabalho e desta mala!

## BIOGRAFIA

SAMUEL REZENDE PAIVA, filho de Amaldo Vilela Paiva e Márcia Rezende Paiva, nasceu em Resende, Rio de Janeiro, em nove de julho de 1977.

Em 13 de agosto de 1999, graduou-se Bacharel em Ciências Biológicas pela Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais.

Em 28 de agosto de 1999, iniciou o curso de Mestrado em Genética e Melhoramento na Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, realizando estudos na área de Genética Molecular Animal.

Em 13 de agosto de 2001, submeteu-se aos exames finais de defesa de tese para obtenção do título de *Magister Scientiae* em Genética e Melhoramento, na Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais.

## ÍNDICE

RESUMO.....	vii
ABSTRACT.....	ix
INTRODUÇÃO e JUSTIFICATIVAS.....	1
OBJETIVOS.....	6
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	7
Geographic isolation and patterns of variation of <i>Astyanax bimaculatus</i> (Linné, 1758) (Pisces, Characidae) in the Doce river basin (State of Minas Gerais).....	14
Abstract.....	14
Introdução.....	15
Material e Métodos.....	18
Resultados.....	26
Discussão.....	37
Conclusões.....	43
Referências Bibliográficas.....	44
Anexos.....	53

## RESUMO

PAIVA, Samuel Rezende, M.S., Universidade Federal de Viçosa, agosto de 2001.  
**Influência de obstáculos naturais na divergência de populações de *Astyanax bimaculatus* na bacia do rio Doce – MG.** Orientador: Jorge Abdala Dergam dos Santos. Conselheiros: Simone Eliza Facione Guimarães e Sérgio Hermínio Brommonschenkel.

Com o objetivo de avaliar os efeitos de obstáculos naturais na estruturação de populações em espécies de peixes de pequeno porte, foram analisados os padrões de semelhança molecular (marcadores do tipo RAPD-PCR) e morfológica (caracteres morfométricos e merísticos) em cinco amostras (cada uma de N=50) isoladas por cachoeiras ou barragens da espécie *Astyanax bimaculatus* (lambari-de-rabo-amarelo, tambuí), em dois afluentes do rio Doce, Minas Gerais (rios Casca e Matipó). Uma amostra adicional em outro afluente do rio Doce (rio Santo Antônio) foi realizada como controle para estimar os parâmetros de divergência genética na bacia. O padrão de variação de 28 *loci* permitiu caracterizar uma perda de alelos (25% dos *loci*) no rio Casca e conseqüente diminuição da variabilidade intrapopulacional (menor índice de heterozigosidade e porcentagem de *loci* polimórficos) em relação aos outros afluentes. No nível interpopulacional foi observado uma diferenciação genética significativa entre todos os três afluentes do rio Doce analisados ( $p < 0,00001$ ), com 21% da variância total obtida na AMOVA observada entre esses três afluentes ( $p < 0,01806$ ). Apenas uma das barreiras geográficas

analisadas (localizada no rio Casca) foi efetiva na diferenciação das populações à jusante e à montante ( $p < 0,0016$ ). No rio Matipó, as populações localizadas à jusante e à montante da barragem são geneticamente similares ( $p < 0,6469$ ), e subsidiam a recomendação de adoção de mecanismos de transposição naquele empreendimento, para permitir a continuidade de fluxo gênico. No rio Casca, o padrão de variação de dois caracteres merísticos corroboraram os resultados das análises moleculares. Contudo, a Análise Discriminante Independente do Tamanho realizada com os 15 caracteres morfométricos não foi capaz de diferenciar claramente as populações, o que sugere a presença de apenas uma espécie do complexo *A. bimaculatus* na bacia do rio Doce. Com base nos dados, pode-se concluir que a diferenciação genética e morfológica de *A. bimaculatus* do rio Doce não está necessariamente associada à presença de cachoeiras, e que depende de fatores demográficos e/ou históricos dos obstáculos geográficos.

## ABSTRACT

PAIVA, Samuel Rezende, M.S., Universidade Federal de Viçosa, August 2001.  
**Geographic isolation and patterns of variation of *Astyanax bimaculatus* (Pisces, Characidae) in the Doce river basin (State of Minas Gerais).**  
Adviser: Jorge Abdala Dergam dos Santos. Committee Members: Simone Eliza Facione Guimarães and Sérgio Hermínio Brommonschenkel.

To evaluate the effects of natural barriers in the process of population structure of small-sized species, it was carried out analyses on molecular similarity (with RAPD-PCR markers) and morphologic patterns (morphometric and meristic characters) in five samples (each  $2n=50$ ) isolated by waterfalls and dams of *Astyanax bimaculatus* (lambari-de-rabo-amarelo, tambiú) in two tributaries of the rio Doce basin, State of Minas Gerais (rio Casca and rio Matipó). An additional sample from Santo Antonio was added to the analysis for a broader overview of genetic divergence in the basin. The rio Casca was characterized by 25% loss of alleles (out of 28 loci), with decrease of within population levels of variation (lower heterozygosity index proportion of polymorphic loci) relative to the other samples. Genetic differentiation among tributaries was significant ( $p<0,00001$ ) and represented 21% of total variance ( $p<0,01806$ ). We concluded that only one of the analyzed barriers (in rio Casca) was an effective factor for the differentiation of populations ( $p<0,0016$ ). In rio Matipó, the populations were genetically similar ( $p<0,6469$ ) and suggested the need for maintenance of high levels of gene flow. In rio Casca,

the patterns of variation of meristic characters was consistent with molecular data. As a whole, however, the size-independent discriminant analysis based on 15 morphometric characters did not differentiate the populations, showing the existence of only one species of the *A. bimaculatus* species complex in the rio Doce basin. The pattern of variation of data suggested that the genetic and morphologic variation of *A. bimaculatus* in the rio Doce basin was not necessarily associated to waterfalls and that they instead result as an interaction of demographic and historic factors associated to geographic obstacles.

## INTRODUÇÃO e JUSTIFICATIVAS

O Estado de Minas Gerais apresenta uma hidrografia privilegiada, com a maioria dos seus trechos compostos de ambientes lóticos (rios) e apenas uma pequena parte restrita a ambientes lênticos (lagoas). São ao todo 15 bacias no Estado e apenas duas (Paraíba do Sul e Tietê) não apresentam suas nascentes do curso principal em território mineiro. Aproximadamente 90% da área do estado é drenada por cinco bacias (São Francisco, Grande, Paranaíba, Doce e Jequitinhonha) (Godinho e Vieira, 1998).

A diversidade da fauna aquática é diretamente proporcional ao grande número de bacias. Assim, Godinho e Vieira (1998), a partir de uma revisão da literatura em relação a levantamentos ictiofaunísticos, registraram em Minas Gerais pelo menos 380 espécies de peixes pertencentes a 135 gêneros. A bacia do São Francisco apresenta maior riqueza com 170 espécies, seguida das bacias do Paranaíba (112), Grande (90), Doce (77), Paraíba do Sul (59), Mucuri (44) e Jequitinhonha (36). Entretanto, a diversidade destas bacias está ameaçada por diversos fatores, como desmatamento, poluição, introduções de espécies exóticas e especialmente, pela construção de barragens.

Na tentativa de mitigar o impacto causado pelas barragens nas espécies de piracema, a legislação estadual de Minas Gerais tornou obrigatória a presença de algum tipo de sistema de transposição de peixes, da jusante à montante, na época de atividade reprodutiva dos mesmos, tanto nos novos

empreendimentos, como naqueles que foram licenciados antes da existência das leis de proteção ambiental. Dentre várias metodologias, Lourenço Filho (1975) destaca as eclusas de peixes, os elevadores de peixe, os planos inclinados, carros-tanque e as escadas de peixes. Sendo este último, o tipo mais comum de sistema de transposição.

A relevância de tais mecanismos de transposição, porém, só pode ser corretamente avaliada quando dados biológicos são utilizados como evidência da migração de peixes no trecho sujeito à construção da barragem. Uma opção de avaliação seria a marcação dos peixes à jusante, e a sua recaptura à montante. Mas, estudos recentes (Godinho *et al.*, 1991), revelaram uma baixa taxa geral de recaptura, o que além de comprometer a eficiência das escadas de peixes, obriga a um esforço amostral muito grande e caro de campo. Em outros casos, a mera presença de espécies nominais à jusante e à montante do empreendimento tem sido considerada como uma evidência suficiente de um corredor em ambos os sentidos, em ambientes, por exemplo, de cachoeiras.

No caso específico de construções de barragens em locais de cachoeiras, a necessidade da transposição da jusante à montante deve ser reavaliada, se for evidenciado o isolamento geográfico das populações à jusante em razão do próprio acidente geológico. Desta forma, os recursos gastos para a transposição poderiam ser utilizados em estratégias de manejo mais eficientes, que garantissem o movimento dos peixes para a jusante, por exemplo. Uma estratégia, além das citadas anteriormente, para testar a hipótese acima indicada seria a inferência da existência de migração através da análise dos padrões moleculares específicos entre populações de espécies de ampla distribuição presentes na jusante e na montante obtidas por marcadores moleculares.

As metodologias moleculares têm auxiliado na compreensão das relações evolutivas, taxonomia e demografia de uma ampla diversidade de animais e plantas (Milligan *et al.*, 1994; Fritsch e Rieseberg, 1996; Mace *et al.*, 1996; Heithaus e Laushman, 1997; Haig, 1998). Quando aplicados com critério (Pérez *et al.*, 1998, Fritsch e Rieseberg, 1996), os marcadores moleculares RAPD-PCR – *Random amplified polymorphic DNA - Polymerase chain reaction*

(Williams *et al.*, 1990; Welsh e McClelland, 1990) podem ser úteis em estudos de genética de populações, sistemática e ecologia de vários organismos (Hadrys *et al.*, 1992; Fritsch e Rieseberg, 1996, Hsiao e Liao, 1998, Bartish *et al.*, 1999, Lacerda *et al.*, 2001). Estes marcadores auxiliam no conhecimento dos padrões de variação genética inter e intrapopulacionais, permitindo a elaboração de medidas para conservação de espécies ameaçadas ou em perigo de extinção (Gibbs *et al.*, 1994; Haig *et al.*, 1996; Cardoso *et al.*, 1998).

A análise de variação do DNA por meio da técnica de RAPD baseia-se na amplificação de segmentos de DNA total a partir do uso de oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) curtos decâmeros (Williams *et al.*, 1990). Sua ampla utilização se deve principalmente à sua rapidez, relativa acessibilidade, alto polimorfismo, pequena quantidade de material biológico para extração do DNA e a não necessidade do conhecimento prévio do genoma da espécie-alvo (Black, 1993, Hillis *et al.*, 1996). Este último aspecto é particularmente interessante no caso da ictiofauna neotropical, onde as pesquisas e o conhecimento na área molecular são incipientes.

Entretanto, existem algumas limitações técnicas em relação aos RAPDs, como sua expressão alélica dominante (não é possível distinguir os heterozigotos dos homozigotos dominantes), limitando a inferência de apenas dois fenótipos por *locus* analisado, o que conseqüentemente influi na estimativa de freqüências alélicas dos resultados, quando comparados a marcadores codominantes (Lynch e Milligan, 1994). Outros pontos negativos são a dificuldade de assumir homologia entre dois fragmentos, inviabilizando a utilização da técnica na reconstrução filogenética (Black, 1993; Fritsch e Rieseberg, 1996); o baixo grau de reprodutibilidade (Pérez *et al.*, 1998) e a possibilidade de que parte das bandas amplificadas sejam artefatos de reação (Rabouam *et al.*, 1999).

Atualmente, os trabalhos moleculares aplicados à compreensão da distribuição da diversidade genética, dentro e entre as populações naturais em peixes de águas continentais, são bem conhecidos em espécies da América do Norte (Vrijenhoek *et al.*, 1985; Heithaus e Laushman, 1997; Carlsson *et al.*, 1999; Faber e White, 2000; Hébert *et al.*, 2000; Avise, 2000) e de alguns grupos do continente africano (Agnèse *et al.*, 1997; Rognon *et al.*, 1998).

Contudo, poucas pesquisas foram desenvolvidas em relação às espécies neotropicais sul americanas (Dergam, 1996; Revaldaves *et al.*, 1997; Dergam *et al.*, 1998; Paiva, 1999; Moysés, 1999). Exceto o trabalho de Dergam *et al.* (no prelo), não existem relatos na literatura sobre a análise da variação genética das populações naturais de peixes da bacia do rio Doce. Além do mais, grande parte dos estudos visam apenas as espécies de grande porte e de interesse comercial.

Dentre as espécies de ampla distribuição e alta abundância na bacia do rio Doce, destaca-se o "lambari-de-rabo-amarelo" ou "tambiú" *Astyanax bimaculatus*. O tambió é uma espécie de pequeno porte, generalista (Costa e Braga, 1993; Esteves e Galetti Jr., 1995) e presumivelmente de hábitos migratórios (Uieda, 1984; Garutti, 1988; Perrone, 1998). Possui reprodução parcelada (Bazzoli *et al.*, 1991) e uma grande capacidade de se adaptar tanto a ambientes lóticos quanto lênticos (Garutti, 1995).

Recentemente, a fragmentação taxonômica desta espécie nominal foi proposta por Garutti (1995), a partir de uma revisão do gênero. Este autor sugere que o taxon nominal *A. bimaculatus* seria um complexo de espécies que apresentam em comum as características: (1) presença de duas barras verticais marrons, a primeira situada antes da mancha umeral e a segunda, de 2-4 escamas, atrás dela (não tão distintas); (2) presença de uma conspícua mancha umeral negra ovalada horizontalmente; (3) presença de uma conspícua mancha negra no pedúnculo caudal, estendendo-se à extremidade dos raios caudais medianos; (4) presença de focinho curto, com cinco dentes na série interna do pré-maxilar, quatro dentes grandes no dentário e a região pré-ventral arredondada. Outra conclusão do trabalho de revisão de Garutti é que, provavelmente, cada uma das bacias hidrográficas sul-americanas apresente suas formas endêmicas. Até o presente momento em Minas Gerais, apenas as bacias dos rios São Francisco, Grande, Paranaíba (Garutti, 1995) e Paraíba do Sul (Melo, 2000) apresentam as descrições morfológicas parciais de espécimes locais do complexo *A. bimaculatus*.

Paiva (1999), estudando a diversidade genética de populações desta espécie na bacia do Paranaíba através de marcadores moleculares RAPD-PCR, identificou padrões de variabilidade molecular que demonstraram uma

grande homogeneidade genética entre as amostras de *A. bimaculatus* daquela bacia. Foi concluído que apesar da existência de grandes barragens na calha principal do rio Paranaíba, as populações da montante e jusante ainda mantêm um alto grau de similaridade, em virtude possivelmente do amplo nicho ecológico desta espécie. Adicionalmente, a existência de grandes densidades populacionais impede a perda de alelos por processos não seletivos, como deriva genética e efeito fundador.

## OBJETIVOS

### **Objetivo específico:**

Determinar se os obstáculos naturais existentes na bacia do rio Doce são fatores relevantes no processo de diferenciação genética das populações de *Astyanax bimaculatus*;

### **Objetivo geral:**

Aumentar o conhecimento da distribuição da variabilidade genética em peixes neotropicais para elaboração de metodologias futuras de conservação e manejo de populações.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGNÈSE, J.F., TEUGELS, G.G., GALBUSERA, P., GUYOMARD, R., e VOLCKAERT, F. 1997. Morphometric and genetic characterization of sympatric populations of *Clarias gariepinus* and *C. anguillaris* from Senegal. **Journal of Fish Biology**, v.50, p.1143-1157.
- AVISE, J.C. 2000. **Phylogeography: the history and formation of species**. Library of Congress Cataloging-in-Publication Data, Harvard. 447p.
- BARTISH, L.V., JEPPSON, N.E NYBOM, H. 1999. Population genetic structure in the dioecious pioneer plant species *Hippophae rhamnoides* investigated by random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers. **Molecular Ecology**, v.8, p.791-802.
- BAZZOLI, N., RIZZO, E., CHIARINI-GARCIA, H; FERREIRA, R.M.A. 1991. Ichthyofauna of the Paranaíba river in the area to be flooded by the Bocaina reservoir, Minas Gerais, Brazil. **Ciência e Cultura**, v.43, n.6, p.4531-453.
- BLACK IV, W.C. 1993. PCR with arbitrary primers: approach with care. **Ins. Mol. Biol.**, v.2, p.1-6.

- CARDOSO, M.A., PROVAN, J., POWELL, W., FERREIRA, P.C.G., DE OLIVEIRA, D.E. 1998. High genetic differentiation among remnant populations of the endangered *Caesalpinia echinata* Lam. (Leguminosae-Caesalpinioideae). **Molecular Ecology**, v.7, p.601-608.
- CARLSSON, J., OLSÉN, K.H., NILSSON, J., OVERLI, O., e STABELL, O.B. 1999. Microsatellites reveal fine-scale genetic structure in stream-living brown trout. **Journal of Fish Biology**, v.55, p.1290-1303.
- COSTA, F.E. dos S., BRAGA, F.M. de S. 1993. Estudo da alimentação natural de *Astyanax bimaculatus*, *Astyanax schubarti* e *Moenkhausia intermedia* (Characidae, Tetragonopterinae) na represa de Barra Bonita, rio Piracicaba (SP). **Revista UNIMAR**, v.15, n.2. p.117-134.
- DERGAM, J.A, GODINHO, A.L, VIEIRA, F., BLACK IV, W.C. Mitochondrial and genomic phylogeographic of *Hoplias malabaricus* (Pisces, Teleostei) in southeastern Brazilian river and its relevance to biodiversity conservation. **Genetics and Molecular Biology** (no prelo).
- DERGAM, J.A.; SUZUKI, H.I.; SHIBATTA, O.A.; DUBOC, L.F.; JÚLIO, H.F.; BLACK IV, W.C. 1998. Molecular biogeography and the origin of the *Hoplias malabaricus* population of the rio Iguassu. **Genetics and Molecular Biology**, v.21, n.4. p.493-496.
- DERGAM, J.A. 1996. **Phylogeography and character congruence within the *Hoplias malabaricus* Bloch, 1794 (Erythrinidae, Characiformes, Ostariophysi) species complex**. Colorado State University, Fort Collins, Colorado. Tese de doutorado. 108p.
- ESTEVEZ, K.E., GALETTI Jr, P.M. 1995. Food partitioning among some characids of a small Brazilian floodplain lake from the Paraná River basin. **Environmental Biology of Fishes**, v.42, p.375-389.

- FABER, J.E. e WHITE, M.M. 2000. Comparison of gene flow estimates between species of darters in different streams. **Journal of Fish Biology**, v.57, p.1465-1473.
- FRITSCH, P., RIESEBERG, L.H. 1996. The use of Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) in conservation genetics. In: **Molecular Genetic Approaches in Conservation**. (eds. Smith, T.B.; Wayne, R.K.), pp.54-73. Oxford Press University, New York.
- GARUTTI, V. 1988. Distribuição longitudinal da ictiofauna em um córrego da região noroeste do estado de São Paulo, bacia do rio Paraná. **Rev. Brasil. Biol.**, v.48, n.4, p.747-759.
- GARUTTI, V. 1995. **Revisão taxonômica dos *Astyanax* (Pisces, Characidae), com mancha umeral ovalada e mancha no pedúnculo caudal, estendendo-se à extremidade dos raios caudais medianos, das bacias do Paraná, São Francisco e Amazônica**. Universidade Estadual Paulista, campus de São José do Rio Preto. Tese de Livre-Docência. 286pp.
- GIBBS, H.L., PRIOR, K.A., WEATHERHEAD, P.J. 1994. Genetic analysis of populations of threatened snake species using RAPD markers. **Molecular Ecology**, v.3, p.329-337.
- GODINHO, H.P., A.L. GODINHO, P.S. FORMAGIO, e TORQUATO, V.C. 1991. Fish ladder efficiency in a southeastern river. **Ciência e Cultura**, v.43, n.1, p.63-67.
- GODINHO, A.L e VIEIRA, F. 1998. **Áreas prioritárias para a conservação da biodiversidade do Estado de Minas Gerais (Peixes)**. Em: Biodiversidade em Minas Gerais: um atlas para sua conservação. Organizadores: Costa, C. M. R. *et al.* Belo Horizonte, Fundação Biodiversitas, pp.94.

- HADRYN, H., BALICK, M., SCHIERWATER, B. 1992. Applications of random amplified polymorphic DNA (RAPD) in molecular ecology. **Molecular Ecology**, v.1, p.55-63.
- HAIG, S.M., BOWMAN, R., MULLINS, T.D. 1996. Population structure of Red-cockaded Woodpeckers in south Florida: RAPDs revisited. **Molecular Ecology**, v.5, p.725-734.
- HAIG, S.M. 1998. Molecular Contributions to Conservation. **Ecology**, v.79, n.2, p.413-425.
- HÉBERT, C., DANZMAN, R.G., JONES, M.W. e BERNATCHEZ, L. 2000. Hydrography and population genetic structure in brook charr (*Salvelinus fontinalis*, Mitchill) from eastern Canada. **Molecular Ecology**, v.9, p.971-982.
- HEITHAUS, M.R.; LAUSHMAN, R.H. 1997. Genetic variation and conservation of stream fishes: influence of ecology, life history, and water quality. **Can. J. Fish. Aquat. Sci.**, v.54, p.1822-1836.
- HILLIS, D.M., MORITZ, C. e MABLE, B.K. 1996. **Molecular Systematics**. Sinauer, second edition, 655p.
- HSIAO, J.Y., LIAO, L.C. 1998. Relationship between population genetic structure and riparian habitat as revealed by RAPD analysis of the rheophyte *Acorus gramineus* Soloand. (Araceae) in Taiwan. **Molecular Ecology**, v.7, p.1275-1281.
- LACERDA, D.R., ACEDO, M.D.P., LEMOS FILHO, J.P. e LOVATO, M.B. 2001. Genetic diversity and structure of natural populations of *Plathymeria reticulata* (Mimosoideae), a tropical tree from the Brazilian Cerrado. **Molecular Ecology**, v.10, p.1143-1152.

- LOURENÇO FILHO, C.A. 1975. **Estudo de “peixe tipo” para projeto de escadas de peixes em barragens**. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal do Rio de Janeiro, Programa de Pós-graduação em Engenharia. 114p.
- LYNCH, M., MILLIGAN, B. G. 1994. Analysis of population genetic structure with RAPD makers. **Molecular Ecology**, v.3, p.91-99.
- MACE, G.M., SMITH, T.B., BRUFORD, M.W., WAYNE, R.K. 1996. An overview of the Issues. In: **Molecular Genetic Approaches in Conservation**. (eds. Smith, T.B.; Wayne, R.K.), pp.3-25. Oxford Press University, New York.
- MELO, F.A.G. de. 2000. **A Serra dos Órgãos como barreira biogeográfica para peixes dos gêneros *Astyanax* Baird e Girard (1854) e *Deuterodon* Eigenmann (1907) (Teleostei: Characiformes: Characidae)**. Dissertação (Mestrado), Universidade Federal do Rio de Janeiro, Museu Nacional, Pós Graduação em Ciências Biológicas (Zoologia). 139p.:il.
- MILLIGAN, B.G., LEEBENS-MACK, J., STRAND, A.E. 1994. Conservation genetics: beyond the maintenance of marker diversity. **Molecular Ecology**, v.3, p.423-435.
- MOYSÉS, C.B. 1999. **Polimorfismo do DNA mitocondrial e estrutura de populações em *Astyanax* (Pisces, Characidae)**. Dissertação (Mestrado), Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, Departamento de Biologia. 151p.
- PAIVA, S.R. 1999. **Análise de padrões de semelhança molecular obtidos por marcadores RAPD-PCR em populações de *Astyanax* aff. *bimaculatus* (Pisces, Characidae) na bacia do rio Paranaíba (região**

oeste do estado de Minas Gerais). Monografia de graduação. Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Biologia Animal. 29p.

PÉREZ, T., ALBORNOZ, J., DOMÍNGUEZ, A. 1998. An evaluation of RAPD fragment reproducibility and nature. **Molecular Ecology**, v.7, p.1347-1357.

PERRONE, E.C. 1998. Hábitos alimentares e migração de jovens de lambaris, *Astyanax bimaculatus* (Peixe-Characidae). **Informativo Ambiental**, v.7, Departamento Biologia, UFES. (<http://npd.ufes.br/~dbio/migra.htm>).

RABOUAM, C., COMES, A.M., BRETAGNOLLE, V., HUMBERT, J.F., PERIQUET, G., and BIGOT, Y. 1999. Features of DNA fragments obtained by random amplified polymorphic DNA (RAPD) assays. **Molecular Ecology**, v.8, p.493-503.

REVALDAVES, E., RENESTO, E., MACHADO, M.F.P.S. 1997. Genetic variability of *Prochilodus lineatus* (Characiformes, Prochilodontidae) in the upper Paraná river. **Brazilian Journal of Genetics**, v.20, p.381-388.

ROGNON, X., TEUGELS, G.G., GUYOMARD, R., GALBUSERA, P., ANDRIAMANGA, M., VOLCKAERT, F. e AGNÈSE, J.F. 1998. Morphometric and allozyme variation in the African catfishes *Clarias gariepinus* and *C. anguillaris*. **Journal of Fish Biology**, v.53, p.192-207.

UIEDA, V.S. 1984. Ocorrência e distribuição dos peixes em um riacho de água doce. **Rev. Brasil. Biol.**, v.44, n.2, p.203-213.

VRIJENHOEK, R.C., DOUGLAS, M.E. e MEFFE, G.K. 1985. Conservation Genetics of Endangered Fish Populations in Arizona. **Science**, v.229, p.400-402.

WELSH, J., McCLELLAND, M. 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. **Nucleic Acids Res.**, v.18, p.7213-7218.

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 genetics markers. **Nucleic Acids Research**, v.18, p.6531-6535.

**Geographic isolation and patterns of variation of *Astyanax bimaculatus*  
(Linné, 1758) (Pisces, Characidae) in the Doce river basin (State of Minas  
Gerais)**

**Abstract** – To evaluate the effects of natural barriers in the process of population structure of small-sized species, we carried out analyses on molecular similarity (with RAPD-PCR markers) and morphologic patterns (morphometric and meristic characters) in five samples (each 2n=50) isolated by waterfalls and dams of *Astyanax bimaculatus* (Iambari-de-rabão-amarelo, tambiú) in two tributaries of the rio Doce basin, State of Minas Gerais (rio Casca and rio Matipó); an additional sample from Santo Antonio was added to the analysis for a broader overview of genetic divergence in the basin. The rio Casca was characterized by 25% loss of alleles (out of 28 loci), with decrease of within population levels of variation (lower heterozygosity index proportion of polymorphic loci) relative to the remaining samples. Genetic differentiation among tributaries was significant ( $p < 0,00001$ ) and represented 21% of total variance ( $p < 0,01806$ ). We concluded that only one of the analyzed barriers (in rio Casca) was an effective factor for the differentiation of populations ( $p < 0,0016$ ). In rio Matipó, the populations were genetically similar ( $p < 0,6469$ ) and suggested the need for maintenance of high levels of gene flow. In rio Casca, the patterns of variation of meristic characters was consistent with molecular data. As a whole, however, the size-independent discriminant analysis based on 15 morphometric characters did not differentiate the populations, showing the existence of only one species of the *A. bimaculatus* species complex in the rio Doce basin. The pattern of variation of data suggested that the genetic and morphologic variation of *A. bimaculatus* in the rio Doce basin was not necessarily associated to waterfalls and that they instead result as an interaction of demographic and historic factors associated to geographic obstacles.

**Key Words:** *Astyanax bimaculatus*, morphometrics, genetic variability, geographic barriers, RAPD

\* Este artigo se encontra no formato recomendado pelo periódico *Journal of Fish Biology*.

## INTRODUÇÃO

A região Neotropical é considerada como a mais rica em número de espécies de peixes de água doce no mundo (Lowe-McConnell, 1999) e as últimas estimativas do número de espécies variam de 5.000 a 8.000 (Vari e Malabarba, 1998). Tal diversidade de espécies está relacionada em grande parte à alta heterogeneidade ambiental presente nessa região e aos processos de isolamento geográfico característicos dos ambientes de água doce (Moyle e Cech, 1996). Essa diversidade está ameaçada em muitas regiões, por fatores como desmatamento de matas ciliares, poluição, introdução de espécies exóticas e de forma muito evidente, pela construção de barragens para aproveitamento hidrelétrico.

A implantação de barragens interrompe o curso natural dos rios e compromete vários processos físicos, químicos e biológicos do ecossistema, intensificando ou determinando a descontinuidade espacial das populações, os processos de erosão, eutrofização e extinção de populações locais da flora e fauna (Agostinho *et al.*, 1992). Do ponto de vista genético, as barragens podem causar um grande impacto no fluxo gênico entre as populações de organismos aquáticos, alterando provavelmente as frequências gênicas das espécies de peixes (Awise e Felley, 1979; Revaldaves *et al.*, 1997; Neeras e Spruell, 2001).

Na tentativa de mitigar o impacto causado pelas barragens nas espécies de piracema, a legislação estadual de Minas Gerais tornou obrigatória a presença de algum tipo de sistema de transposição de peixes, da jusante à montante. Entretanto, no caso específico de construções de barragens em

locais de cachoeiras, a necessidade da transposição deveria ser reavaliada com base no isolamento geográfico das populações em razão do próprio acidente geológico.

Desta forma, os recursos gastos para a transposição poderiam ser utilizados em outras estratégias de manejo para minimizar o advento da construção da barragem. Uma estratégia para testar a hipótese acima indicada seria a inferência da existência de migração por meio da análise dos padrões moleculares e morfológicos específicos entre populações de espécies de ampla distribuição presentes na jusante e na montante. Em virtude do baixo conhecimento dos padrões de variação genética da ictiofauna neotropical sul americana, onde as pesquisas e o conhecimento na área molecular de peixes são incipientes, optou-se pela utilização de marcadores moleculares do tipo RAPD-PCR - *Randomly amplified polymorphic DNA - Polymerase chain reaction* (Williams *et al.*, 1990; Welsh e McClelland, 1990). Esses marcadores podem ser úteis em estudos de genética de populações, sistemática e ecologia de vários organismos (Hadrys *et al.*, 1992; Fritsch e Rieseberg, 1996; Hsiao e Liao, 1998; Bartish *et al.*, 1999; Lacerda *et al.*, 2001).

Dentre as espécies de ampla distribuição e alta abundância na bacia do rio Doce, destaca-se o "lambari-de-rabo-amarelo" ou "tambiú" *Astyanax bimaculatus*. O tambiú é uma espécie de pequeno porte, ecologicamente generalista (Costa e Braga, 1993; Esteves e Galetti Jr., 1995) e indicado como de hábitos migratórios (Uieda, 1984; Garutti, 1988; Perrone, 1998). Possui reprodução parcelada (Bazzoli *et al.*, 1991) e uma grande capacidade de se adaptar tanto a ambientes lóticos quanto lênticos (Agostinho *et al.*, 1997). Godinho e Vieira (1998), indicam ainda que as espécies de pequeno porte, que

constituem um elenco significativo da ictiofauna mineira, não têm sido adequadamente investigadas e pouco ainda é conhecido, face às ameaças que constituem os empreendimentos hidrelétricos para este grupo de espécies.

Este trabalho teve como objetivo principal determinar o grau de diferenciação genética e morfológica entre populações de *Astyanax bimaculatus* da bacia do rio Doce à jusante e à montante de obstáculos naturais e verificar a aplicabilidade dessa metodologia como subsídio para avaliar a necessidade de implantação de sistemas de transposição de peixes.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Áreas de estudo e amostragem

A bacia do rio Doce (Figura 1) tem uma área de 86.000 km<sup>2</sup>, dos quais 86% pertencem ao Estado de Minas Gerais, e o restante ao Estado do Espírito Santo. O trecho mineiro do rio Doce é de aproximadamente 608 km, apresenta uma declividade média de 0,96m/ km e drena aproximadamente 12% do estado (Fundação Centro Tecnológico de Minas Gerais/ CETEC, 1983).

Para esse estudo foram selecionados os rios Casca, Santana, Matipó, e Santo Antônio (Figura 2). Os três primeiros foram escolhidos para testar a relação entre as populações acima e abaixo de cachoeiras de diferentes dimensões. Já o rio Santo Antônio foi escolhido como padrão de comparação geográfica mais distante, para estimação dos níveis de divergência genética.

A Cachoeira Grande, com aproximadamente 45 m de altura encontra-se no rio Santana (afluente do rio Casca). Aproximadamente 50 km à jusante no rio Casca encontra-se a Cachoeira Escura, com uma queda de aproximadamente 4 metros, mas que apresenta um ângulo quase vertical de fluxo que faz dela um obstáculo intransponível para os peixes presentes à jusante, reconhecidamente para o piau-vermelho (*Leporinus copelandi* Steindachner). No rio Matipó, a Cachoeira do Emboque era uma forte corredeira com aproximadamente 30 metros de altura, mas foi o local escolhido para a construção da barragem do Emboque em 1999. Os respectivos pontos de coleta selecionados são especificados na Tabela I e Figura 2.

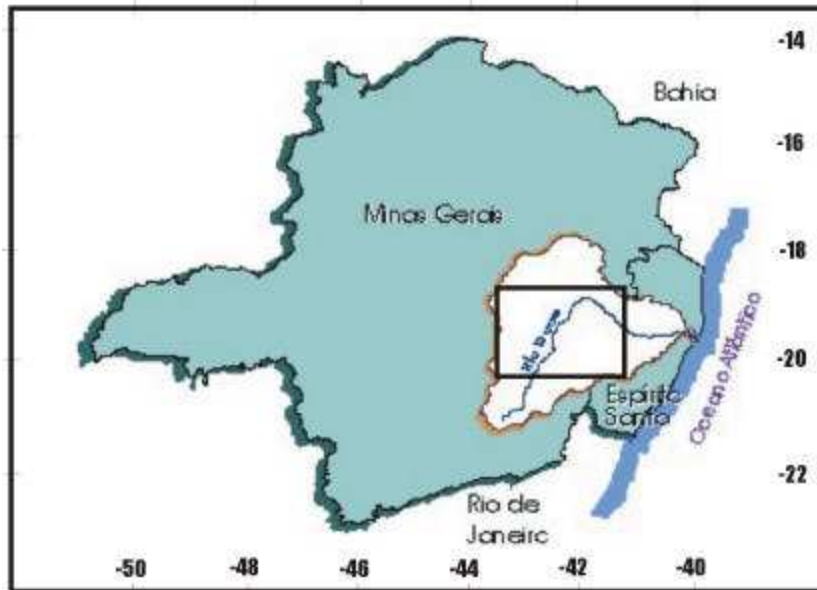


Fig. 1. Estado de Minas Gerais evidenciando a bacia do rio Doce. O quadrado indica a área de estudo

Tabela I. Pontos e locais de coleta e número de amostras usadas nas análises moleculares (N-1) e morfológicas (N-2).

Ponto Coleta	Local	N-1	N-2
Casca (A)	Jusante Cachoeira Escura	50	30
Casca (B)	Trecho entre Escura e Grande	50	30
Casca (C)	Montante Cachoeira Grande	50	30
Matipó (D)	Jusante Barragem Emboque	50	30
Matipó (E)	Montante Barragem Emboque	50	30
Sto.Antônio (F)	Localidade de Ferros	50	30
<b>TOTAL</b>		<b>300</b>	<b>180</b>

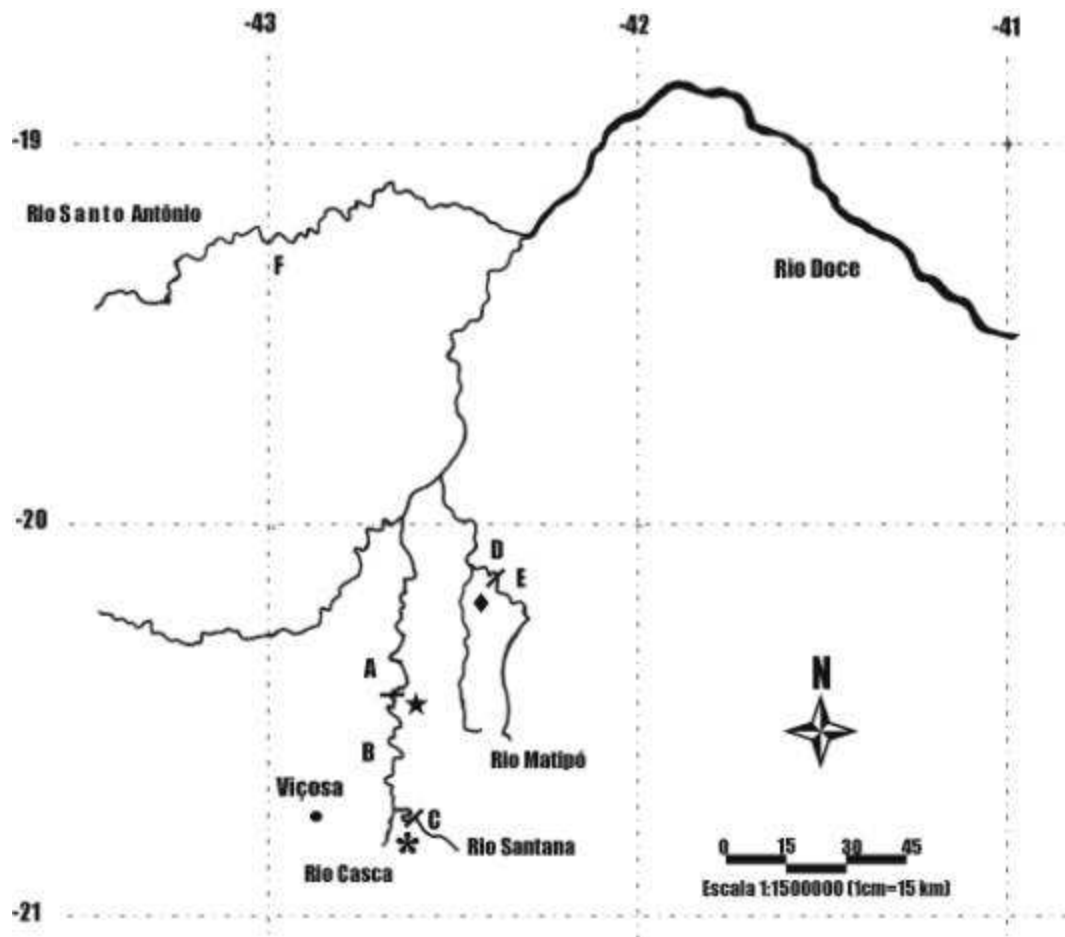


Fig. 2. Mapa do rio Doce, seus afluentes e as barreiras naturais e artificiais analisadas neste estudo. As letras indicam as áreas de coleta. A) jusante Cachoeira Escura; B) região entre as cachoeiras Escura e Grande; C) montante Cachoeira Grande; D) jusante barragem Emboque; E) montante barragem do Emboque; F) localidade de Ferros. ◊ Barragem do Emboque; Δ Cachoeira Grande; φ Cachoeira Escura.

O tamanho amostral de  $n=50$  por coleta foi determinado a partir das recomendações de Apostol *et al.* (1993) para análises utilizando marcadores RAPD-PCR. Já para as análises morfológicas foram selecionados aleatoriamente 30 espécimes para cada área de coleta destes 50 previamente

usados nas análises moleculares (Tabela I). As amostras de tecido de *A. bimaculatus* foram coletadas entre os anos de 1997 e 2000 com o auxílio de redes de espera e arrastões de malha fina. Atualmente, estas estão depositadas na coleção de tecidos de peixes do Laboratório de Biotecnologia Animal, localizado no Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Viçosa, Brasil. Os espécimes coletados pertencem a coleção de peixes do Museu de Zoologia "João Moojen de Oliveira", Departamento de Biologia Animal, localizado na mesma instituição.

### **Extração do DNA e análises RAPD**

Para os espécimes acima de 50 mm as amostras para análise do DNA foram retiradas de músculo epaxial e filamentos branquiais do lado direito de espécimes vivos e fixadas em etanol 95% contido em tubos tipo *eppendorfs*. Já os espécimes menores de 50 mm foram fixados inteiros e o DNA foi extraído a partir do olho direito de cada indivíduo.

As extrações foram processadas a partir de modificações do protocolo de Boyce *et al.* (1989), utilizando-se o detergente CTAB (brometo de cetil-trimetil amônio). O DNA foi ressuspendido em Tris-HCl 1M- EDTA 0,5M pH 8,0 (filtrado e estéril) e estocado à -20°C até o momento da amplificação.

As reações de RAPD foram processadas em volume de 20µL, (19 µL de mistura {13,8 µL de H<sub>2</sub>O; 2 µL de tampão 10X [500 mM KCl (cloreto de potássio), 100 mM Tris-HCl]; 0,8 µL de MgCl<sub>2</sub> (cloreto de magnésio) 40 mM; 0,2 µL dNTPs (desoxiribonucleotídeos trifosfatados) 20 mM; 2 µL de oligonucleotídeo (*primer*) 3,3 µM e 0,2 µL de *Taq* polimerase (1 unidade)} e 1 µL de DNA da amostra. Em cada reação foi adicionado um tubo de controle

negativo (com todos os reagentes, menos DNA), para detecção de possíveis contaminações. As reações foram processadas em um termociclador da MJ Research (PTC100) por 40 ciclos de: 95°C por 15 segundos; 35°C durante 30 segundos e 72°C por 1 minuto e uma extensão final a 72°C durante 7 minutos. As amostras foram corridas em géis de poliacrilamida 6% e visualizadas a partir da precipitação com nitrato de prata (Hiss *et al.*, 1994).

Testes pilotos foram conduzidos com vários *primers* (*Operon Technologies*) para selecionar os que geravam bandas mais polimórficas e nítidas. As bandas (*loci*) foram identificadas por meio de sua mobilidade (Schaffer e Sederoff, 1981) com a utilização de um marcador molecular padronizado (1Kb *ladder*, BRL, Gibco) e posteriormente, foram codificadas em uma matriz binária. Testes de repetibilidade em três reações independentes foram realizadas para todas as bandas selecionadas em 8% dos indivíduos amostrados. Apenas bandas com um mínimo de 90% de repetibilidade foram utilizadas nas análises (Bartish *et al.*, 1999; Vucetich *et al.*, 2001). Adicionalmente, foi seguida a sugestão de Lynch e Milligan (1994) para a eliminação das bandas com frequência acima de  $[1-(3/N)]$  em cada população, com N representando o tamanho amostral.

As análises estatísticas foram realizadas com auxílio dos programas TFPGA - *Tools For Population Genetics Analysis* (Miller, 1997) e Arlequin (Schneider *et al.*, 2000). A frequência alélica foi estimada a partir da ausência da banda (alelo nulo) de acordo com o proposto por Lynch e Milligan (1994):

$q = x^{-1/2}(1-[x(1-x)/N] / 8x^2)$ , onde x é a proporção da população sem a presença da banda e N o número de indivíduos amostrados. A variabilidade intrapopulacional foi estimada quantitativamente por meio das estimativas de

diversidade gênica (heterozigosidade esperada a partir do Equilíbrio de Hardy-Weinberg- EHW) e da porcentagem de *loci* polimórficos. Qualitativamente, essa foi observada a partir da presença de bandas diagnósticas (únicas) ou características (até 5% de presenças identificadas em outras populações).

A estrutura genética das populações foi avaliada por meio do teste da hipótese nula de panmixia entre pares de todos os pontos de coleta dentro da bacia, com o teste exato de Fisher. Este foi calculado a partir das frequências de presença das bandas usando o método de cadeias de Markov (Raymond e Rousset, 1995). A análise de variância molecular ou AMOVA (Excoffier *et al.*, 1992; Huff *et al.*, 1993) foi calculada com o intuito de observar a existência de estruturação genética entre as populações dos rios analisados e entre os próprios rios. Índices de fixação ( $F_{ST}$ ) entre pares de pontos de coleta também foram derivados dos componentes de variância e sua significância foi testada para verificar a existência de homogeneidade entre as populações. O número efetivo de migrantes ( $Nm$ ) foi estimado entre as populações por meio da relação:  $Nm=0,25 (1/ F_{ST} -1)$  (Wright, 1951).

A análise do grau de semelhança genética entre as populações (variabilidade interpopulacional) foi obtida com o cálculo das distâncias genéticas de Nei (1972), estimadas a partir da matriz binária e um fenograma foi feito a partir de uma análise de agrupamento de médias pareadas não ponderadas (UPGMA). Valores de *bootstrap* (Efron, 1985; West e Black, 1998) foram obtidos para avaliar a magnitude dos efeitos de erros amostrais sobre os fenogramas a partir da re-amostragem dos próprios dados com reposição.

## **Análises morfológicas externas**

Foram utilizadas 15 características morfométricas e 2 merísticas de acordo com Lagler *et al.* (1977) e Bookstein *et al.* (1985): comprimento padrão (**CP**); comprimento da cabeça (**CC**); altura do corpo (**AIC**); altura do pedúnculo caudal (**AIPc**); largura interorbital (**LiO**); diâmetro ocular (**DIO**); distância pré-anal (**DPA<sub>n</sub>**); distância pré-dorsal (**DPD<sub>s</sub>**); distância dorsal-peitoral (**DsPt**); distância peitoral-pélvica (**PtPv**); distância pélvica-anal (**PvAn**); distância dorsal-anal (**DsAn**); distância anal-adiposa (**AnAd**); distância dorsal-adiposa (**DsAd**); altura da cabeça (**AICC**); número de escamas na linha lateral (**LL**); número de raios da nadadeira anal (**Ran**). As medidas foram feitas com paquímetro com precisão de 0,1 mm e transformadas em logaritmos base 10 para preservar as alometrias (relações não lineares entre as características) e padronizar as variâncias (Jolicoeur, 1963). As análises estatísticas das características morfométricas foram processadas com os programas SAS e Matlab (v.6), e as características merísticas foram utilizadas em comparações qualitativas.

Como o objetivo de remover os efeitos da variação do tamanho, os dados foram submetidos a uma análise discriminante independente do tamanho – ADIT (Reis *et al.*, 1990; Peres-Neto, 1995). Após o cálculo da regressão de cada característica em relação ao primeiro componente principal (estimativa multivariada do tamanho), os resíduos destas regressões foram utilizados numa análise discriminante canônica (Strauss, 1985). Para determinar quais características foram mais significativas para discriminar as populações, coeficientes dos dois primeiros eixos canônicos foram transformados em vetores de correlação, obtidos a partir do cálculo das

correlações entre os escores individuais destes e dos valores individuais de cada característica (Strauss, 1985).

Foram também calculadas as distâncias D2 de Mahalanobis para estimar a variabilidade interpopulacional a partir das características morfométricas e um fenograma foi obtido por meio da análise de agrupamento UPGMA. O teste de Mantel foi realizado para verificar a significância entre os fenogramas obtidos com os dados moleculares e morfométricos.

## RESULTADOS

### Dados moleculares

Foram testados 66 *primers*, 70% deles amplificaram o DNA de *A. bimaculatus* com os protocolos utilizados. Com base na qualidade das bandas seis *primers* foram selecionados para análise das populações (OPA 01, 03, 09 e OPD 15, 18, 20). Foram selecionadas e identificadas 28 bandas com tamanhos estimados de 460 a 1744 pares de bases para elaboração da matriz binária. As análises de variabilidade intrapopulacional indicaram uma menor diversidade gênica ( $H$ ) no rio Santo Antônio e uma menor porcentagem de *loci* polimórficos ( $P$ ) no rio Casca (Tabela II). A análise qualitativa dos *loci* evidenciou uma redução significativa da variabilidade no rio Casca em relação aos outros afluentes, onde 25% dos *loci* estavam ausentes, e apenas um (4%) *locus* característico estava presente. Por outro lado, o rio Matipó apresentou os maiores índices de  $H$  e  $P$  (Tabela II), além de possuir 11% de *loci* diagnósticos. A amostra do rio Santo Antônio apresentou o mínimo valor de  $H$ , possivelmente em razão de que parte da amostra foi coletada numa lagoa temporária próxima à calha principal do rio.

Em relação à estrutura genética das populações, o teste Exato de Fisher revelou diferenças significativas entre a maioria dos locais de coleta (Tabela III). Os dados demonstraram diferenças significativas entre os pontos B e C separados pela Cachoeira Grande e que não existem diferenças entre os pontos A e B, separados pela Cachoeira Escura e os pontos D e E, separados pela barragem do Emboque.

Tabela II. Variabilidade Intrapopulacional de *Astyanax bimaculatus* na bacia do rio Doce. *H*, diversidade gênica; *P*, porcentagem de *loci* polimórficos (99% critério)

Local de Coleta	<i>H</i>	<i>P</i>
Casca (A)	0,2613	67,8571
Casca (B)	0,2537	67,8571
Casca (C)	0,2832	67,8571
Matipó (D)	0,3245	100
Matipó (E)	0,3579	96,4286
Sto.Antônio (F)	0,2441	85,7143

Tabela III. Valores p obtidos a partir do teste exato de Fisher (50 repetições, 1000 permutações cada) em seis populações de *Astyanax bimaculatus* da bacia do rio Doce.

Populações	A	B	C	D	E	F
Casca (A)	—					
Casca (B)	0,9775	—				
Casca (C)	0,001	0,0016	—			
Matipó (D)	0,000	0,000	0,000	—		
Matipó (E)	0,000	0,000	0,000	0,6469	—	
Sto.Antônio (F)	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	—

A análise dos padrões de *loci* RAPD corroborou os resultados obtidos com as frequências alélicas. Assim os padrões de  $F_{ST}$  demonstraram valores não significativos e uma alta taxa de migração entre os pontos A – B e D - E

(Tabela IV). A análise de AMOVA mostrou que 21,04% ( $p=0,01806$ ) da variação total esta associada entre os afluentes, 2,61% ( $p<0,000001$ ) dentro das populações de cada afluente e 76,35% ( $p<0,000001$ ) dentro das populações.

Tabela IV. Número efetivo de migrantes entre as populações -  $Nm$  (acima da diagonal) e respectivos valores de  $F_{ST}$  (abaixo diagonal) entre as populações de *Astyanax bimaculatus* na bacia do rio Doce.

Populações	A	B	C	D	E	F
Casca (A)	_____	23,765	2,305	0,521	0,523	0,731
Casca (B)	0,01041*	_____	3,477	0,647	0,630	1,024
	*					
Casca (C)	0,09783*	0,06707*	_____	0,955	0,960	1,478
Matipó (D)	0,32419*	0,27876*	0,20749*	_____	76,437	1,841
Matipó (E)	0,32331*	0,28404*	0,20659*	0,00326*	_____	1,549
				**		
Sto.Antônio (F)	0,25492*	0,19617*	0,14465*	0,11956*	0,13893*	_____

\* $p<0,000001$ ; \*\* $p=0,10514$ , \*\*\* $p=0,26265$

A análise de UPGMA a partir das distâncias genéticas de Nei (1972) refletiu uma consistência geográfica entre os afluentes e suas respectivas populações (Figura 3), o que corroborou em parte com os resultados obtidos a partir das análises de  $F_{ST}$  e do teste exato de Fisher. Por exemplo, dentro das populações do rio Casca, foi observada uma maior divergência da população

acima da Cachoeira Grande (Ponto C) em relação às outras duas localidades (Pontos A e B).

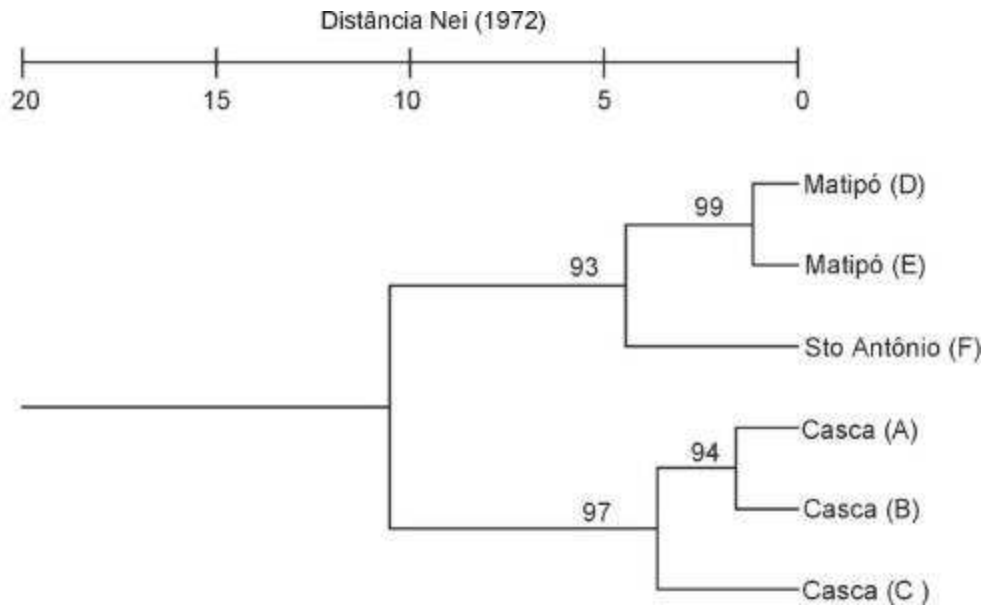


Fig. 3. Dendrograma obtido por UPGMA evidenciando as relações entre as populações de *Astyanax bimaculatus* dentro da bacia do rio Doce/ MG. Só foram considerados valores de *bootstrap* acima de 50%.

### Dados morfológicos

A ADIT permitiu verificar que o primeiro componente principal (CP-1) pode ser interpretado como variável relacionada ao tamanho, visto que todos seus escores apresentaram coeficientes positivos e estatisticamente significantes (Tabela V). O CP-1 foi responsável por 92,97% da variação total existente na matriz de covariância entre as características dentro das seis populações de *A. bimaculatus* analisadas.

**Tabela V. Coeficientes do primeiro componente principal (CP-1) e valores das correlações das características utilizadas com os escores CP-1 (r) e das duas primeiras variáveis canônicas (CV-1 e CV-2). \* p < 0, 01, ns=não significativo.**

<b>Característica</b>	<b>CP-1</b>	<b>r</b>	<b>VC-1</b>	<b>VC-2</b>
CP	0,253862	0,99262*	-0,09301 <sup>ns</sup>	-0,35720*
CC	0,211542	0,94172*	-0,34816*	0,38096*
AIC	0,261556	0,97641*	0,35401*	-0,02866 <sup>ns</sup>
AIPc	0,293413	0,94871*	0,05358 <sup>ns</sup>	-0,06030 <sup>ns</sup>
LiO	0,283489	0,94647*	-0,27077*	-0,17607 <sup>ns</sup>
DiO	0,163794	0,90663*	0,08637 <sup>ns</sup>	0,70928*
DPA <sub>n</sub>	0,254093	0,96096*	-0,08564 <sup>ns</sup>	0,15470 <sup>ns</sup>
DPD <sub>s</sub>	0,246453	0,98616*	-0,44525*	0,03255 <sup>ns</sup>
DsPt	0,257711	0,98819*	0,07734 <sup>ns</sup>	0,0398 <sup>ns</sup>
PtPv	0,256592	0,96833*	0,15620 <sup>ns</sup>	0,09242 <sup>ns</sup>
PvAn	0,321645	0,94249*	0,24308*	-0,14449 <sup>ns</sup>
DsAn	0,266810	0,98469*	0,25018*	-0,34370*
AnAd	0,284521	0,98782*	-0,34943*	-0,05588 <sup>ns</sup>
DsAd	0,271176	0,98588*	-0,14722 <sup>ns</sup>	-0,32459*
AICC	0,205957	0,91312*	0,12004 <sup>ns</sup>	0,10898 <sup>ns</sup>

Foi então realizada uma análise de variáveis canônicas nas seis populações de *A. bimaculatus*, com base nos resíduos da regressão entre cada característica e o CP-1 (Figura 4). As primeiras duas variáveis canônicas explicaram juntas 78,92% da variação total (p<0,0001). Ao contrário dos dados

moleculares, os dados morfométricos (quantitativos) mostraram uma alta similaridade de formas entre as populações da bacia do rio Doce, com apenas a população acima da Cachoeira Grande (C), localizada no rio Casca apresentando-se mais diferenciada.

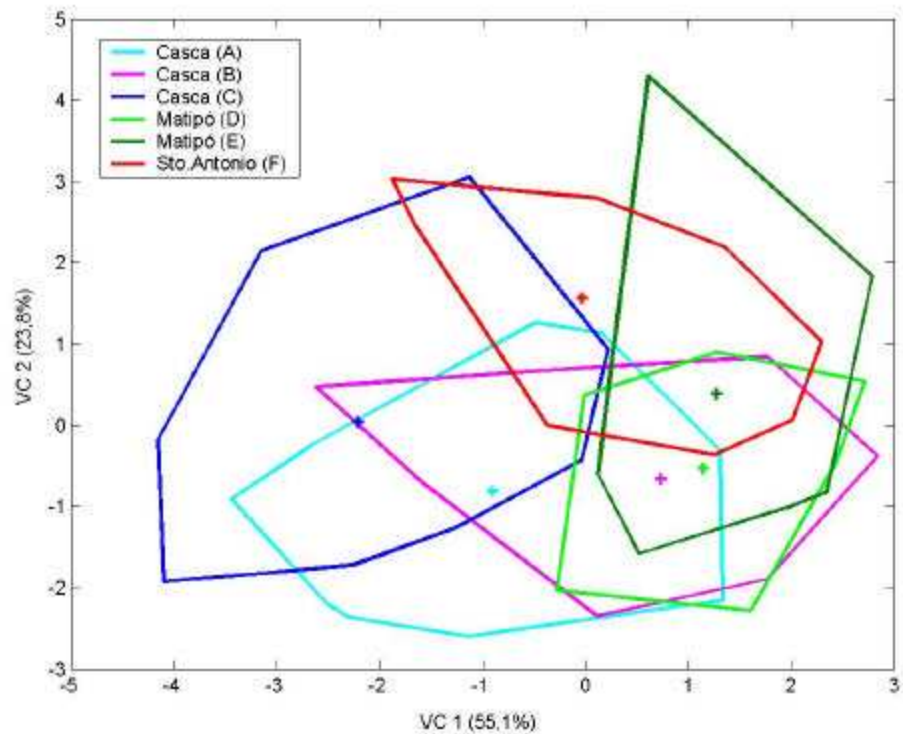


Fig.4. Projeção dos limites dos escores individuais das populações analisadas de *Astyanax bimaculatus* e seus respectivos centróides.

A análise da Tabela V e das Figuras 4 e 5 demonstrou que algumas características foram mais importantes para identificar certas populações e ou afluentes. Assim, a população do Santo Antônio apresentou valores de diâmetro do olho (DiO) e comprimento da cabeça (CC) significativamente diferentes dos outros afluentes. Do mesmo modo, os espécimes do rio Matipó

apresentaram um corpo mais alto (AIC) do que as outras populações. Por último, as características distância pré-dorsal (DpDs), distância anal-adiposa (AnAd) e largura interorbital (LiO) foram preponderantes nos indivíduos do rio Casca.

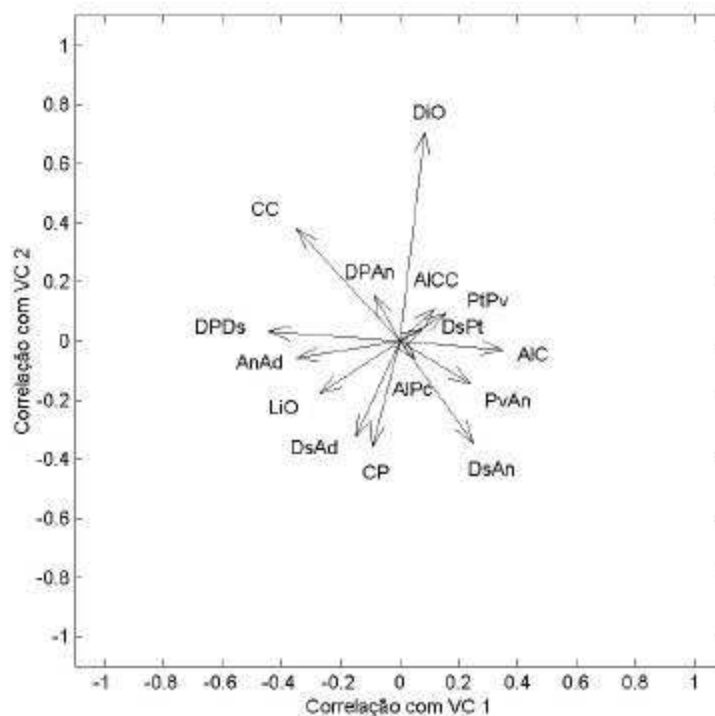


Fig. 5. Vetores de correlação entre as duas primeiras variáveis canônicas e os valores individuais de cada características

Esta análise também indicou quais características não foram informativas para a separação das populações (Tabela V). Ao contrário da consistência geográfica obtida com dados moleculares (Figura 3), os resultados do UPGMA a partir das distâncias de Mahalanobis obtidas pelas características morfométricas sugerem uma maior homogeneidade entre as populações, visto

que um ponto de coleta do rio Casca (B) foi mais semelhante às populações do rio Matipó - pontos D e E (Figura 6).

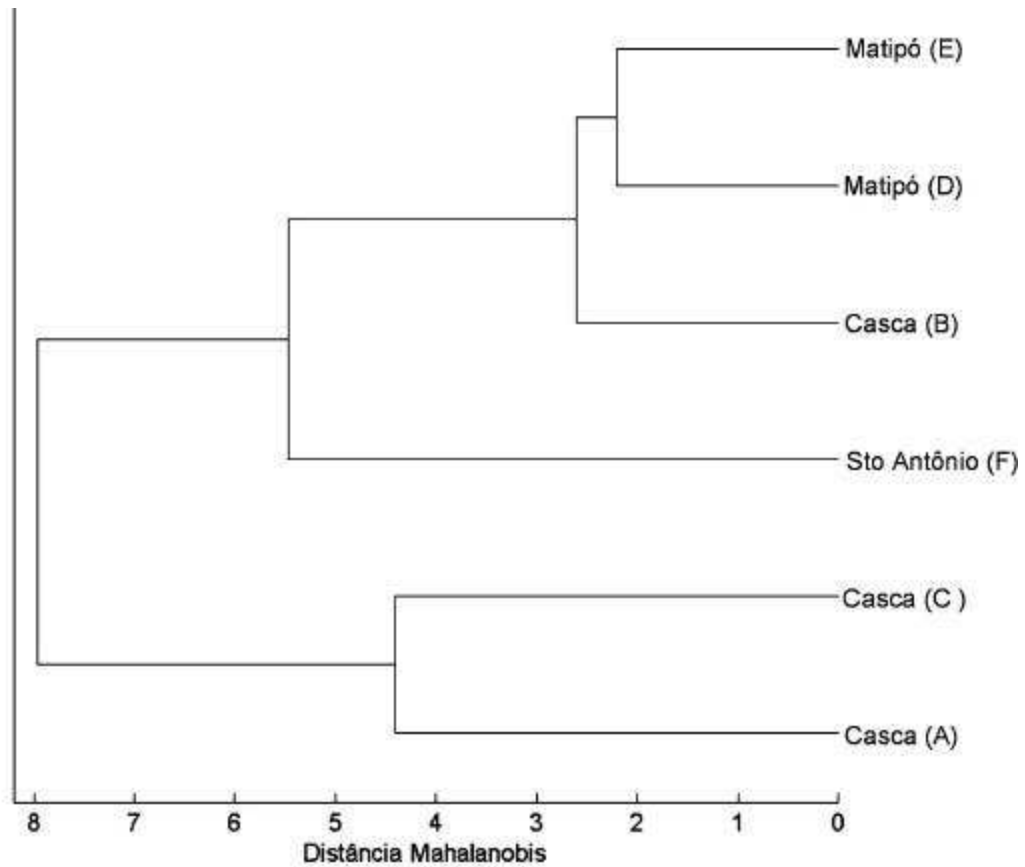


Fig. 6. Fenograma obtido por UPGMA a partir das distâncias de Mahalanobis calculadas para 15 características morfométricas de *Astyanax bimaculatus*.

O teste de Mantel corrobora essas observações, visto que a correlação entre as matrizes de distâncias moleculares e morfológicas não foi significativa ( $r = 0,0937$ ,  $p = 0,28$ ).

As análises merísticas mostraram uma certa congruência com os resultados moleculares, tanto nas contagens do número de escamas da linha

lateral (Figura 7), quanto no número de raios da nadadeira anal (Figura 8). Por exemplo, a população acima da Cachoeira Grande (C) apresentou classes fenotípicas diferentes das localidades à jusante dessa barreira (pontos A e B). Por outro lado, o rio Matipó confirma uma maior heterogeneidade, apresentando mais classes fenotípicas que os demais rios e o rio Santo Antônio apresentou classes mais semelhantes as do rio Matipó no relativo ao número de escamas da linha lateral e mais semelhante as do rio Casca em relação ao número de raios da nadadeira anal.

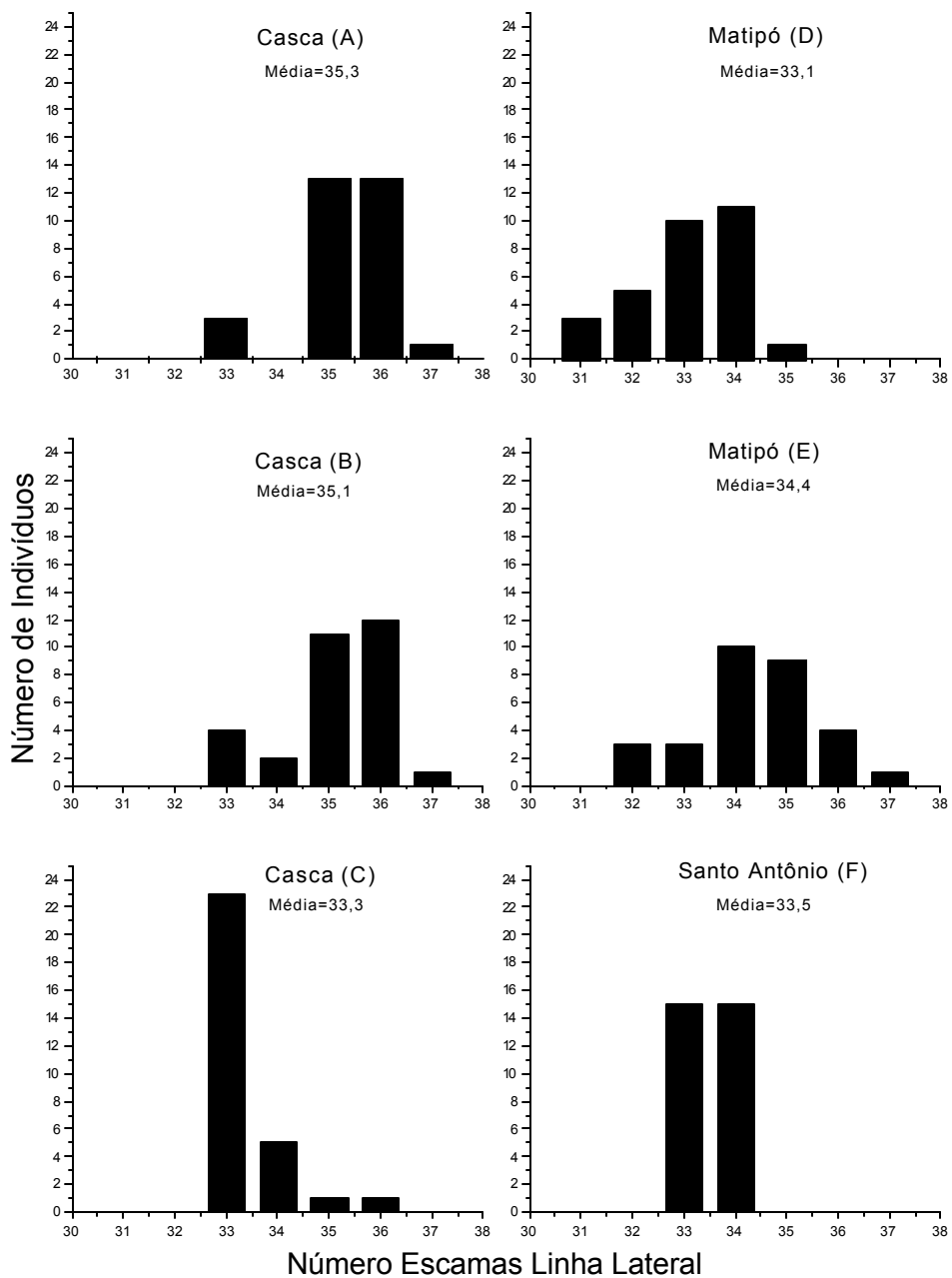


Fig. 7. Histograma evidenciando a variação do número de escamas da linha lateral observado entre as populações de *Astyanax bimaculatus* na bacia do rio Doce.

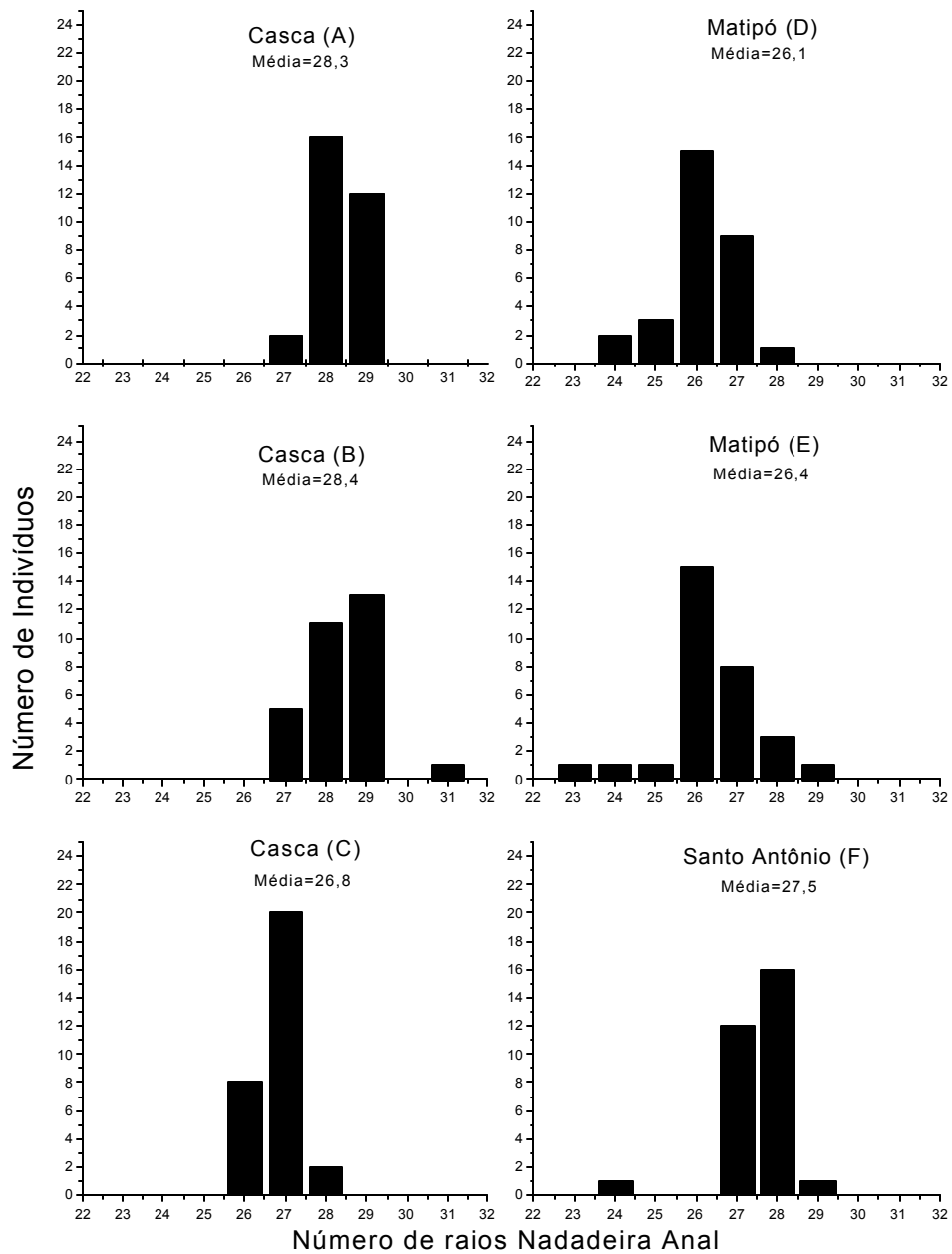


Fig. 8. Histograma evidenciando a variação do número de raios da nadadeira anal observado entre as populações de *Astyanax bimaculatus* na bacia do rio Doce.

## DISCUSSÃO

### Fluxo gênico na bacia do rio Doce

Em animais em geral, o fluxo gênico claramente é influenciado pela mobilidade dos indivíduos e é de se esperar uma menor estruturação genética para espécies com grande vagilidade e uma maior estruturação para espécies de menor vagilidade (Avise, 1994). Contudo estes padrões não são evidentes em ambientes de águas continentais, visto que tanto barreiras físicas como ecológicas podem representar obstáculos para a dispersão dos indivíduos (Gyllensten, 1985; Avise, 2000).

Dos três obstáculos analisados, apenas a Cachoeira Grande apresentou diferenças significativas, e 2,61% da variação total ocorreu entre as populações dentro de cada afluente, sugerindo que as cachoeiras não seriam fatores decisivos na estruturação das populações. Por outro lado, o valor relativamente alto de 21,04% da variação total ser observada entre os afluentes indicaria que a estruturação genética das populações na bacia do rio Doce esteja relacionada à estrutura dos afluentes. Estudos com aloenzimas realizados em populações de duas espécies de Percidae em rios pertencentes a uma mesma bacia (Faber e White, 2000) demonstraram que uma das espécies (*Etheostoma flabellare*) apresentava uma diferenciação significativa entre os afluentes. Carlsson *et al.* (1999) observaram por meio da análise de microssatélites, um alto grau de estruturação em populações de truta marrom (*Salmo trutta*), tanto em razão da presença de cachoeiras quanto em relação à calha do rio e um de seus tributários. O nível de variação observado entre os tributários encontra-se dentro da faixa de variação esperada para espécies

continentais, a saber, entre 22,2% (Ward *et al.*, 1994) e 32,8% (Gyllensten, 1985), estimados a partir de dados de isoenzimas.

Entretanto, as diferenças observadas nas estimativas do fluxo gênico entre os afluentes, podem ser artefatos, visto que poderiam violar as pressuposições do modelo neutro de estrutura das populações por ilhas proposto por Slatkin (1985), já que o modelo assume um equilíbrio entre deriva genética e fluxo gênico (Faber e White, 2000). Whitlock e McCauley (1999), ponderaram que a maioria das pressuposições em genética de populações (equilíbrio entre deriva genética e fluxo gênico, ausência de seleção, acasalamento ao acaso) provavelmente não sejam válidas para grande parte das populações naturais. As violações do modelo principalmente derivam de processos de instabilidade demográfica e/ ou histórica próprios de cada localidade (Avice, 1994; Bossart e Prowell, 1998). Dessa maneira, os valores de  $F_{ST}$  podem flutuar ao longo do tempo e espaço, resultando em estimativas variáveis de fluxo gênico e conseqüentemente da estrutura das populações (Bossart e Prowell, 1998). Por outro lado, a literatura indica que o padrão de variação molecular se mantém constante, pelo menos ao longo de curtos espaços de tempo (West e Black, 1998; Carlsson *et al.* 1999).

O padrão observado de estruturação entre afluentes pode ser explicado por meio de um modelo de isolamento por distância (com populações vizinhas trocando mais migrantes do que as mais distantes) ou em virtude de eventos vicariantes. A Figura 3 indica uma tendência das distâncias genéticas se correlacionarem com a dimensão geográfica (isolamento por distância). Alguns autores sugerem que para *A. bimaculatus*, as calhas principais dos rios de grande ordem podem ser consideradas como barreiras geográficas para

dispersão (Garutti, 1988; Garutti e Britski, 1997). A relativa homogeneidade observada nas frequências alélicas dentro de cada afluente permite sugerir que as análises de impacto devem considerar cada tributário como uma unidade de manejo genético (*sensu* Moritz, 1994), e não um determinado trecho do rio, nem a bacia como um todo. Esse padrão de variação genética é também compatível com os deslocamentos de pequenas distâncias desta espécie, um padrão sugerido pela observação na bacia do rio Doce de uma concentração de tambúis no sopé das cachoeiras na época da piracema.

### **Congruência entre os dados moleculares e morfológicos**

Os dados moleculares e merísticos apresentaram congruência entre dois caracteres merísticos e os *loci* de RAPD no rio Casca de forma que a população acima da Cachoeira Grande se apresentou extremamente diferente tanto qualitativamente (dados merísticos) quanto quantitativamente (frequências gênicas) do resto das outras populações desse tributário. Variações clinais do número de raios da nadadeira anal ao longo de um sistema de rios e tributários já tinham sido observados em populações de *A. bimaculatus* da bacia do rio Paraná (Garutti, 1993).

As análises morfométricas não permitiram separar as populações de *A. bimaculatus* dentro da bacia do rio Doce (Figuras 4 e 5). Entretanto tais resultados são extremamente importantes, pois sugerem a presença de apenas uma espécie dentro da bacia do rio Doce, o que corrobora a teoria proposta por Garutti e Britski (1997) de que cada bacia hidrográfica brasileira apresentaria uma forma endêmica do complexo *A. bimaculatus*.

A utilização de várias abordagens independentes na elucidação dos estudos de distribuição das espécies é extremamente desejável, visto que cada abordagem trabalha em um nível de variação diferenciado, colaborando na elaboração de hipóteses e resultados menos ambíguos (Hillis *et al.*, 1996; Boero, 2001). Dessa forma, vários trabalhos têm abordado questões relacionadas à taxonomia e ao manejo de populações com marcadores moleculares e morfológicos (Agnèse *et al.*, 1997; Rognon *et al.*, 1998). Em relação a ictiofauna sul-americana, abordagens simultâneas têm sido realizadas com técnicas citogenéticas e morfológicas (Moreira-Filho e Bertollo, 1991; Mizoguchi e Martins-Santos, 1998).

A utilização dos vetores de correlação foi útil para abordagens comparativas entre populações. A maioria dos caracteres morfométricos considerados informativos para a separação das populações do rio Doce (como altura do corpo, diâmetro ocular, largura interorbital, comprimento da cabeça) foram também apontados por Garutti e Figueiredo-Garutti (1992) como importantes para correlações entre ambientes diferenciados.

### **Marcadores RAPD e conservação genética**

Apesar de dominantes, os marcadores RAPD podem ser utilizados em estudos populacionais primários desde que alguns cuidados metodológicos sejam implementados como a utilização de grandes amostras, testes de repetibilidade e a diminuição do viés estatístico. A eficiência dos marcadores RAPD para estudos de diversidade genética e estrutura de populações tem sido considerada, em alguns casos, como semelhante à de isoenzimas,

microsatélites, minisatélites e DNA mitocondrial (Naish *et al.*, 1995; Nesbo *et al.*, 1998; Aagaard *et al.*, 1998; Sun *et al.*, 1998).

Em relação à aplicabilidade dessa metodologia como subsídio para a implantação de sistemas de transposição de peixes, observou-se que a técnica foi suficiente para detectar se uma barreira natural representa um obstáculo significativamente intransponível para as populações de *A. bimaculatus*. No caso da Cachoeira da Escura, que representa um obstáculo para o piau vermelho (*Leporinus copelandi*), uma espécie de caracídeo de porte médio com comportamento migratório bem desenvolvido, as frequências alélicas de *A. bimaculatus* foram semelhantes à jusante e à montante da cachoeira. A semelhança molecular poderia ser explicada por diversos fatores, ou pela conjunção deles. Desse modo, a idade relativamente recente da cachoeira indicada como Plio-Pleistocênica (Saad, Universidade Federal de Minas Gerais, com. pess.) teria evitado a diferenciação genética entre as populações; a existência de grandes populações à jusante e à montante da cachoeira diminuiria as chances e diferenciação por processos não-seletivos com a deriva genética; e, finalmente, a semelhança molecular seria o resultado da existência de alto nível de fluxo gênico da montante à jusante. Na bacia do rio Doce, algumas populações de *Hoplias malabaricus* isoladas em lagos apresentaram diferenças significativas de marcadores RAPD (Dergam *et al.*, no prelo), e Nesbo *et al.* (1998), indicaram diferenças moleculares entre populações de percas no Mar Báltico (*Perca fluviatilis*) isoladas durante 100 anos. Considerando que o tamanho populacional não é disponível, é provável que a similaridade molecular seja devido ao fluxo da montante à jusante.

No caso da Cachoeira do Emboque, onde também não foram observadas diferenças alélicas significativas nas populações à jusante e à montante, este padrão pode novamente ser indicado como o resultado de fluxo gênico em ambos os sentidos, visto que todas as espécies são achadas tanto à jusante quanto à montante. Considerando que esta cachoeira foi alterada com a construção da UHE do Emboque que funciona como um impedimento ao fluxo gênico (Awise e Felley, 1979; Revaldaves *et al.*, 1997; Neeras e Spruell, 2001), estes dados são um importante subsídio para indicar a necessidade da implementação de algum sistema de transposição de peixes ou a implementação de medidas de conservação dos espécimes que se encontram a jusante da represa.

Entre todos os obstáculos analisados, a Cachoeira Grande foi à única que determinou diferenças moleculares significativas e diferenças morfológicas evidentes entre as populações. Esta cachoeira também é a mais alta de todas, e possivelmente a sobrevivência dos peixes que descem esteja comprometida, motivo pelo qual inexistiria fluxo gênico através desta barreira.

## CONCLUSÕES

Na bacia do rio Doce, os padrões de diversificação genética das populações de *Astyanax bimaculatus* não se correlacionaram somente com obstáculos geográficos;

Houve uma congruência parcial entre os dados merísticos e moleculares;

Na cachoeira Grande, a diferença molecular significativa foi de caráter quantitativo, e a população também apresentou diferenças em dois caracteres merísticos;

Na cachoeira do Emboque, os resultados sugerem que o empreendimento hidrelétrico deverá incluir um sistema de transposição eficiente de peixes que mantenha o fluxo gênico histórico;

Há a presença de apenas um tipo do complexo *A. bimaculatus* na bacia do rio Doce.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aagaard, J.E., Krutovskii, K.V. and Strauss, S.H. (1998). RAPDs and allozymes exhibit similar levels of diversity and differentiation among populations and races of Douglas-fir. *Heredity* **81**, 69-78.
- Agostinho, A.A., Bini, L.M., Gomes, L.C. (1997). Ecologia de comunidades de peixes da área de influência do reservatório de Segredo. Em *Reservatório de Segredo, bases ecológicas para manejo* (eds., Agostinho, A. A. e Gomes, L. M.), pp: 97-111, EDUEM, Maringá, 387p.
- Agostinho, A.A., Júlio Jr., H.F., e Borghetti, J.R. (1992). Considerações sobre os impactos dos represamentos na ictiofauna e medidas para sua atenuação. Um estudo de caso: reservatório de Itaipu. *Revista UNIMAR* **14**, 89-107.
- Agnèse, J.F., Teugels, G.G., Galbusera, P., Guyomard, R., e Volckaert, F. (1997). Morphometric and genetic characterization of sympatric populations of *Clarias gariepinus* and *C. anguillaris* from Senegal. *Journal of Fish Biology* **50**, 1143-1157.
- Apostol, B.A., Black IV, B.R., Miller, P.R. e Beaty, B.J. (1993). Estimation of the number of full sibling families at an oviposition site using RAPD-PCR markers: application to the mosquito *Aedes aegypti*. *Theor. Appl. Gen.* **86**, 991-1000.
- Avise, J.C. (1994). *Molecular Markers, Natural History and Evolution*. Chapman & Hall, Inc. 511p.
- Avise, J.C. (2000). *Phylogeography: the history and formation of species*. Harvard. 447p.

- Avise, J. C., Felley, J. (1979). Population structure of freshwater fishes. 1. Genetic variation of bluegill (*Lepomis macrochirus*) populations in man-made reservoirs. *Evolution* **33**, 15-26.
- Bartish, L.V., Jeppson, N. e Nybom, H. (1999). Population genetic structure in the dioecious pioneer plant species *Hippophae rhamnoides* investigated by random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers. *Molecular Ecology* **8**, 791-802.
- Bazzoli, N., Rizzo, E., Chiarini-Garcia, H; Ferreira, R.M.A. (1991). Ichthyofauna of the Paranaíba river in the area to be flooded by the Bocaina reservoir, Minas Gerais, Brazil. *Ciência e Cultura* **43** (6), 4531-453.
- Boero, F. (2001). Light after dark: the partnership for enhancing expertise in taxonomy. *Trends Ecol. Evol.* **16**(5), 266.
- Bookstein, F., Chernoff, B., Elder, R., Humphries, J., Smith, G. e Strauss, R. (1985). *Morphometrics in Evolutionary Biology*. Special publication, **15**, The Academy of Natural Sciences of Philadelphia. pp.277.
- Bossart, J.L. e Prowell, D.P. (1998). Genetic estimates of populations structure and gene flow: limitations, lessons and new directions. *Trends Ecol. Evol.* **13**(5), 202-206.
- Boyce, T.M., Zwick, M.E., Aquadro, C.F. (1989). Mitochondrial DNA in bark weevils: size, structure, and heteroplasmy. *Genetics* **123**, 825-836.
- Carlsson, J., Olsén, K.H., Nilsson, J., Overli, O., e Stabell, O.B. (1999). Microsatellites reveal fine-scale genetic structure in stream-living brown trout. *Journal of Fish Biology* **55**, 1290-1303.
- Costa, F.E. dos S., Braga, F.M. de S. (1993). Estudo da alimentação natural de *Astyanax bimaculatus*, *Astyanax schubati* e *Moenkhausia intermedia*

(Characidae, Tetragonopterinae) na represa de Barra Bonita, rio Piracicaba (SP). *Revista UNIMAR* **15** (2), 117-134.

Dergam, J.A, Godinho, A.L, Vieira, F., Black IV, W.C. Mitochondrial and genomic phylogeographic of *Hoplias malabaricus* (Pisces, Teleostei) in southeastern Brazilian river and its relevance to biodiversity conservation. *Genetics and Molecular Biology* (no prelo).

Efron, B. (1985). Bootstrap confidence intervals for a class of parametric problems. *Biometrika* **72**, 45-58.

Esteves, K.E., Galetti Jr, P.M. (1995). Food partitioning among some characids of a small Brazilian floodplain lake from the Paraná River basin. *Environmental Biology of Fishes* **42**, 375-389.

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 data. *Genetics* **131**, 479-491.

Faber, J.E. e White, M.M. (2000). Comparison of gene flow estimates between species of darters in different streams. *Journal of Fish Biology* **57**, p.1465-1473.

Fritsch, P., Rieseberg, L.H. (1996). The use of Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) in conservation genetics. In: *Molecular Genetic Approaches in Conservation*. (eds. Smith, T.B.; Wayne, R.K.), pp.54-73. Oxford Press University, New York.

Fundação Centro Tecnológico de Minas Gerais/ CETEC. (1983). *Diagnóstico Ambiental do estado de Minas Gerais*. Belo Horizonte. Lv. Série de Publicações Técnicas, 10.

- Garutti, V. (1988). Distribuição longitudinal da ictiofauna em um córrego da região noroeste do estado de São Paulo, bacia do rio Paraná. *Rev. Brasil. Biol.* **48** (4), 747-759.
- Garutti, V. (1993). Raios da nadadeira anal de *Astyanax bimaculatus* (Pisces, Characidae) procedente da região noroeste do Estado de São Paulo, bacia do rio Paraná. *Rev. Brasil. Biol.* **53** (2), 159-166.
- Garutti, V., Britski, H.A. (1997). Descrição de uma espécie nova de *Astyanax* (Teleostei, Characidae), com mancha umeral horizontalmente ovalada, da bacia do Rio Guaporé, Amazônia. *Papéis Avulsos de Zoologia* **40** (14), 217-229. Museu de Zoologia da USP, São Paulo.
- Garutti, V., Figueiredo-Garutti, M.L. (1992). Caracterização de populações do lambari *Astyanax bimaculatus* (Pisces, Characidae), procedentes do campus de Jaboticabal, UNESP, SP. *Naturalia* **17**, 17-29.
- Godinho, A.L e Vieira, F. (1998). Áreas prioritárias para a conservação da biodiversidade do Estado de Minas Gerais (Peixes). Em: *Biodiversidade em Minas Gerais: um atlas para sua conservação*. Organizadores: Costa, C. M. R. *et al.* Belo Horizonte, Fundação Biodiversitas, 94p.
- Gyllensten, U.B. (1985). The genetic structure of fish: differences in the intraspecific distribution of biochemical genetic variation between marine, anadromous, and freshwater species. *Journal of Fish Biology* **26**, p.691-699.
- Hadrys, H., Balick, M., Schierwater, B. (1992). Applications of random amplified polymorphic DNA (RAPD) in molecular ecology. *Molecular Ecology* **1**, 55-63.
- Hillis, D.M., Moritz, C. e Mable, B.K. (1996). *Molecular Systematics*. Sinauer, 2<sup>nd</sup> ed., 655p.

- Hiss, R.H., Norris, D.E., Dietrich, C.R., Whitcomb, R.F., West, D.F., Bosio, C.F., Kambhampati, S., Peisman, J., Antolin, M.F. e Black, IV., W.C. (1994). Molecular taxonomy using single strand conformation polymorphism (SSCP) analysis of mitochondrial DNA genes. *Insect Mol. Biol.* **2**, 171-182.
- Huff, D.R., Peakall, R., Smouse, P.E. (1993). RAPD variation within and among natural populations of outcrossing buffalograss [*Buchloe dactyloides* (Nutt.) Engelm.] *Theor. Appl. Gen.* **86**, 927-934.
- Hsiao, J.Y., Liao, L.C. (1998). Relationship between population genetic structure and riparian habitat as revealed by RAPD analysis of the rheophyte *Acorus gramineus* Soloand. (Araceae) in Taiwan. *Molecular Ecology* **7**, 1275-1281.
- Jolicoeur, P. (1963). The multivariate generalization of the allometry equation. *Biometrics* **19**, 497-499.
- Lacerda, D.R., Acedo, M.D.P., Lemos Filho, J.P. e Lovato, M.B. 2001. Genetic diversity and structure of natural populations of *Plathymeria reticulata* (Mimosoideae), a tropical tree from the Brazilian Cerrado. *Molecular Ecology* **10**, 1143-1152.
- Lagler, K.F., Bardach, J.E., Miller, R.R. e Passino, D.R.N. (1977). *Ichthyology*, John Wiley & Sons, 2<sup>nd</sup> ed. 506p.
- Lowe-McConnell, R.H. (1999). *Estudos Ecológicos de Comunidades de Peixes Tropicais*. Editora da Universidade de São Paulo, São Paulo. 535p.
- Lynch, M., Milligan, B.G. (1994). Analysis of population genetic structure with RAPD makers. *Molecular Ecology* **3**, p.91-99.

Miller, M.P. (1997). Tools for population genetics analyses (TFPGA): A Windows program for the analysis of allozyme and molecular population genetic data.

On-line, <http://herb.bio.nau.edu/~miller/tfpga.htm>.

Mizoguchi, S.M.H.N. e Martins-Santos, I.C. (1998). Cytogenetic and morphometric differences in populations of *Astyanax "scabripinnis"* (Pisces, Characidae) from Maringá region, PR, Brazil. *Genetics and Molecular Biology* **21**(1), 55-61.

Moreira-Filho, O. e Bertollo, L.A.C. (1991). *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae): a species complex. *Ver. Bras.Genét.* **14**, 331-357.

Moritz, C. (1994). Defining 'Evolutionary Significant Units' for conservation. *Trends in Ecology and Evolution* **9**, 373-375.

Moyle, P.B. e Cech, J.J. (1996). *Fishes: an introduction to ichthyology*. Prentice-Hall, New Jersey. 3rd ed., 590p.

Naish, K.A., Warren, M., Bardakci, F., Skibinski, D.O.F., Carvalho, G.R. e Mair, G.C. (1995). Multilocus DNA fingerprinting and RAPD reveal similar genetic relationships between strains of *Oreochromis niloticus* (Pisces: Cichlidae). *Molecular Ecology* **4**, 271-274.

Nei, M. (1972). Genetic distance between populations. *American Naturalist* **106**, 283-292.

Nesbo, C.L., Magnhagen, C. e Jakobsen, K.S. (1998). Genetic differentiation among stationary and anadromous perch (*Perca fluviatilis*) in the Baltic Sea. *Hereditas* **129**, 241-249.

- Neraas, L.P. e Spruell, P. (2001). Fragmentation of riverine systems: the genetic effects of dams on bull trout (*Salvelinus confluentus*) in the Clark Fork River system. *Molecular Ecology* **10**, 1153-1164.
- Peres-Neto, P.R. (1995). Introdução a análises morfométricas. Em *Tópicos em Tratamentos de Dados Biológicos*. (eds. Peres-Neto, P.R., Valentin, J.L. e Fernandez, F.), pp.57-89. Oecologia Brasiliensis, Vol.II, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Biologia, Programa de Pós-Graduação em Ecologia, Rio de Janeiro.
- Perrone, E.C. (1998). Hábitos alimentares e migração de jovens de lambaris, *Astyanax bimaculatus* (Peixe- Characidae). *Informativo Ambiental* **7**, Departamento Biologia, UFES.  
On-line, <http://npd.ufes.br/~dbio/migra.htm>.
- Raymond, M.L., Rousset, F. (1995). An exact test for population differentiation. *Evolution* **49**, 1280-1283.
- Reis, S.F., Pessôa, L.M. e Strauss, R.E. (1990). Application of size-free canonical discriminant analysis to studies of geographic differentiation. *Rev. Brasil. Genet.* **13** (3), 509-520.
- Revaldaves, E., Renesto, E., Machado, M.F.P.S. (1997). Genetic variability of *Prochilodus lineatus* (Characiformes, Prochilodontidae) in the upper Paraná river. *Brazilian Journal of Genetics* **20**, 381-388.
- Rognon, X., Teugels, G.G., Guyomard, R., Galbusera, P., Andriamanga, M., Volckaert, F. and Agnèse, J.F. (1998). Morphometric and allozyme variation in the African catfishes *Clarias gariepinus* and *C. anguillaris*. *Journal of Fish Biology* **53**, 192-207.
- Schaffer, H.E., e Sederoff, R.R. (1981). Improved estimation of DNA fragment lengths from agarose gels. *Analyt Biochem.* **115**, 113-122.

- Schneider, S., Roessli, D. and Excoffier, L. (2000). Arlequin, ver.2.000: A software for population genetic data analysis. Genetics and Biometry Laboratory, University of Geneva, Switzerland.
- Slatkin, M. (1985). Gene flow in natural populations. *Annual Review of Ecology and Systematics* **16**, 53-65.
- Strauss, R.E. (1985). Evolutionary allometry and variation in body form in the South American catfish genus *Corydoras* (Callichthyidae). *Systematic Zoology* **34**, 381-396.
- Sun, G.L., Días, O., Salomón, B. e Von Bothmer, R. (1998). Microsatellite variation and its comparison with allozyme and RAPD variation in *Elymus fibrosus* (Schrenk) Tzvel. (Poaceae). *Hereditas* **129**, 275-282.
- Uieda, V.S. (1984). Ocorrência e distribuição dos peixes em um riacho de água doce. *Rev. Brasil. Biol.* **44** (2), 203-213.
- Vari, R.P. e Malabarba, L.R. (1998). Neotropical Ichthyology: An Overview. In: *Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes*. Ed. Malabarba, L.R., Reis, R.E., Vari, R.P., Lucena, Z.M.S., Lucena, C.A.S. Porto Alegre: EDIPUCRS, 603p.
- Vucetich, L.M., Vucetich, J.A., Joshi, C.P., Waite, T.A. e Peterson, R.O. (2001). Genetic (RAPD) diversity in *Peromyscus maniculatus* populations in a naturally fragmented landscape. *Molecular Ecology* **10**, 35-40.
- Ward, R.D., Woodwark, M. e Skibinski, D.O.F. (1994). A comparison of genetic levels in marine, freshwater, and anadromus fishes. *Journal of Fish Biology* **44**, 213-232.

- Welsh, J., McClelland, M. (1990). Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Res.* **18**, 7213-7218.
- West, D.F. e Black IV, W.C. (1998). Breeding structure of three snow pool *Aedes* mosquito species in northern Colorado. *Heredity* **81**, 371-380.
- Whitlock, M.C. e McCauley, D.E. (1999). Indirect measures of gene flow and migration:  $F_{ST} \approx 1/(4Nm+1)$ . *Heredity* **82**, 117-125.
- 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 genetics markers. *Nucleic Acids Research* **18**, 6531-6535.
- Wright, S. (1951). The genetical structure of populations. *Annals of Eugenics* **15**, 323-354.

## **ANEXOS**

**1)** Exemplos de *Astyanax bimaculatus* coletados no rio Matipó, na bacia do rio Doce.

**2)** Jusante Cachoeira Escura (Ponto A), rio Casca/ MG.

**3)** Jusante Cachoeira Grande (Ponto B), rio Santana, tributário do rio Casca/  
MG.

**4)** Montante Cachoeira Grande (Ponto C), rio Santana, tributário do rio Casca/  
MG.

**5)** Montante Barragem do Emboque (Ponto E), rio Matipó, Raul Soares/ MG.

**6) Rio Santo Antônio (Ponto F), Ferros/ MG.**