

SNAYDIA VIEGAS RESENDE

ESTRUTURA E DIVERSIDADE GENÉTICA EM POPULAÇÕES DE *Brycon nattereri* GÜNTHER, 1864 (CHARACIFORMES, CHARACIDAE)

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Manejo e Conservação de Ecossistemas Naturais e Agrários, para obtenção do título de Magister Scientiae.

FLORESTAL
MINAS GERAIS – BRASIL
2018

Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca da Universidade Federal
de Viçosa - Câmpus Florestal

T

R433e
2018 Resende, Snaydia Viegas, 1994-
Estrutura e diversidade genética em populações de *Brycon
nattereri* Günther, 1864 (Characiformes, Characidae) / Snaydia
Viegas Resende. – Florestal, MG, 2018.
xi, 37f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Karine Frehner Kavalco.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
Inclui bibliografia.

1. Peixes. 2. Espécies ameaçadas. 3. Microssatélites.
4. Genes mitocondriais. 5. Animais em extinção. I. Universidade
Federal de Viçosa. Instituto de Ciências Agrárias. Mestrado em
Manejo e Conservação de Ecossistemas Naturais e Agrários.
II. Título.

639.3

SNAYDIA VIEGAS RESENDE

ESTRUTURA E DIVERSIDADE GENÉTICA EM POPULAÇÕES DE *Brycon nattereri* GÜNTHER, 1864 (CHARACIFORMES, CHARACIDAE)

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Manejo e Conservação de Ecossistemas Naturais e Agrários, para obtenção do título de Magister Scientiae.

APROVADA: 19 de fevereiro de 2018.

Aline Mitcheli Carvalho Ramos Fregonezi

Daniel Cardoso Carvalho

Karine Frehner Kavalco
(Orientadora)

“Tenho a impressão de ter sido uma criança brincando à beira-mar, divertindo-me em descobrir uma pedrinha mais lisa ou uma concha mais bonita que as outras, enquanto o imenso oceano da verdade continua misterioso diante de meus olhos”.

(Isaac Newton)

AGRADECIMENTOS

Agradeço especialmente às pessoas que cuidaram de mim com tanto amor, meus pais-avós, Francisca Maria e Geraldo Resende, pela confiança, por serem meus maiores exemplos de fortaleza emocional, persistência e responsabilidade.

Aos meus familiares, em especial aos meus tios Elza, Edson, Renilda, meu pai Elder e minha irmã Jehinny, por torcerem pelas minhas vitórias e se fazerem presentes com todas as conversas, momentos de descontração e incentivo ao longo de toda a minha vida, e principalmente nesse período de trabalho.

À minha orientadora e co-orientador, professora Dra Karine Kavalco e professor Dr Rubens Pazza. Obrigada pela oportunidade de conhecer e me encantar pela ciência, pela excelente orientação desde Iniciação Científica, que me permitiu crescer gradualmente como profissional. Obrigada, principalmente, por serem exemplos de integridade e empatia, que fazem diferença na vida das pessoas que os cercam.

Aos meus colegas do Laboratório de Genética Ecológica e Evolutiva (LaGEEvo), por mostrarem que é possível um ambiente de trabalho leve e tranquilo, onde existe amizade sincera e aprendizado todos os dias.

Agradeço especialmente a Rosana e Renan, por serem, além de amigos pessoais que trazem alegria para os meus dias, companheiros no trabalho de laboratório e nas discussões que agregam valor ao meu trabalho. À Dinaíza e Marcos, amigos que estavam sempre prontos para me auxiliar no que precisei, muito obrigada!

Ao Reinaldo, aluno do curso de Ciências Biológicas da UFV-CRP, e ao biólogo Willian Lopes, que com seus conhecimentos da região ajudaram, com extrema boa vontade, a identificar os locais de ocorrência e coletar os espécimes de *Brycon nattereri*, deste trabalho. Agradeço especialmente ao Iuri, Francisco, Matheus Lewi, Rodrigo, Marcos, Renan, Igor e Rosana, e ao motorista Valdir, por todo empenho e ajuda nas coletas, sem vocês esse trabalho não teria se realizado.

À Universidade Federal de Viçosa, pela estrutura, disponibilidade de transporte para as coletas e à Pró- Reitoria de Pesquisa e Pós Graduação pelo recurso para sequenciamento das amostras de DNA.

Ao Programa de Pós Graduação em Manejo e Conservação de Ecossistemas Naturais e Agrários, aos seus professores, pela transmissão de conhecimentos que tanto enriqueceram este trabalho e os secretários Lucas, Jéssica e Edivânia, sempre disponíveis para sanar nossas dúvidas.

Aos amigos de Florestal - MG, Klever, Bruna, Fernando, Raíza, pelo companheirismo nas disciplinas, por terem me acolhido tão bem numa cidade nova e pela amizade forte que construímos em tão pouco tempo e que levarei para sempre no coração.

Ao professor Dr Alexandre Hilsdorf, pela boa vontade e disponibilidade das sequências dos primers D-Loop utilizados neste trabalho.

À FAPEMIG e ao CNPq pelo apoio financeiro aos projetos. À CAPES, pela concessão da bolsa.

A todos, muito obrigada!

SUMÁRIO

| | |
|---|------|
| LISTA DE FIGURAS..... | vi |
| LISTA DE TABELAS | vii |
| RESUMO..... | viii |
| ABSTRACT | x |
| 1. INTRODUÇÃO | 1 |
| 1.1. Brycon nattereri, distribuição, história de vida e ameaça de extinção..... | 1 |
| 1.2. Diversidade e estrutura genética em espécies ameaçadas | 4 |
| 1.3. Marcadores moleculares: microssatélites e genes mitocondriais..... | 6 |
| 2. OBJETIVOS | 8 |
| 2.1. Objetivo geral..... | 8 |
| 2.2. Objetivos específicos..... | 8 |
| 3. MATERIAIS E MÉTODOS | 9 |
| 3.1. Coleta e identificação dos locais de ocorrência..... | 9 |
| 3.2. Extração de DNA genômico total | 12 |
| 3.3. PCR para amplificação de loci microssatélites..... | 12 |
| 3.4. PCR para amplificação dos genes mitocondriais D-loop e COI..... | 14 |
| 3.5. Análise de dados de Microssatélites..... | 15 |
| 3.6. Análise de dados de Mitocondriais..... | 16 |
| 4. RESULTADOS | 17 |
| 4.1. Microssatélites..... | 17 |
| 4.2. Genes mitocondriais..... | 21 |
| 5. DISCUSSÃO | 25 |
| 6. CONSIDERAÇÕES FINAIS | 31 |
| 7. REFERÊNCIAS | 32 |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1. Área de distribuição de <i>B. nattereri</i> em território brasileiro, em nota sobre a espécie no Livro Vermelho da Fauna Ameaçada de Extinção)..... | 3 |
| Figura 2. Exemplar de <i>B. nattereri</i> (Córrego do Salto)..... | 4 |
| Figura 3. Distribuição dos pontos amostrados. Em preto, Ribeirão de Fora, em verde, Córrego do Salto e em vermelho, Córrego da Espinha..... | 12 |
| Figura 4. Análise de estruturação genética com inferência Bayesiana (Structure v.2.3.4) de três populações de <i>Brycon nattereri</i> por quatro loci de marcadores microssatélites, assumindo $K = 3$ | 21 |
| Figura 5. Análise de estruturação genética com inferência Bayesiana (Structure v.2.3.4 Pritchard, 2000) de três populações de <i>Brycon nattereri</i> por quatro loci de marcadores microssatélites, assumindo $K = 2$ | 21 |
| Figura 6. Dendrograma D-Loop gerado no software Mr Bayes pós análise com com três milhões de gerações, sump burnin de 7500 e sumt burnin de 100; visualizado no software FigTree v1.4.3..... | 23 |
| Figura 7. Dendrograma COI gerado no software Mr Bayes pós análise com com três milhões de gerações, sump burnin de 7500 e sumt burnin de 100; visualizado no software FigTree v1.4.3..... | 24 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 1. Relação entre número de registro, localidade e indivíduos utilizados no estudo | 10 |
| Tabela 2. Relação de primers testados na amplificação cruzada..... | 13 |
| Tabela 3. Relações de frequências alélicas em cada locus por população. | 17 |
| Tabela 4. Resumo dos dados estatísticos de diversidade genética nos quatro loci por população de <i>B. nattereri</i> , onde (A) é número alelos; (H_o) heterozigosidade observada; (H_e) heterozigosidade esperada; (P) valor de p para o teste equilíbrio de Hardy-Weinberg para deficiência de heterozigotos; (F_{is}) índice de fixação intra-populacional; (N) número de indivíduos..... | 18 |
| Tabela 5. Valores globais de heterozigosidade observada (H_o), esperada (H_e) e (F_{is}) índice de fixação intra-populacional | 19 |
| Tabela 6. Estimativas de F_{st} por locus por população par a par. | 20 |
| Tabela 7. Estimativa F_{st} por todos os loci estimado por tamanho alélico e populações par a par..... | 20 |

RESUMO

RESENDE, Snaydia Viegas, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, campus Florestal, fevereiro de 2018. **Estrutura e diversidade genética em populações de *Brycon nattereri* Günther, 1864 (Characiformes, Characidae)**. Orientadora: Karine Frehner Kavalco. Coorientadores: Rubens Pazza e Jorge Abdala Dergam Dos Santos.

Os peixes compreendem mais da metade de todos os vertebrados vivos e a região Neotropical é considerada a mais rica para este grupo. *Brycon* é um gênero de peixes da ordem dos Characiformes, com exemplares distribuídos desde o sul do México até o Rio de La Plata, na Argentina. Sete espécies do gênero estão classificadas como ameaçadas de acordo com a última portaria do Ministério do Meio Ambiente que dispõe sobre Peixes e Invertebrados Aquáticos Ameaçados, entre elas *B. nattereri*. Com exemplares de médio porte, habitam ambientes lóticos e rochosos; se alimentam preferencialmente de material alóctone, como frutos, sementes e pequenos invertebrados. Assim como para grande parte das espécies ameaçadas do gênero, entre as principais causas do declínio populacional estão a degradação e destruição de habitat aliadas à pesca indiscriminada. Dessa forma, se tornam essenciais estudos genéticos que avaliem as condições em que se encontram populações remanescentes, uma vez que a diversidade genética e nível de estruturação populacional têm influência direta na resposta e sobrevivência das populações às pressões ambientais. Muitos marcadores moleculares estão hoje disponíveis para estudos desse tipo, entre eles os microssatélites, marcadores nucleares co-dominantes e que apresentam alto polimorfismo alélico, e os genes e regiões controladoras como citocromo oxidase I e D-Loop, respectivamente. Assim, este trabalho teve como objetivo avaliar diversidade genética e estrutura de três populações remanescentes de *B. nattereri*, duas de ocorrência nas bacias hidrográficas dos rios Paraná (Ribeirão de Fora e Córrego do Salto) e uma São Francisco (Córrego da Espinha) na região do Alto Paranaíba, MG. Para isso, foram extraídos DNA de fígado e nadadeira de indivíduos das três populações e realizados testes de transferibilidade de loci microssatélites e amplificação dos genes mitocondriais. Nas análises de microssatélites, as três populações apresentaram baixa diversidade alélica e excesso de heterozigotos nos testes de equilíbrio de Hardy-Weinberg e cálculos de heterozigosidade observada e esperada. Excesso de heterozigotos também foi observado nas análises do software Bottleneck, confirmando a ocorrência de gargalo nas três populações analisadas. Apesar disso, os valores de F_{st} não evidenciaram estrutura genética entre as mesmas, e isso foi confirmado pela análise bayesiana de clusters no software Structure com $K=3$. Entretanto, na mesma análise de agrupamento com $K=2$, é

possível observar leve organização dos indivíduos em dois grupos, correspondentes às bacias dos rios Paraná e São Francisco. Nos dendrogramas gerados pelas sequências do gene mitocondrial da citocromo oxidase I e da região D-Loop também é possível observar o agrupamento de indivíduos pertencentes à mesma bacia e a diversidade e distâncias genéticas intra-populacionais também foram baixas. Os resultados que demonstram baixa diversidade e ocorrência de gargalo correspondem ao esperado para a maioria das espécies ameaçadas. Apesar de não terem sido encontradas evidências de endogamia, se faz necessário o monitoramento dessas populações ao longo do tempo. Para a recuperação dos níveis de diversidade, é essencial que sejam evitadas as principais pressões como pesca e degradação dos locais de ocorrência.

ABSTRACT

RESENDE, Snaydia Viegas, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, campus Florestal, February, 2018. **Structure and genetic diversity in populations of *Brycon nattereri* Günther, 1864 (Characiformes, Characidae)**. Adviser: Karine Frehner Kavalco. Co-advisers: Rubens Pazza and Jorge Abdala Dergam Dos Santos.

The fishes comprise more than half of all living vertebrates and the Neotropical region is considered of major distribution for this group. *Brycon* is a fish genus in the order Characiformes, with specimens distributed from southern Mexico to the La Plata River in Argentina. Seven species in this genus are classified in threatened situation according to the last port of the Ministry of the Environment that deals with Threatened Fish and Aquatic Invertebrates, among them *B. nattereri*. Formed by medium-sized specimens, they inhabit lotic and rocky environments; they feed preferentially on allochthonous material, such as fruits, seeds and small invertebrates. As for most of the endangered species of the genus, the main causes of population decline are degradation and destruction of habitats allied to indiscriminate fishing activities. Thus, genetic studies that evaluate the conditions in which remaining populations are located, since genetic diversity is fundamental to population structure, has direct influence on population response and survival at environmental pressures. Many molecular markers are now available for such studies, including microsatellites, co-dominant nuclear markers known to have high allelic polymorphism, and control genes and regions such as cytochrome oxidase I and D-Loop, respectively. This work aimed to evaluate the genetic diversity and structure of three remaining populations of *B. nattereri*, two of them occurring in the Paraná River basins (Fora Creek and Salto Stream) and one in São Francisco basin (Espinha Stream) on the region of Alto Paranaíba, Minas Gerais state. For this, we used extracted DNA of liver and fin from the three populations and we tested for microsatellite loci transfer and amplification of mitochondrial genes. In microsatellite analyzes, three populations showed low allelic diversity and excess heterozygotes in the Hardy-Weinberg equilibrium tests and calculations of observed and expected heterozygosity. Excess heterozygotes were also observed in Bottleneck software, confirming the occurrence of bottleneck on the three populations. In spite of this, the F_{st} values did not show genetic structure among them as part of it, and was confirmed by Bayesian analysis of clusters without $K=3$. However, if is not the cluster analysis with $K=2$, it is possible to observe the organization of individuals in two groups, corresponding to the basins of the Paraná and São Francisco rivers. The dendrograms generated by the mitochondrial gene sequences of cytochrome oxidase I and the D-Loop region are also in position of grouping

of users belonging to the same basin and the diversity and intra-population genetic distances were also low. The results that demonstrate low diversity and bottleneck occurrence correspond to that expected for most threats. Although no evidence of inbreeding has been found, it is necessary to monitor the populations over time. For a recovery of the levels of diversity, it is essential that major pressures such as fishing and degradation of places of occurrence be mitigated.

1 INTRODUÇÃO

1.1 *Brycon nattereri*, distribuição, história de vida e ameaça de extinção.

Os peixes formam o maior grupo entre os vertebrados, com mais de 32000 espécies reconhecidas, as quais exibem incomparável diversidade morfológica, de hábitat, fisiologia e comportamento (Nelson, 2016). A região Neotropical é considerada a mais rica para este grupo, compreendendo, apenas em água doce, aproximadamente 6000 espécies (Reis et al., 2003).

Entre os grupos mais diversos de peixes encontrados nessa região estão os pertencentes à ordem Characiformes, que inclui mais de 1800 espécies e tem como principal família Characidae, com cerca de 1200 espécies (Reis et al., 2003).

O gênero *Brycon* Müller & Troschel 1844, é um grupo monofilético com 44 espécies válidas (Lima, 2017), pertence à subfamília Bryconinae da ordem dos Characiformes. Seus exemplares se distribuem nos rios das bacias da América do Sul, ocorrendo desde o sul do México até o Rio de La Plata, na Argentina (Lima, 2004). No Brasil, as espécies do gênero são conhecidas popularmente por diversos nomes ao longo de sua distribuição, tais como matrinchã, jatuarana, piabanha, piraputunga, piracanjuba e vermelha (Lima, 2017).

Os espécimes do gênero são caracterizados morfológicamente pela combinação de três a quatro linhas de dentes pré-maxilares, presença de um dente sinfisário no dentário, presença de nadadeira anal relativamente longa, com 18-32 raios ramificados, e ausência de um osso coracóide expandido (Lima, 2004). Peixes de médio a grande porte, podem atingir 70 cm de comprimento padrão quando adultos (Lima, 2017).

Habitam rios e ambientes aquáticos associados, como lagos marginais e planícies de inundação, principalmente em regiões florestadas (Lima, 2017). Ocorrem preferencialmente em rios de água limpa, corrente, com leito rochoso e altos níveis de oxigênio (Lima et al., 2008; Botero e Castro, 2011). Considerados migradores, algumas espécies do gênero executam longas migrações reprodutivas (Godoy, 1975) geralmente nos períodos de cheia, variando de setembro a fevereiro (Sanchez e Galleti Jr, 2007).

Têm uma alimentação variada. Onívoros, se alimentam em grande parte de material alóctone, tais como frutos, sementes e insetos (Goulding, 1980; Borges, 1986; Lima & Castro, 2000; Leite, 2004). Azevedo (2010) evidenciou diversas táticas de obtenção de recursos em uma espécie do gênero, desde forrageio na superfície da água até investidas mais elaboradas a cardumes de lambaris.

Como peixes de grande porte, são notáveis componentes das comunidades e importantes para a pesca regional amadora, profissional e esportiva em toda a sua área de distribuição (Lima, 2004; Godoy, 1975) e algumas espécies têm sido cultivadas para o consumo humano (Lima, 2003; Matsumoto e Hilsdorf, 2009).

Desde a década de 70, as espécies do gênero estão entre as mais ameaçadas dos rios brasileiros (Godoy, 1975). Poluição, represamento e extração de areia do leito dos rios, sobrepesca e introdução de espécies exóticas são consideradas as maiores responsáveis pela diminuição de diversidade populacional e específica em alguns rios brasileiros (Hilsdorf e Petrere, 2002; Shibatta et al., 2002; Barroso et al., 2005; Zaniboni-Filho et al., 2006).

De acordo com a portaria MMA 445, de 15 de dezembro de 2014 (Brasil, 2014) que trata sobre peixes e invertebrados aquáticos, sete espécies do gênero *Brycon* se encontram nas categorias “Em Perigo” e “Vulnerável”, entre elas *Brycon nattereri* Günther, 1864.

Brycon nattereri Günther, 1864 se distribui pelo sistema de drenagem que compõe a bacia do Alto Paraná, Tocantins e São Francisco (Lima et al., 2005) (Figuras 1 e 2). Segundo nota do Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção (Lima et al., 2005), em muitos locais de ocorrência já não se tem registros desde a década de 1940. Apesar disso, está presente em algumas unidades de conservação, entre elas o Parque Estadual de Guartelá (Shibatta et al., 2002) e o PARNA da Serra do Cipó (Vieira et al., 2005).

O gênero *Brycon* possui características cromossômicas bem conservadas, mantendo um número diploide igual a 50, mas com distinção entre fórmula cariotípica entre as espécies (Travenzoli et al. 2015) e nas marcações de Bandeamento C, que são específicas para cada espécie do gênero (Almeida-Toledo, 1996). Nos últimos vinte anos

assume-se que cada espécie de *Brycon* possui, portanto, um padrão único de distribuição da heterocromatina constitutiva.

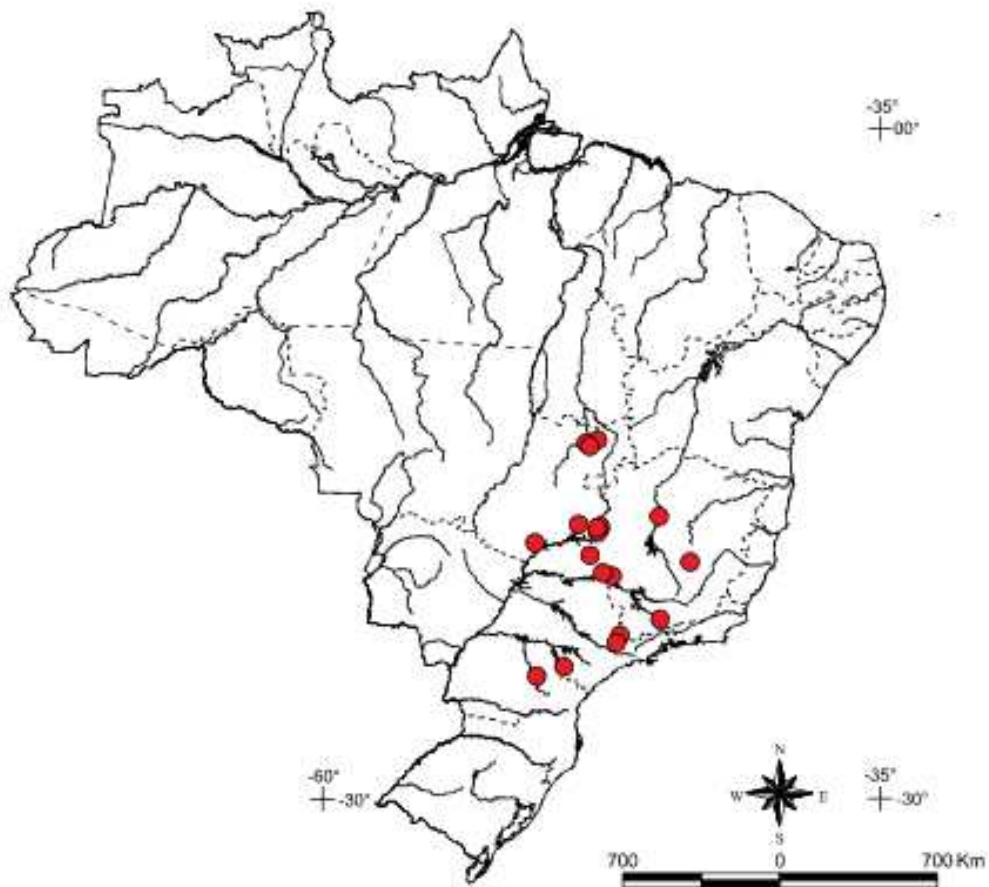


Figura 1: Área de distribuição de *B. nattereri* em território brasileiro, em nota sobre a espécie no Livro Vermelho da Fauna Ameaçada de Extinção).

Estudos cromossômicos com *Brycon nattereri* de populações dos rios Paranaíba e São Francisco mostraram diferenças entre os padrões de bandeamento C, o marcador considerado espécie-específico para o gênero. Além disso, há diferenças entre as fórmulas cariotípicas e também padrão de Ag-RONs. A localização de genes ribossômicos está sendo realizada e poderá dar mais suporte às evidências de que há diferenças macro e microestrutural no cariótipo das populações de ambas as bacias (dados não publicados).

Os ecossistemas de água doce são mais propícios a criarem barreiras derivadas de suas formações geológicas, como o Arco do Paranaíba, que diminuem ou impedem completamente o fluxo gênico entre populações de uma mesma espécie (Hilsdorf et al 2006).

A formação do Arco, que faz parte do Cinturão de Brasília, representa um importante evento nas drenagens do Alto Paraná e São Francisco, com a formação de suas principais nascentes caracterizadas por eventos neotectônicos ocorrendo no decorrer de 2 ou 3 milhões de anos (Campos & Dardene, 1997). O surgimento desse arco de rochas separou populações de peixes de distribuição anteriormente continua permitindo, conseqüentemente, que as mesmas acumulassem diferenças que podem levar a especiação.



Figura 2: Exemplo de *B. nattereri* (Córrego do Salto).

2. Diversidade e estrutura genética em espécies ameaçadas.

Populações reduzidas, além de sofrerem grandes perdas por fatores estocásticos ambientais (alterações climáticas fortes, por exemplo) e demográficos (Frankham et al., 2008) também se tornam mais susceptíveis geneticamente.

Em populações pequenas, a probabilidade de ocorrência de endogamia (cruzamento entre indivíduos aparentados), é maior. Esse evento aumenta na população a frequência de alelos delírios/letais, que geralmente se expressam apenas em

homozigose, causando depressão endogâmica, uma redução populacional ainda maior (Frankham et al., 2008).

Com a redução de indivíduos, também se perde grande parte da diversidade genética, mensurada pela diversidade de alélica encontrada em marcadores moleculares, por exemplo (Frankham et al., 2008). A mesma é responsável pela capacidade dos organismos de responderem às pressões ambientais e sua perda também pode tornar as espécies mais vulneráveis.

Assim, a perda de diversidade e a endogamia, causadas por um número populacional efetivo reduzido, associadas a fatores estocásticos, variação ambiental e perda e degradação de hábitat, causados pela ação antrópica, levam as espécies ameaçadas ao chamado vórtex de extinção, um padrão circular entre essas variáveis que reduz cada vez mais o número de indivíduos levando rapidamente a espécie a extinção (Frankham et al., 2008).

Diferentemente de ecossistemas marinhos, onde as populações apresentam alto grau de dispersão, os ecossistemas de água doce são mais propícios a criarem barreiras derivadas de suas formações geológicas, que diminuem ou impedem completamente o fluxo gênico entre populações de uma mesma espécie (Hiltsdorf et al., 2006; Hiltsdorf e Petre, 2002).

Além desses processos naturais, interferências humanas no ambiente, como a construção de barragens, que isolam permanentemente algumas populações de peixes e mudam regime hídrico de seus habitats, também são responsáveis pela estruturação das mesmas (Hanfling et al., 2004; Yamamoto et al., 2004).

A avaliação da estrutura genética de uma espécie distribuída em uma ou várias bacias hidrográficas, determina a intensidade com que o fluxo gênico entre suas populações vem ocorrendo (Hiltsdorf et al.; 2006). Segundo os mesmos autores, se a troca de genes entre estas tem sido limitada e uma determinada população que esteja sob pesca predatória, por exemplo, a possibilidade de sua recuperação genética pela migração é pequena e a chance de colapso da pesca em determinada região geográfica pode ocorrer.

3. Marcadores moleculares: microssatélites e genes mitocondriais.

Segundo Ashikaga e colaboradores (2015), o estudo prévio da diversidade genética dentro e entre populações de uma espécie obtida por meio da aplicação de marcadores moleculares é uma etapa inicial importante para o desenvolvimento de programas de manejo e conservação *in situ* e de empreendimentos que visem à sua reestruturação.

Diversos marcadores genéticos foram desenvolvidos ao longo do tempo para auxiliar na resolução de problemas taxonômicos e na elucidação da história evolutiva de populações, entre eles os microssatélites (Tautz, 1989) e a análise dos genes mitocondriais.

Os genes mitocondriais possuem características que os tornam excelentes para estudos populacionais de diversos tipos, entre elas a ausência de recombinação e herança materna (Saccone, 1994), e são utilizados para estudos genéticos nos mais diversos organismos (Hiltsdorf, 2011; Kavalco et al., 2013)

Hebert et al. (2003) propôs que a sequência de um fragmento do gene da subunidade 1 citocromo c oxidase seria suficiente para diferenciar a grande maioria das espécies animais (DNA barcoding ou código de barras de DNA). O sucesso desse diagnóstico de espécies reflete as elevadas taxas de variação na sequência desse gene e restrições intraespecíficas de divergência no DNA mitocondrial, em parte pela interação deste com o genoma nuclear.

Segundo Matioli (2011), a taxa de evolução é um dado importante na escolha do gene para resolver diferentes questões de genéticas de populações. Quando se pretende comparar populações ou espécies muito próximas, é apropriado o uso de genes com taxas de substituições mais altas.

O gene da região D-loop possui a maior taxa de substituição entre os genes mitocondriais, com valores entre 10^{-5} a 10^{-9} substituições por locus por geração (Loughheed et al., 2000). Dessa forma, a análise dessa região tem sido amplamente utilizada em trabalhos com diferentes organismos que tenham como objetivo avaliar diversidade genética (Lau et al., 1998; Iervolino et al., 2009; Zhang et al., 2016).

Quando combinados dados de mais de um marcador molecular, principalmente de genomas mitocondrial e nuclear, podemos ter uma estimativa mais robusta sobre diversidade genética do organismo de estudo.

Microssatélites ou Sequencias Simples Repetidas (SSR) correspondem a pequenos segmentos de 1 a 6 pares de bases organizados em tandem no genoma (Tautz e Renz, 1984, Tautz, 1989), amplificados por PCR a partir de uma pequena quantidade de DNA. Seus lócus possuem expressão codominante, assim, ambos os alelos de um indivíduo heterozigoto podem ser identificados.

Esses marcadores são amplamente distribuídos no genoma eucarioto e apresentam altos níveis de polimorfismo alélico (Chistiakov, 2006) gerado pela alta taxa de mutação, estimada em 10^{-3} eventos por loco por geração (Jarne e Lagoda, 1996), favorecendo a utilização dos mesmos como marcadores de diversidade e estrutura genética de populações.

Estudos com muitos grupos de organismos demonstram a possibilidade de amplificar sequencias de microssatélites utilizando primers desenvolvidos para uma determinada espécie em outras que são evolutivamente próximas. Trabalhos com Brycon desenvolvidos utilizando essa técnica têm obtido sucesso em avaliar diversidade e estruturação de populações (Matsumoto e Hilsdorf, 2009; Ashikaga et al., 2015).

2. OBJETIVOS

Em nota, o Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção (Machado et al., 2008) explicita a importância de identificar e preservar áreas onde existam populações saudáveis da espécie. Os estudos genéticos são essenciais para identificar o a diversidade genética das populações remanescentes e aumentar o conhecimento sobre a biologia das mesmas, que na maior parte das vezes é baixo, apesar de imprescindível para planos de conservação.

Assim, este trabalho tem como principais objetivos:

2.1. Objetivo geral

Avaliar a diversidade e estrutura genética em populações remanescentes de *Brycon nattereri* de ocorrência nas bacias hidrográficas dos rios Paraná e São Francisco na região do Alto Paranaíba, MG.

2.2. Objetivos específicos

Testar a aplicação da técnica de DNA-barcoding para as populações de *Brycon nattereri*, avaliando a estruturação obtida e as unidades taxonômicas operacionais conhecidas;

Testar a amplificação de loci de microssatélites no DNA de *B. nattereri* utilizando primers heterólogos desenvolvidos a partir do DNA de diferentes espécies do gênero *Brycon*;

Comparar os resultados obtidos a partir dos dados mitocondriais e nucleares.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Coleta e identificação dos locais de ocorrência

As coletas foram realizadas com a licença permanente SISBIO 15571-1 atribuída a Rubens Pazza. Os espécimes de *Brycon* foram coletados entre março e agosto (após o período de reprodução) em três pontos na cidade de Rio Paranaíba, MG. Dois deles, Ribeirão de Fora (19°13'44.5"S, 46°27'02.6"W) e Córrego do Salto (19°27'54.9"S, 46°13'57.2"W), são riachos pertencentes a bacia do Paraná, sub-bacia dos rios Paranaíba e Araguari, respectivamente. Um deles, Córrego da Espinha (19°02'32.8" S, 46°01'12.9"W), integra a bacia do São Francisco (Figura 3).

Foram realizadas expedições de coleta nos rios Funchal, Indaiazinho, Pirapitinga e Cipó, porém sem sucesso na captura de exemplares.

Os indivíduos capturados foram levados vivos ao laboratório para retirada de tecido para processamento para análise cromossômica e molecular, e posterior fixação e armazenamento apropriado, após sacrifício segundo normas do CONCEA (Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal). Na sequência, as amostras retiradas e espécimes foram depositados na Coleção de Vertebrados e Banco de Tecido e Suspensão Celular do Laboratório de Genética Ecológica e Evolutiva da Universidade Federal de Viçosa, campus de Rio Paranaíba (UFV-CRP). Foram identificados morfologicamente com o auxílio da chave de identificação do gênero *Brycon* em Lima (2017). Na tabela 1 estão representados todos os indivíduos utilizados neste estudo para todos os marcadores moleculares, bem como sua respectiva localidade.

Tabela 1: Relação entre número de registro, localidade e indivíduos utilizados no estudo.

| Registro de Laboratório | Ponto de Coleta | Coordenadas | Bacia Hidrográfica | SSR | D-Loop | COI |
|--------------------------------|------------------------|-----------------------------|---------------------------|------------|---------------|------------|
| 3661 | Ribeirão de Fora | 19°13'44.5"S, 46°27'02.6"W | Rio Paraná | x | 2 | 29 |
| 3664 | Ribeirão de Fora | 19°13'44.5"S, 46°27'02.6"W | Rio Paraná | x | 1 | |
| 3683 | Ribeirão de Fora | 19°13'44.5"S, 46°27'02.6"W | Rio Paraná | x | | 34 |
| 3684 | Ribeirão de Fora | 19°13'44.5"S, 46°27'02.6"W | Rio Paraná | x | 8 | 35 |
| 3830 | Ribeirão de Fora | 19°13'44.5"S, 46°27'02.6"W | Rio Paraná | x | 9 | |
| 3831 | Ribeirão de Fora | 19°13'44.5"S, 46°27'02.6"W | Rio Paraná | x | 10 | |
| 3832 | Ribeirão de Fora | 19°13'44.5"S, 46°27'02.6"W | Rio Paraná | x | 11 | 36 |
| 3833 | Ribeirão de Fora | 19°13'44.5"S, 46°27'02.6"W | Rio Paraná | x | | |
| 3834 | Ribeirão de Fora | 19°13'44.5"S, 46°27'02.6"W | Rio Paraná | x | | |
| 3835 | Ribeirão de Fora | 19°13'44.5"S, 46°27'02.6"W | Rio Paraná | x | | |
| 3836 | Ribeirão de Fora | 19°13'44.5"S, 46°27'02.6"W | Rio Paraná | x | 3 | |
| 3837 | Ribeirão de Fora | 19°13'44.5"S, 46°27'02.6"W | Rio Paraná | x | 4 | |
| 3840 | Ribeirão de Fora | 19°13'44.5"S, 46°27'02.6"W | Rio Paraná | x | | |
| 3843 | Córrego da Espinha | 19°02'32.8" S, 46°01'12.9"W | Rio São Francisco | x | | 37 |
| 3844 | Córrego da Espinha | 19°02'32.8" S, 46°01'12.9"W | Rio São Francisco | x | 14 | |
| 3845 | Córrego da Espinha | 19°02'32.8" S, 46°01'12.9"W | Rio São Francisco | x | 15 | 30 |
| 3846 | Córrego da Espinha | 19°02'32.8" S, 46°01'12.9"W | Rio São Francisco | x | 16 | |
| 3847 | Córrego da Espinha | 19°02'32.8" S, 46°01'12.9"W | Rio São Francisco | x | 17 | 38 |
| 3848 | Córrego da Espinha | 19°02'32.8" S, 46°01'12.9"W | Rio São Francisco | x | 18 | 39 |
| 3849 | Córrego da Espinha | 19°02'32.8" S, 46°01'12.9"W | Rio São Francisco | x | | |
| 3907 | Córrego do Salto | 19°27'54.9"S, 46°13'57.2"W | Rio Paraná | x | | 40 |
| 3908 | Córrego do Salto | 19°27'54.9"S, 46°13'57.2"W | Rio Paraná | x | 20 | |
| 3909 | Córrego do Salto | 19°27'54.9"S, 46°13'57.2"W | Rio Paraná | x | 21 | |
| 3910 | Córrego do Salto | 19°27'54.9"S, 46°13'57.2"W | Rio Paraná | x | 22 | |
| 3911 | Córrego do Salto | 19°27'54.9"S, 46°13'57.2"W | Rio Paraná | x | 23 | |

| | | | | | | |
|------|------------------|----------------------------|------------|---|----|----|
| 3928 | Córrego do Salto | 19°27'54.9"S, 46°13'57.2"W | Rio Paraná | x | 24 | |
| 3929 | Córrego do Salto | 19°27'54.9"S, 46°13'57.2"W | Rio Paraná | x | 6 | |
| 3930 | Córrego do Salto | 19°27'54.9"S, 46°13'57.2"W | Rio Paraná | x | 25 | 42 |
| 3931 | Córrego do Salto | 19°27'54.9"S, 46°13'57.2"W | Rio Paraná | x | | |
| 3932 | Córrego do Salto | 19°27'54.9"S, 46°13'57.2"W | Rio Paraná | x | 26 | 32 |
| 3933 | Córrego do Salto | 19°27'54.9"S, 46°13'57.2"W | Rio Paraná | x | 27 | |

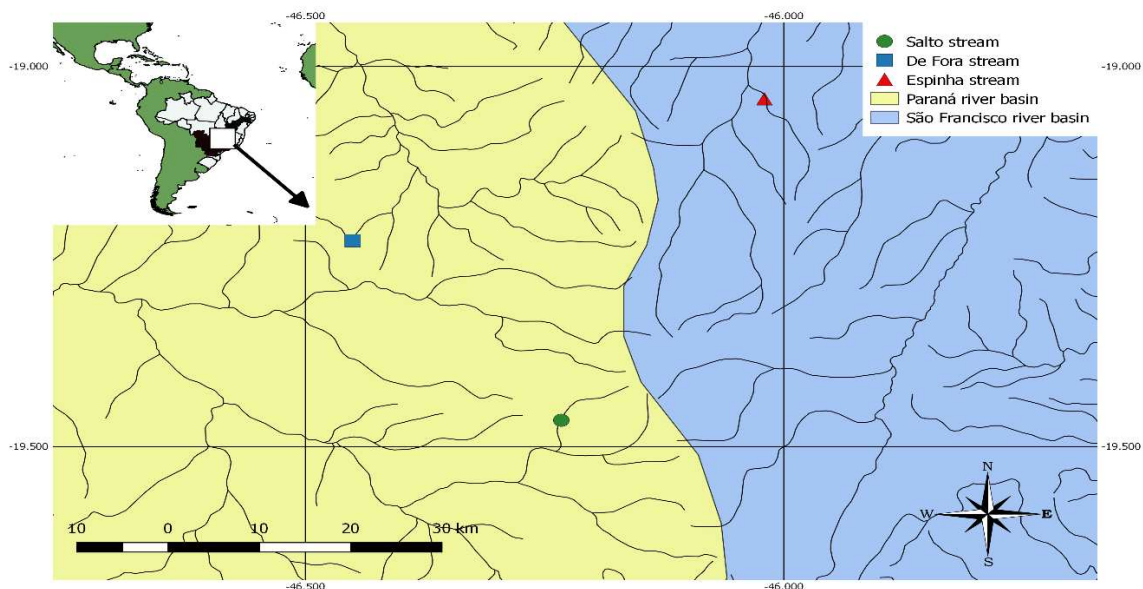


Figura 3: Distribuição dos pontos amostrados. Em preto, Ribeirão de Fora, em verde, Córrego do Salto e em vermelho, Córrego da Espinha.

3.2 Extração de DNA genômico total

O DNA total para as análises com marcadores moleculares foi extraído de fragmentos de tecidos como nadadeiras e fígado, em um processo realizado segundo instruções do fabricante de um kit comercial de extração e purificação. Foi verificada a viabilidade do DNA extraído em gel de agarose 1%, e a quantificação realizada a partir do padrão de peso molecular Low Mass Ladder.

3.3 PCR para amplificação de loci microssatélites

Foram testados dezesseis pares de primers desenvolvidos a partir do DNA de diferentes espécies do gênero *Brycon* (amplificação cruzada), a fim de identificar loci polimórficos dos microssatélites e a temperatura média (T_m) que melhor se ajusta à reação para o DNA das amostras estudadas. Na tabela 2, os mesmos estão indicados, bem como a sequência, temperaturas médias de anelamento e a espécie a partir da qual foram obtidos.

Para a reação de amplificação foi preparado um mix com o volume final de 13 μL , contendo 3.5 μL de DNA molde em solução de uso, 1.5 μL tampão 10X Taq (0-mM KCl, 10-mM Tris-HCl, 0.1% Triton X-100), 1.0 μL MgCl_2 , 1.0 μL de cada primer, 1.0 μL de

mix dNTP, 3.2µL de água ultra pura e 0.3µL Taq-polimerase. A reação foi conduzida em um termociclador, em ciclos de diferentes temperaturas: à temperatura de 95°C para desnaturação inicial por 2 minutos; ciclos repetidos de 94°C para desnaturação por 30 segundos, temperaturas variáveis de acordo com a Tm de cada primer por 30 segundos para anelamento dos mesmos, e 72°C por um minuto para extensão.

Tabela 2: Relação de primers testados na amplificação cruzada.

| Primer | Sequência | Espécie de origem | Tm média |
|---------------|--|---------------------------------------|-----------------|
| BoM1 | F: CCATCTCTACT TTTTGGTTCC R: TGCCCAGAT ACAGCCC | Brycon opalinus (Barroso et al, 2003) | 52,7 °C |
| BoM2 | F: CTGGGCAGC GGAAGAG R: CCCACATCTCT CCCCTTCG | Brycon opalinus (Barroso et al, 2003) | 56,6 °C |
| Bom13 | F: CATTTCCTCA GTCCTTTTCAG C R: CCCACTTAG GGTCGCAC | Brycon opalinus (Barroso et al, 2003) | 54,8 °C |
| BC48-6 | F: GGAGGACAG TGAGTGGACG R: GTTTGCTTGG ACATCTGC | Brycon cephalus (Barroso, 2003) | 54,6 °C |
| BC48-10 | F: GTTCCACCTA TTGCTGACAC R: GAAAATACT ACTCTACGGGG AC | Brycon cephalus (Barroso, 2003) | 52,8 °C |
| BoM5 | F: CGACCACAA TAGGATTAGGG R: CTGGAGTTTG TGTGTGGA | Brycon opalinus (Barroso et al, 2003) | 52,2 °C |
| BoM6 | F: GGAGTTTGTG TGTGGAGACCG AG R: GCACGCAGA CACCAGA | Brycon opalinus (Barroso et al, 2003) | 57,5 °C |
| BoM7 | F: CTCTGCCCCA GGTCTCACT R: CGGGAGTGA CGAAATG | Brycon opalinus (Barroso et al, 2003) | 54,5 °C |
| BoM12 | F: GCAGCAGAA AGAAACAG | Brycon opalinus (Barroso et al, 2003) | 50 °C |

| | | | |
|-------|--|--------------------------------------|---------|
| | R:CGGGGAGAT TTCAACCT | | |
| Bh 5 | F:CTTCCACTCA TACCGGCACT R:ACATCTGGC ATTAGGCATAG | Brycon hilarii (Sanches et al, 2006) | 54,4 °C |
| Bh 15 | F:GAGAGCATT GTCAGGATTTA R:ACTAATGAC TGCTACTGCGG | Brycon hilarii (Sanches et al, 2006) | 52 °C |
| Bh 16 | F:CCTCCAATGA AAACAGTGCG R:ACGACTTAG CCACCCACCCT | Brycon hilarii (Sanches et al, 2006) | 57 °C |
| Bh 8 | F:CCATGGCTCA ACACAGATAT R:TGTACGAAT CCTGAAATGCT | Brycon hilarii (Sanches et al, 2006) | 51,9 °C |
| Bh 6 | F:GCGTTGCGTG TGTATGTAA R:AGAGGTGTC CACAAAGTTTT | Brycon hilarii (Sanches et al, 2006) | 52,9 °C |
| Bh 17 | F:GTCAGCACTC AGCACATAGC R:AGAGAGCCT GAAAGTGAGTC | Brycon hilarii (Sanches et al, 2006) | 54,9 °C |
| Bh 13 | F:AGCAATTTAA GCAAGTGAAG R:GCGTCGGAG CAGTAGTTATA | Brycon hilarii (Sanches et al, 2006) | 51,4 °C |

A visualização dos produtos de PCR e genotipagem foi realizada em gel de agarose 4%, que foram posteriormente fotografados e documentados.

3.4 PCR para amplificação dos genes mitocondriais D-loop e COI

Para amplificação do gene mitocondrial da citocromo oxidase I foram utilizados os primers Fish R1 - 5' TAGACTTCTGGGTGGCCAAAGAATCA3' e Fish F1 - 5' TCAACCAACCACAAAGACATTGGCAC3' (Ward, 2005). A PCR foi realizada com amostras em um volume final de 25µL para COI (2,5µL de tampão da enzima, 1µL de MgCl₂, 1µL de cada primer, 0,2µL de Taq DNA polimerase, 12,8µL de água ultra-pura, 1,5µL de dNTP e 5µL da solução de uso de DNA extraído), em um termociclador à temperatura de 95°C para desnaturação inicial por 2 minutos; e ciclos repetidos de 94°C para desnaturação por 30 segundos, 58°C por 30 segundos para anelamento dos primers

e 72°C por um minuto para extensão. Para a região D-Loop foram utilizados os primers BRYDLFE 1 - F: TTARAATCCYCCCTAGCGCC e BRYDLFE 2 - R: ATACTGGTTGGTGGTCTCTTAC¹ que amplifica região a partir da porção codificadora da treonina até a primeira parte da região D-Loop. A reação também foi preparada com o volume final de 25µL utilizando as mesmas quantidades dos reagentes citados anteriormente, em um termociclador à temperatura de 94°C para desnaturação inicial por 4 minutos; e ciclos repetidos de 94°C para desnaturação por 15 segundos, 56°C por 30 segundos para anelamento dos primers e 72°C por dois minutos para extensão.

3.5 Análise de dados de Microssatélites

O polimorfismo genético de cada locus para cada população foi estimado a partir do número de alelos por locus, heterozigidade observada e esperada usando o software online GENEPOP 4.2 (Rousset, 2008) com valores de significância estimados pelo método de cadeias de Markov com 1000 interações.

No mesmo software foram realizados os testes de equilíbrio de Hardy-Weinberg com abordagem de randomização em Cadeia-Markov (Guo-Thompson, 1992), e desequilíbrio de ligação em cada locus/população a nível de significância $\alpha = 0,05$.

A diferenciação geral das populações foi estimada utilizando os parâmetros da estatística F de Wright (Weir & Cockerham, 1984) no software GENEPOP 4.2 (Rousset, 2008), como F_{IS} (índice de fixação de alelos) e F_{ST} (coeficiente de endogamia).

O software BOTTLENECK 1.2.02 (Cornuet & Luikart, 1996) foi utilizado para testar se houve redução recente no tamanho efetivo das populações de acordo com as diferenças entre excesso ou deficiência de heterozigotos e no número de alelos em cada população.

Para testar a estruturação das populações amostradas, foi realizado o procedimento Bayesiano clustering no software STRUCTURE 2.3.4 (Pritchard et al., 2000). Foi testado o modelo de sem mistura, com índices de K variando de 2 a 10. Para cada K foram realizadas cinco repetições, 100.000 burn-ins e 500.000 simulações de Monte Carlo via Cadeia de Markov (Torres, 2012). Para identificar o K ideal o conjunto

¹ Lara Endres, comunicação pessoal, 16/08/2017.

de resultados gerados foi submetido a análise no software online Structure Harvester v0.6.94 (Earl et al., 2012).

3.6 Análise de dados de Mitocondriais

As sequências do marcador D-Loop e do gene mitocondrial da citocromo oxidase I(COI) foram alinhadas com o algoritmo Clustal W (Thompson et al., 1994) e editadas no software MEGA v.7 (Tamura et al., 2013). Às sequências de COI dos indivíduos coletados neste estudo, foram adicionadas quatro sequências de *B. nattereri* obtidas do GenBank.

No mesmo software foram calculados o número de sítios polimórficos, bem como a diversidade total e intra-populacional, distância genética entre indivíduos dentro de uma mesma população bem como as distâncias entre populações diferentes.

A análise bayesiana de agrupamento foi realizada no software MrBayes (Huelsenbeck e Ronquist, 2001) para ambos os genes, com três milhões de gerações, sump burnin de 7500 e sumt burnin de 100. Os dendrogramas gerados foram visualizados no software FigTree v1.4.3.

4. RESULTADOS

4.1. Microssatélites

Dos dezesseis primers testados, sete amplificaram satisfatoriamente, porém destes, apenas quatro apresentaram polimorfismo para as três populações de *B. nattereri* amostradas. Foram eles BOM12, amplificado a 48,3 °C; BOM2 a 55°C; BOM1 a 51,3°C e BH13 a 54°C, com um total de 24 alelos em todos os loci. Todos os loci apresentaram seis alelos cada. O número de alelos observados na população de Ribeirão de Fora foi de oito, doze em Córrego da Espinha e treze em Córrego do Salto. A tabela 3 demonstra a distribuição dos alelos por locus e sua frequência nas populações.

Tabela 3: Relações de frequências alélicas em cada locus por população.

| Populações | Alelos | | | BOM 2 | | |
|--------------------|--------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | 110 | 120 | 124 | 126 | 130 | 150 |
| Ribeirão de Fora | 0.000 | 0.000 | 0.077 | 0.923 | 0.000 | 0.000 |
| Córrego da Espinha | 0.000 | 0.071 | 0.000 | 0.929 | 0.000 | 0.000 |
| Córrego do Salto | 0.136 | 0.045 | 0.000 | 0.636 | 0.091 | 0.091 |

| Populações | Alelos | | | BOM 1 | | |
|--------------------|--------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | 90 | 100 | 150 | 152 | 156 | 160 |
| Ribeirão de Fora | 0.000 | 0.050 | 0.615 | 0.000 | 0.000 | 0.000 |
| Córrego da Espinha | 0.071 | 0.429 | 0.429 | 0.071 | 0.000 | 0.000 |
| Córrego do Salto | 0.050 | 0.400 | 0.000 | 0.000 | 0.500 | 0.500 |

| Populações | Alelos | | | BH13 | | |
|--------------------|--------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | 160 | 170 | 176 | 180 | 186 | 190 |
| Ribeirão de Fora | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.231 | 0.231 | 0.538 |
| Córrego da Espinha | 0.143 | 0.071 | 0.214 | 0.571 | 0.000 | 0.000 |
| Córrego do Salto | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.182 | 0.182 | 0.636 |

| Populações | Alelos | | | BOM12 | | |
|--------------------|--------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | 126 | 130 | 140 | 176 | 180 | 186 |
| Ribeirão de Fora | 0.692 | 0.000 | 0.000 | 0.308 | 0.000 | 0.000 |
| Córrego da Espinha | 0.357 | 0.286 | 0.000 | 0.000 | 0.143 | 0.214 |

| | | | | | | |
|------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Córrego do Salto | 0.545 | 0.000 | 0.091 | 0.000 | 0.182 | 0.182 |
|------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|

A heterozigosidade observada (H_o) variou de 0,000 no locus BOM2 em Ribeirão de Fora a 0,9009 no mesmo locus no Córrego do Salto. A heterozigosidade esperada (H_e) variou entre as populações e loci, de 0,1429 em BOM2 no Córrego da Espinha a 0,7857 no locus BOM 12 na mesma população. Todos os valores de H_o e H_e em todos os loci nas três populações estão demonstrados na tabela 4, enquanto valores totais dos mesmos e F_{is} são apresentados na tabela 5. Os valores dos testes para desequilíbrio de ligação indicam que os loci analisados não se encontram ligados na maioria das populações, exceto por BOM1 e BOM2 em Ribeirão de Fora ($p=0,0337$) e BH13 e BOM12 na mesma população ($p=0,0531$).

Tabela 4: Resumo dos dados estatísticos de diversidade genética nos quatro loci por população de *B. nattereri*, onde (A) é número alelos; (H_o) heterozigosidade observada; (H_e) heterozigosidade esperada; (P) valor de p para o teste equilíbrio de Hardy-Weinberg para deficiência de heterozigotos; (F_{is}) índice de fixação intra-populacional; (N) número de indivíduos.

| Microsatélite | Ribeirão de Fora | Córrego da Espinha | Córrego do Salto |
|---------------|------------------|--------------------|------------------|
| BOM 2 | | | |
| A | 2 | 2 | 5 |
| H_o | 0.0000 | 0.1429 | 0.9009 |
| H_e | 0.1538 | 0.1429 | 0.6091 |
| P | 0.0384 | - | 0.0000 |
| F_{is} | 1.0000 | -0.0000 | 0.8507 |
| N | 13 | 7 | 11 |
| BOM 1 | | | |
| A | 2 | 4 | 4 |
| H_o | 0.7692 | 1.0000 | 0.9000 |
| H_e | 0.4808 | 0.6429 | 0.6000 |
| P | 1.0000 | 1.0000 | 0.9941 |
| F_{is} | -0.6000 | -0.5556 | -0.5000 |
| N | 13 | 7 | 11 |

| | | | |
|-----------------|---------|--------|---------|
| BH 13 | | | |
| A | 3 | 4 | 3 |
| H _o | 0.0000 | 0.5714 | 0.0000 |
| H _e | 0.6538 | 0.6548 | 0.5818 |
| P | 0.0000 | 0.0827 | 0.0003 |
| F _{is} | 1.0000 | 0.1273 | 1.0000 |
| N | 13 | 7 | 11 |
| BOM 12 | | | |
| A | 2 | 4 | 4 |
| H _o | 0.6154 | 0.7143 | 0.7273 |
| H _e | 0.4359 | 0.7857 | 0.6545 |
| P | 1.0000 | 0.2986 | 0.1540 |
| F _{is} | -0.4118 | 0.0909 | -0.1111 |
| N | 13 | 7 | 11 |

Tabela 5: Valores globais de heterozigidade observada (H_o), esperada (H_e) e (F_{is}) índice de fixação intra-populacional.

| População | H _o Total | H _e Total | F _{is} |
|--------------------|----------------------|----------------------|-----------------|
| Ribeirão de Fora | 0.3462 | 0.4311 | 0.1970 |
| Córrego da Espinha | 0.6071 | 0.5565 | -0.0909 |
| Córrego do Salto | 0.4186 | 0.6116 | 0.3156 |

Os valores de p encontrados para o teste de equilíbrio de Hardy-Weinberg para deficiência de heterozigotos variaram de 0.000 no locus BOM2 e BH13 em Ribeirão de Fora e Córrego do Salto, respectivamente a 1.000 no locus BOM1 e BOM12 em Ribeirão de Fora.

O (F_{is}) atingiu valores negativos em vários loci nas populações analisadas (tabela 3). O menor valor observado foi -0.600 no locus BOM 1 em Ribeirão de Fora enquanto o maior foi de 1.000 no locus BH 13 na mesma população. Os valores de F_{st} foram baixos

para a maioria dos lócus em todas as populações, variando do mínimo de -0,1216 ao máximo de 0,6840, ambos entre Córrego da Espinha e Córrego do Salto (tabela 6). A estimativa geral do coeficiente de endogamia entre as populações par-a-par estão demonstrados na tabela 7. O número calculado de migrantes por geração após correção de tamanho populacional foi de 0.447922.

Tabela 6: Estimativas de F_{st} por lócus por população par a par.

| BOM 2 | | |
|--------------------|------------------|--------------------|
| População | Ribeirão de Fora | Córrego da Espinha |
| Córrego da Espinha | -0.0443 | |
| Córrego do Salto | -0.0845 | -0.1216 |
| BOM1 | | |
| População | Ribeirão de Fora | Córrego da Espinha |
| Córrego da Espinha | 0.0175 | |
| Córrego do Salto | -0.0128 | 0.0128 |
| BH 13 | | |
| População | Ribeirão de Fora | Córrego da Espinha |
| Córrego da Espinha | 0.6597 | |
| Córrego do Salto | -0.0737 | 0.6840 |
| BOM12 | | |
| População | Ribeirão de Fora | Córrego da Espinha |
| Córrego da Espinha | 0.0097 | |
| Córrego do Salto | 0.0171 | -0.0224 |

Tabela 7: Estimativa F_{st} por todos os loci estimado por tamanho alélico e populações par a par.

| População | Ribeirão de Fora | Córrego da Espinha |
|--------------------|------------------|--------------------|
| Córrego da Espinha | 0.0567 | |
| Córrego do Salto | -0.0014 | 0.0334 |

A análise de gargalo populacional no software Bottleneck evidenciou em Ribeirão de Fora um loci com deficiência de heterozigotos (BH 13: 0.0950) e três com excesso (BOM2: $p=0.4260$, BOM1: $p=0.1250$, BOM 12: $p=0.2250$); no Córrego da Espinha um

loci com deficiência de heterozigotos (BOM12: $p=0.0630$) e três com excesso (BOM2: $p= 0.3850$, BOM1: $p= 0.4280$, BH13: $p= 0.4960$); no Córrego do Salto quatro loci com excesso de heterozigotos (BOM2: $p= 0.2370$, BOM1: $p= 0.4940$, BH13: $p= 0.2740$ e BOM12: $p= 0.3010$).

A partir da inferência bayesiana de estrutura populacional realizada no software STRUCTURE, o valor ideal de K encontrado foi de 3 populações. Como demonstrado na figura 4, não se pode observar estruturação entre as mesmas nesse valor de K. Apesar disso, em $K=2$ nota-se que uma separação levemente mais consistente entre os indivíduos, sinalizando a existência de dois grupos principais (figura 5).

Figura 4: Análise de estruturação genética com inferência Bayesiana (Structure v.2.3.4) de três populações de Brycon nattereri por quatro loci de marcadores microssatélites, assumindo $K = 3$.

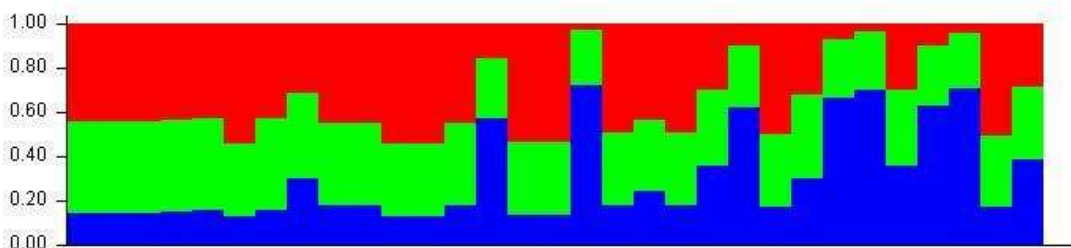
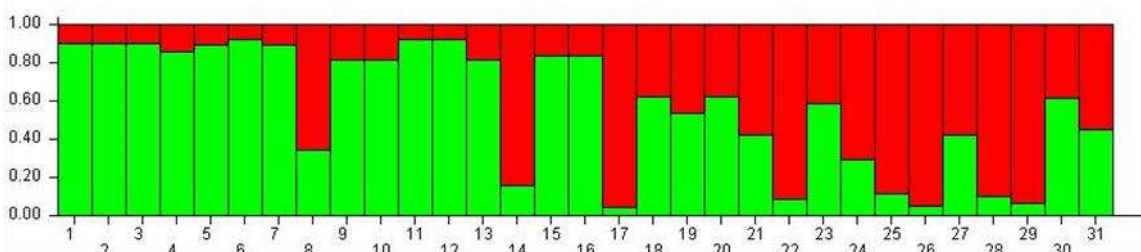


Figura 5: Análise de estruturação genética com inferência Bayesiana (Structure v.2.3.4 Pritchard, 2000) de três populações de Brycon nattereri por quatro loci de marcadores microssatélites, assumindo $K = 2$.



4.2. Genes mitocondriais

As sequências do gene mitocondrial da citocromo oxidase I (COI) tiveram em média 623 pares de bases, com uma proporção média de 30.3 de timina, 26.2 de citosina, 26,1 de adenina e 17,4 de guanina. Apenas um sítio polimórfico foi encontrado em cada população, de um total geral de 25. A diversidade intra-populacional calculada foi de 0,001 enquanto a global foi 0,021. A distância genética entre indivíduos do mesmo grupo foi em Ribeirão de Fora igual a 0,001 bem como no Córrego da Espinha, enquanto no

Córrego do Salto foi de 0,000. Comparativamente, a distância entre Ribeirão de Fora e Córrego da Espinha foi de 0,041; Ribeirão de Fora e Córrego do Salto, 0,001 e Córrego da Espinha e Córrego do Salto: 0,040.

A região D-Loop amplificada teve um total médio de 424 pares de bases, sendo 33,8 timina, 19,0 citosina, 38,7 adenina e 8,5 guanina. Ribeirão de Fora apresentou 14 sítios polimórficos, Córrego do Salto, 15 e Córrego da Espinha, 32; de um total de 70. A diversidade entre os indivíduos de mesma população foi de 0,015 enquanto a global foi de 0,025. A distância genética entre indivíduos do mesmo grupo de 0,007 em Ribeirão de Fora; 0,032 no Córrego da Espinha e 0,005 no Córrego do Salto. Comparativamente, a distância genética entre indivíduos do Ribeirão de Fora e Córrego da Espinha foi de 0,048; Córrego da Espinha e Córrego do Salto 0,048 e Ribeirão de Fora e Córrego do Salto 0,007.

A análise bayesiana de agrupamento no software MrBayes não mostrou agrupamento consistente entre as três populações amostradas. Nos dendrogramas (figuras 6 e 7) gerados pelos dois marcadores analisados (COI e D-Loop), os indivíduos pertencentes Ribeirão de Fora e Córrego do Salto, pertencentes a bacia do rio Paraná, ficaram agrupados entre si, e separados de Córrego da Espinha, que manteve seus indivíduos juntos em ambas as análises.

Figura 6: Dendrograma D-Loop gerado no software Mr Bayes pós análise com com três milhões de gerações, sump burnin de 7500 e sumt burnin de 100; visualizado no software FigTree v1.4.3.

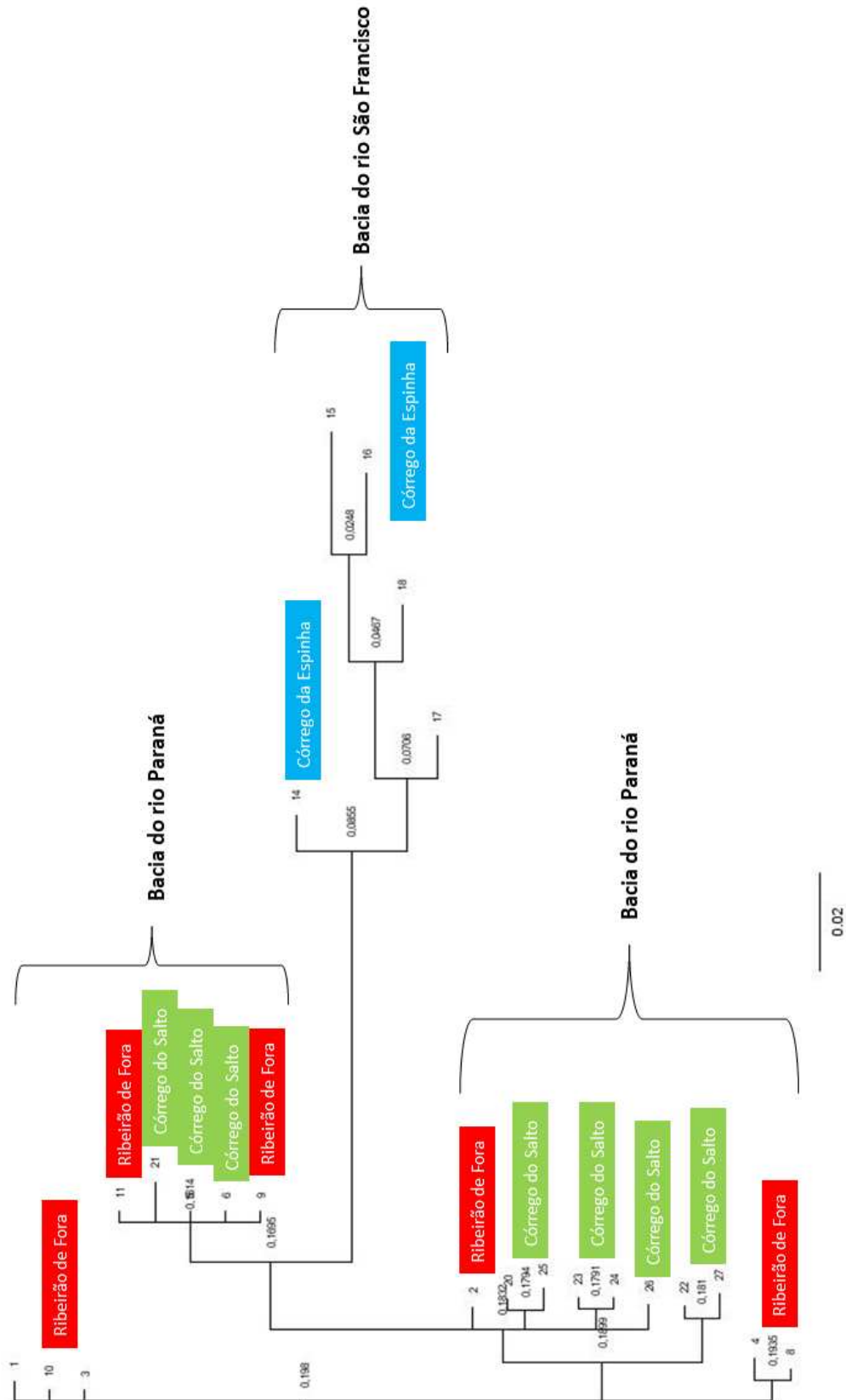
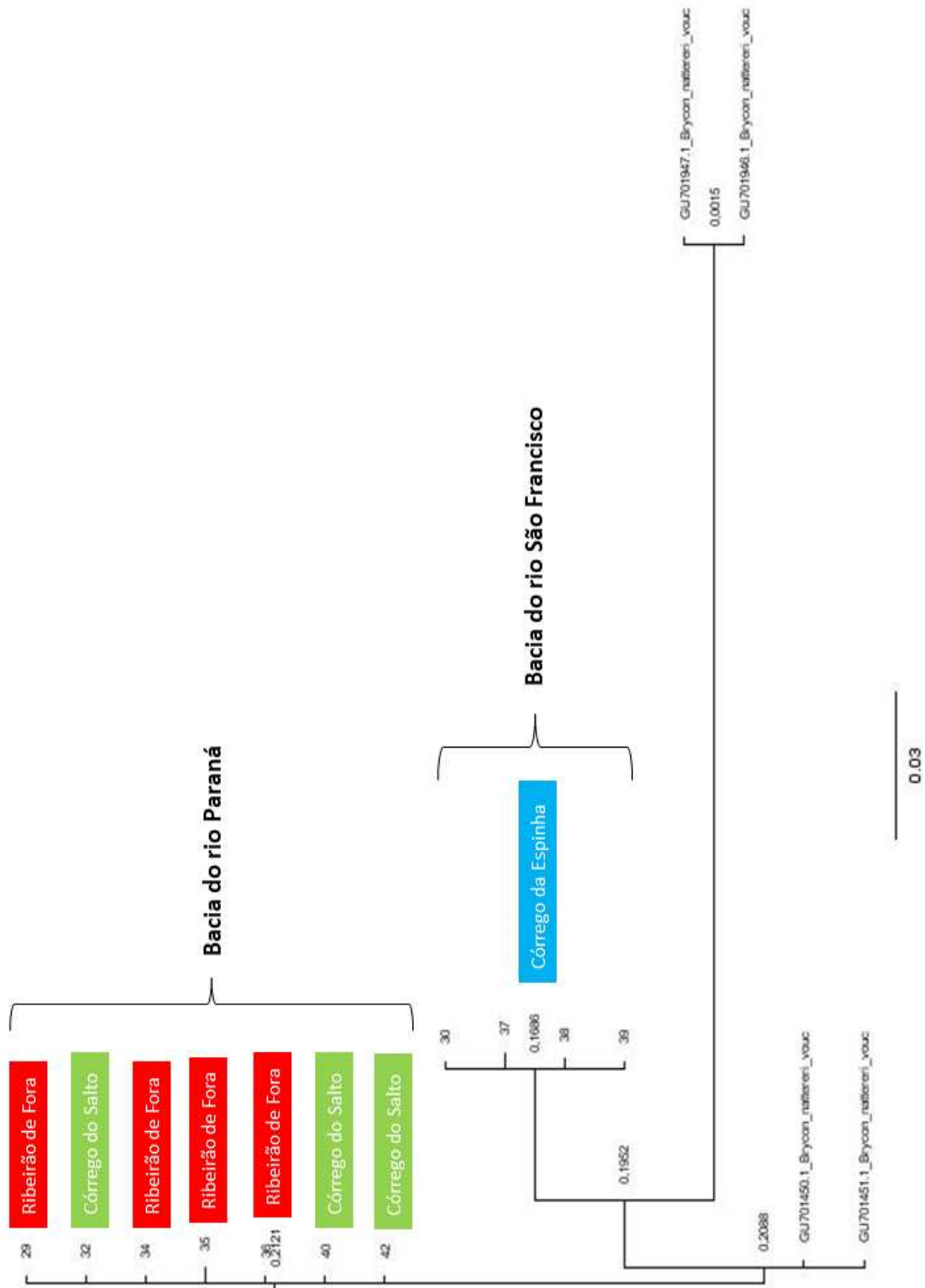


Figura 7: Dendrograma COI gerado no software Mr Bayes pós análise com com três milhões de gerações, sump burnin de 7500 e sumt burnin de 100; visualizado no software FigTree v1.4.3.



5. DISCUSSÃO

As populações de *Brycon nattereri* da região do Alto Paranaíba, que possui as drenagens dos rios Paranaíba e São Francisco, parecem compartilhar uma história demográfica antiga. Embora os marcadores mitocondriais apresentem árvores com topologias contrastantes, na verdade elas contam histórias sobre diferentes eventos. A COI foi eficiente em separar os grupos por suas drenagens, e o D-loop indica que a população do rio São Francisco é provavelmente fruto de um evento migração a partir de exemplares do rio Paranaíba. Os marcadores nucleares (microsatélites), por sua vez, corroboram a formação recente das populações, embora estas apresentem tendência de estruturação populacional.

A biologia molecular atual disponibiliza instrumentos capazes de fornecer dados de variabilidade genética existentes nos organismos e relacioná-las com fatores ambientais naturais e antropogênicos (Ashikaga et al., 2015). Marcadores moleculares co-dominantes, os microsatélites apresentam alta taxa de evolução (estimadas entre 10^{-3} e 10^{-4} por locus por geração) e são comumente escolhidos para análises de variabilidade genética e estrutura populacional.

A utilização de primers microsatélites heterólogos é uma prática comum para estudos de diversidade genética em espécies para as quais não se tem conhecimento genômico suficiente para a produção de iniciadores específicos, ou mesmo para tornar menos custoso o uso deste marcador molecular. No gênero *Brycon*, essa metodologia já foi aplicada em trabalhos com *B. insignis* (Matsumoto e Hilsdorf, 2009), *B. orbignyanus* (Ashikaga et al., 2015) e *B. hilarii* (Okazaki et al., 2016) e o número de loci polimórficos encontrados nesses estudos são similares ao encontrado no presente trabalho.

O número de alelos encontrados nas populações de *B. nattereri* avaliadas, vinte quatro no total, foi menor que o encontrado em vários estudos com espécies do gênero *Brycon*. Em um trabalho com *Brycon insignis*, Matsumoto e Hilsdorf (2009) testaram cinco loci microsatélites heterólogos e identificaram sessenta e um alelos, enquanto Okazaki e colaboradores (2016) identificaram 72 alelos, também em cinco loci.

Barroso e colaboradores (2005) mostraram que o número reduzido de amostras pode culminar num número no número menor de alelos encontrados e atenta para a dificuldade de obter número amplo de amostras pelas condições ambientais pobres dos rios.

Segundo Luikart e Cornuet (1998), em populações naturais, o número de alelos e a heteroziguidade em loci neutros resultam de um equilíbrio entre mutação e deriva genética. De acordo com os mesmos autores, a heteroziguidade esperada em um locus em equilíbrio é calculada pelo número de alelos observados e o tamanho da amostra de indivíduos. Em populações com gargalos recentes, o equilíbrio mutação-deriva é interrompido e a heteroziguidade observada por loci excede a computada por número de alelos amostrados, gerando excesso de heterozigotos (Cornuet e Luikart, 1996).

Todas as populações de *B. nattereri* deste estudo apresentaram valores mais altos de heteroziguidade que o esperado. A heteroziguidade observada (H_o) foi maior que a heteroziguidade esperada (H_e) em praticamente todos os loci em todas as populações (exceto no locus BH13) quando analisados separadamente. Apesar disso, em valores globais apenas no Córrego da Espinha a H_o superou o valor de H_e .

No teste de equilíbrio de Hardy-Weinberg para deficiência de heterozigotos, foram encontrados, em Ribeirão de Fora, dois loci com deficiência (BOM2 e BH13) e dois com excesso de heterozigotos (BOM 1 e BOM 12); três loci com excesso de heterozigotos no Córrego da Espinha e no Córrego do Salto foram observados também dois loci com deficiência (BOM 2 e BH 13) e dois com excesso de heterozigotos (BOM 1 e BOM12). Foram identificados excessos de heterozigotos nas três populações, mas principalmente no Córrego do Salto, onde os quatro loci apresentaram excesso.

Gargalos geram “excesso de heterozigotos” porque os alelos são perdidos mais rapidamente que a heteroziguidade durante esse evento e ainda muitos alelos podem se perder sem redução imediata de heteroziguidade (Luikart e Cornuet, 1998). Corroborando esse fato, as populações de *B. nattereri* avaliadas neste estudo apresentam um número reduzido de alelos se comparadas a espécies do mesmo gênero e excesso de heterozigotos, tornando inquestionável que todas passaram por gargalos recentes e, se estendermos para este estudo as conclusões de Matsumoto e Hilsdorf (2009), podemos considerar que o excesso de heterozigotos indica redução demográfica nas populações deste estudo.

As possíveis causas do gargalo nas populações de *B. nattereri* analisadas são similares às que provocam redução populacional em várias espécies do gênero: as alterações antropogênicas no habitat natural. Ribeirão de Fora, Córrego da Espinha e Córrego do Salto são populações remanescentes encontradas em ambientes que ainda conservam

algumas características ambientais propícias para a sobrevivência da espécie, como leito rochoso e de regime lótico, com mata ciliar minimamente preservada no entorno.

Entretanto, estas regiões estão inseridas em uma área de intensa atividade agrícola, onde muitos ambientes com regime hídrico como os acima citados possuem histórico de represamento para abastecimento de culturas irrigadas. Apesar da escassez de estudos sobre química da água nessa região, é provável que o uso de defensivos agrícolas utilizados nessas culturas também possa afetar a comunidade de peixes como um todo, levando a redução mesmo de espécies de médio a grande porte, como *B. nattereri*. Além disso, a atividade pesqueira, mesmo que amadora, contribui ainda mais para a redução populacional.

Os valores de F_{is} , índice que mede endogamia intrapopulacional, foram negativos para as três populações na maioria dos loci, confirmando excesso de heterozigotos nas mesmas, já constatado pelas outras análises. Esse índice é amplamente utilizado como comparativo de diferenciação genética, permitindo uma análise de estrutura populacional que não engloba frequências alélicas e heterozigosidade (Hartl e Clark, 2010).

Os maiores valores de F_{st} foram encontrados entre as populações de diferentes bacias hidrográficas (0,0567 entre Córrego da Espinha da bacia do São Francisco e Ribeirão de Fora da bacia do Paraná, e 0,0334 entre Córrego da Espinha e Córrego do Salto, também pertencente a bacia do Paraná). Apesar disso, os valores encontrados são ainda muito baixos (Wright, 1978), principalmente entre Córrego do Salto e Ribeirão de Fora (-0,0014), que pertencem à mesma bacia, indicando que não existe estruturação significativa entre as populações analisadas.

Esse resultado difere daqueles encontrados em estudos com outras espécies do gênero, que mostraram populações altamente estruturadas (Matsumoto e Hilsdorf, 2009; Ashikaga et al., 2015). Apesar da baixa estruturação encontrada, o número de migrantes por geração também foi baixo (0.447922), mesmo quando comparadas apenas Ribeirão de Fora e Córrego do Salto, ambas populações do rio Paranaíba (0.298094), evidenciando que existe baixo fluxo gênico entre as mesmas e assim, tendência de que se tornem mais estruturadas ao longo das gerações.

A análise bayesiana de agrupamento realizada no Structure com K ideal = 3 confirmou o que os dados de F_{st} sinalizaram, a inexistência de estrutura incipiente entre as três

populações de *B. nattereri*. Esse resultado difere daquele encontrado por Araujo (2012) avaliando o mesmo número de populações de *B. amazonicus*. Apesar disso, em $K = 2$ pôde-se observar a formação de dois agrupamentos um pouco mais definidos, que correspondem os indivíduos pertencentes às diferentes bacias hidrográficas, dos rios Paraná e São Francisco.

A estruturação genética de grupos selvagens de peixes de água doce pode ser muitas vezes influenciada por fatores geológicos (Allan e Flecker, 2003). Na região onde foi conduzido o presente estudo, as bacias acima citadas foram separadas pela formação do Arco do Alto Paranaíba, que faz parte do Cinturão de Brasília e representa um importante evento nas drenagens do Alto Paraná e São Francisco, com a formação de suas principais nascentes caracterizadas por eventos neotectônicos ocorrendo no decorrer de 2 ou 3 milhões de anos (Campos & Dardene, 1997). O surgimento desse arco de rochas separou populações de peixes e é responsável pela estruturação observada em muitas delas.

Os dendrogramas gerados a partir das sequências dos genes mitocondriais (D-Loop e COI) mostram que os indivíduos pertencentes a uma mesma bacia hidrográfica tendem a ficar agrupados, independentemente se pertencerem a populações distintas. Os indivíduos de Ribeirão de Fora e Córrego do Salto (bacia do Paraná) formam agrupamentos separados daqueles do Córrego da Espinha (bacia do São Francisco) nos dendrogramas de ambos os genes.

Essa estruturação é esperada, visto que o Arco do Alto Paranaíba funciona como uma barreira geográfica impedindo a dispersão dos indivíduos de distintas populações mesmo em espécies de pequeno porte (Resende et al., 2016), permitindo, assim, que elas acumulem diferenças significativas entre si ao longo do tempo. Apesar disso, os valores de diversidade permanecem muito baixos (0,021 como diversidade global na citocromo oxidase I), e as distâncias genéticas entre os indivíduos de uma mesma população muito pequenas (0,001 em Ribeirão de Fora e Córrego da Espinha).

A diferenciação entre populações que sustenta os indivíduos em dois grupos na COI também é pequena (0,041 entre Córrego da Espinha e Ribeirão de Fora e Córrego da Espinha e Córrego do Salto) mas ainda assim, dez vezes maior que a distância intrapopulacional. Segundo Herbert e colaboradores (2009), essa diferença pode sinalizar a existência de duas espécies distintas.

Na região mitocondrial D-Loop se encontram sequências controladoras de processos de replicação e transcrição do genoma mitocondrial (Nahum, 2001) e esta é amplamente utilizada para mensurar diversidade genética em peixes e outros organismos (Ruo-Yu et al., 2006; Hirota et al., 2004; Ashikaga et al., 2015; Silva et al., 2015)

As sequências D-Loop apresentaram diversidade genética um pouco mais expressiva que a do gene da citocromo oxidase I, com 70 sítios polimórficos. A partir desse marcador, a população da bacia do rio São Francisco (Córrego da Espinha) apresentou a maior diversidade, com 32 sítios polimórficos, de um total de 424, enquanto as populações pertencentes à bacia do rio Paranaíba apresentaram menor diversidade (Ribeirão de Fora, 14 e Córrego do Salto, 15). Embora seja possível propor um evento que tenha gerado efeito fundador a partir de haplótipos residentes do rio Paraná, não é difícil imaginar que o isolamento geográfico e diferentes condições ambientais poderiam, por si só, gerar essas pequenas diferenças. Eventos estocásticos, seletivos e principalmente de deriva genética poderiam responder pela maior diversidade da população isolada, já que nenhuma das populações estudadas parece ser grande.

Em estudo desenvolvido por Ashikaga e colaboradores (2015) com populações de *B. orbignyanus* utilizando sequências da região controladora D-Loop, números semelhantes de sítios polimórficos foram encontrados e considerados baixos. Segundo os autores, a diversidade reduzida se relaciona com a fragmentação de habitat gerada por barragens construídas ao longo dos rios Paranapanema e Uruguai, situação que se agrava com a pesca esportiva e retirada de mata ciliar para agricultura. Os mesmos fatores podem ser responsáveis pela diversidade baixa encontrada nas populações de *B. nattereri* avaliadas neste trabalho.

Os resultados desse trabalho apresentam diferenças entre aqueles encontrados em vários trabalhos com o gênero *Brycon*, principalmente no que diz respeito a estruturação das populações. Entretanto, como muitas espécies do gênero vigoram em listas de espécies ameaçadas, é esperado que a diversidade genética encontrada seja baixa (Ashikaga et al., 2015; Matsumoto e Hilsdorf, 2009) salvo algumas exceções (Panarari-Antunes, 2011).

A maior parte dos estudos com diferentes espécies demonstram alta estruturação populacional (Ashikaga et al., 2015; Matsumoto e Hilsdorf, 2009; Panarari-Antunes, 2011; Araújo, 2012; Barroso et al., 2005) enquanto as populações de *B. nattereri* não

apresentaram evidências de forte estruturação, exceto por bacias hidrográficas. Esse fato pode decorrer do pequeno tempo de separação entre as três populações analisadas mas, com um número baixo de migrantes por geração, ao longo do tempo a tendência é que a estruturação se fortaleça.

A diversidade genética está diretamente relacionada com a capacidade que as populações têm de responderem às mudanças ambientais de diversos tipos (Frankham, 2005). Entre essas mudanças que representam pressões seletivas às populações de *B. nattereri*, estão a alteração do regime hídrico e perda de mata ciliar do entorno dos cursos d'água. O último afeta diretamente a sobrevivência dos indivíduos, uma vez que afeta a disponibilidade de recursos alimentares para as mesmas (Goulding, 1980; Lima & Castro, 2000; Leite, 2004; Albrecht et al., 2009).

Apesar de os valores de F_{st} não indicarem que as populações são endogâmicas, a pequena distância genética entre os indivíduos de uma mesma população sinaliza que a endogamia pode se tornar presente. Este fenômeno, que reduz as taxas de nascimento e aumenta as de mortalidade, aumenta na população a frequência de alelos deletérios/letais, que geralmente se expressam apenas em homozigose, causando depressão endogâmica e elevando o risco de extinção (Frankham et al., 2008).

Nas populações de *B. nattereri* analisadas, é essencial aumentar a diversidade genética e monitorar a existência de endogamia. Como em populações naturais a possibilidade de cruzamentos manipulados para estes fins não é viável, o foco deve ser a manutenção dos ambientes de ocorrência, sem represamentos e com mata ciliar intacta e/ou melhorada. Nesse processo, é importante ressaltar que além da importância econômica, os peixes cumprem diferentes papéis processos ecossistêmicos e nas comunidades em que se inserem, como o controle de insetos vetores de doenças, manejo de vegetação invasora e restauração de comunidades e sistemas aquáticos (Ashikaga et al., 2015).

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os dois marcadores moleculares utilizados (microsatélites e mitocondriais) foram eficientes em resgatar dados de diversidade genética e estrutura das três populações de *B. nattereri* avaliadas. Como para a maior parte das espécies ameaçadas, foram observados sinais de gargalo e valores baixos de diversidade genética.

Embora os marcadores nucleares não tenham evidenciado forte estruturação populacional, a evidência da COI é congruente com dados citogenéticos disponíveis para indivíduos de ambas as populações². Portanto, a partir das análises cromossômicas e mitocondriais, é possível afirmar que as populações dos rios São Francisco e Paranaíba constituem unidades taxonômicas distintas e que planos de manejo independentes devem ser implementados para preservação dos estoques naturais de *Brycon* da região.

²Rubens Pazza, comunicação pessoal, 15/01/2018

7. REFERÊNCIAS

- ALLAN, J.D.; FLECKER, A.S. (1993) Biodiversity conservation in running waters: Identifying the major factors that threaten destruction of riverine species and ecosystems. *BioScience*, 43, 32-43.
- AGOSTINHO, A. A., & JÚLIO JR, H. F. (1999). Peixes da bacia do alto rio Paraná. *Estudos ecológicos de comunidades de peixes tropicais*, 374-400.
- ARAUJO, G. T. C. D. (2012). Isolamento, caracterização de locos microssatélites e estimativa da variabilidade genética de *Brycon amazonicus* (Spix & Agassiz, 1829)(Characidae: Bryconinae) em ambiente natural e cativo.
- ASHIKAGA, F.Y.; ORSI, M.L.; OLIVEIRA, C.; SENHORINI, J.A.; FORESTI, F. (2015). The endangered species *Brycon orbignyanus*: genetic analysis and definition of priority areas for conservation. *Environmental Biology of Fishes*, 98(7), 1845-1855.
- AZEVEDO, P.G. Comportamento alimentar e social da piabanha-do-jequitinhonha, *Brycon howesi* (Characidae: Bryconinae), em vida livre. Tese de Doutorado.2010.
- BARROSO, R.M.; HILSDORF, A.W; MOREIRA, H.L.; CABELLO, P. H.; TRAUB-CSEKO, Y.M. Genetic diversity of wild and cultured populations of *Brycon opalinus* (Cuvier, 1819)(Characiforme, Characidae, Bryconinae) using microsatellites. *Aquaculture*, 247(1), 51-65.
- BARBOSA, J.M.; SOARES, E.C. (2009) Perfil da ictiofauna da bacia do São Francisco: estudo preliminar. *Revista Brasileira de Engenharia de Pesca*, 4(1), 155-172.
- BARROSO, R. M., HILSDORF, A. W. S., MOREIRA, H. L. M., MELLO, A. M., GUIMARÃES, S. E. F., CABELLO, P. H., & TRAUB-CSEKO, Y. M. (2003) Identification and characterization of microsatellites loci in *Brycon opalinus* (Cuvier, 1819)(Characiforme, Characidae, Bryconinae). *Molecular Ecology Notes*, 3(2), 297-298.
- BORGES, G.A. (1986). Ecologia de três espécies do gênero *Brycon* Muller & Troschel, 1844 (Pisces, Characidae), no rio Negro-Amazonas, com ênfase na caracterização taxonômica e alimentação. Unpublished Ph. D. Dissertation, INPA/FUA, Manaus, 150p.
- BOTERO-BOTERO, A., & RAMÍREZ-CASTRO, H. (2011). Ecologia trófica de la sabaleta *Brycon henni* (Pisces: Characidae) en el río Portugal de Piedras, Alto Cauca, Colombia. *Revista MVZ Córdoba*, 16(1).

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Portaria MMA 445, de 15 de dezembro de 2014. Dispõe sobre Peixes e Invertebrados Aquáticos Ameaçados. Diário Oficial da União, Brasília, de 31 de janeiro de 2014.

CAMPOS, J. E. G., & DARDENNE, M. A. (2017). Origem e evolução tectônica da Bacia Sanfranciscana. *Revista Brasileira de Geociências*, 27(3), 283-294.

CHISTIAKOV, D. A.; HELLEMANS, B; VOLCKAERT, F.A.M. (2006). Microsatellites and their genomic distribution, evolution, function and applications: a review with special reference to fish genetics. *Aquaculture*, 255(1), 1-29.

CORNUET, J. M., & LUIKART, G. (1996). Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data. *Genetics*, 144(4), 2001-2014.

EARL, D. A. AND VONHOLDT, B. M. (2012) STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conservation Genetics Resources* 4(2), 359-361.

FRANKHAM, R. (2008). Genetic adaptation to captivity in species conservation programs. *Molecular ecology*, 17(1), 325-333.

FRANKHAM, R., BALLOU, J., & BRISCOE, D. Fundamentos de Genética da Conservação. Ribeirão Preto, SP: SBG (Sociedade Brasileira de Genética). Título em inglês. *A Primer of Conservation Genetics*. 2005.

GODOY, M. P. (1975). Peixes do Brasil, subordem Characoidei, bacia do Rio Mogi Guassu-v. 1-4.

GOULDING, M. (1980). *The fishes and the forest: explorations in Amazonian natural history*. Univ of California Press.

GUO, S. W., & THOMPSON, E. A. (1992). Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiple alleles. *Biometrics*, 361-372.

HARTL, D. L., & CLARK, A. G. (2010). *Princípios de Genética de Populações-4*. Artmed Editora.

HÄNFLING, B; DURKA, W.; BRANDL, R. (2004) Impact of habitat fragmentation on genetic population structure of roach, *Rutilus rutilus*, in a riparian ecosystem. *Conservation Genetics*, (5), 247-257.

HEBERT, P.D., RATNASINGHAM, S. AND DEWAARD, J.R. (2003). Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences* 270: S96-S99.

HILSDORF, A. W. S.; PETRERE JR, M. (2002). Conservação de peixes na bacia do rio Paraíba do Sul. *Ciência Hoje*, 30(180), 62-65.

HILSDORF, A. W. S.; DE RESENDE, E. K.; MARQUES, D. K. S. Genética e conservação de estoques pesqueiros de águas continentais no Brasil: situação atual e perspectivas. *Embrapa Pantanal. Documento*, 2006.

HILSDORF B., WILKENS H. AND STRECKER U. (2011). Population genetic patterns revealed by microsatellite data challenge the mitochondrial DNA based taxonomy of *Astyanax* in Mexico (Characidae, Teleostei). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 60: 89–97.

HIROTA, T., HIROHATA, T., MASHIMA, H., SATOH, T., & OBARA, Y. (2004). Population structure of the large Japanese field mouse, *Apodemus speciosus* (Rodentia: Muridae), in suburban landscape, based on mitochondrial D-loop sequences. *Molecular Ecology*, 13(11), 3275-3282.

HUELSENBECK, J. P., RONQUIST, F. (2001). MRBAYES: Bayesian inference of phylogeny. *Bioinformatics*, 17, 754-755.

IERVOLINO, F., DE RESENDE, E. K., & HILSDORF, A. W. S. (2010). The lack of genetic differentiation of pacu (*Piaractus mesopotamicus*) populations in the Upper-Paraguay Basin revealed by the mitochondrial DNA D-loop region: Implications for fishery management. *Fisheries Research*, 101(1-2), 27-31.

JARNE, P., & LAGODA, P. J. (1996). Microsatellites, from molecules to populations and back. *Trends in ecology & evolution*, 11(10), 424-429.

KAVALCO, K.F., BRANDÃO, K.D.O. AND PAZZA, R., ALMEIDA-TOLEDO, L.F.D. (2013). *Astyanax hastatus* Myers, 1928 (Teleostei, Characidae): A new species complex within the genus *Astyanax*?. *Genetics and molecular biology* 32(3): 477-483.

LAU, C. H., DRINKWATER, R. D., YUSOFF, K., TAN, S. G., HETZEL, D. J. S., & BARKER, J. S. F. (1998). Genetic diversity of Asian water buffalo (*Bubalus bubalis*): mitochondrial DNA D-loop and cytochrome b sequence variation. *Animal Genetics*, 29(4), 253-264.

LEITE, R.G. (2004). A alimentação de juvenis de matrinxã, *Brycon amazonicum* (Pisces, Characidae), em áreas inundadas da Ilha de Marchantaria, Amazonas, Brasil. *Acta Amazonica*, 34(4), 661-4.

LIMA, F.C.; CASTRO, R. M. (2000). *Brycon vermelha*, a new species of characid fish from the Rio Mucuri, a coastal river of eastern Brazil (Ostariophysi: Characiformes). *Ichthyological Exploration of Freshwaters*, 11(2), 155-162.

- LIMA, F.C.T. Subfamily Bryconinae. In: REIS, E.E.; KULLANDER, S.O.; FERRARIS, C.J. (eds.). (2003). Checklist of the Freshwater Fishes of South and Central America, Porto Alegre: Edipucrs, 174-181.
- LIMA, F.C.T. (2004) *Brycon gouldingi*, a new species from the rio Tocantins drainage, Brazil (Ostariophysi: Characiformes: Characidae), with a key to the species in the basin. *Ichthyological Exploration of Freshwaters*, 15, 279-287.
- LIMA F.C.T., ALBRECHT M.P., PAVANELLI C.S., VONO V. (2005) *Brycon nattereri*. In: Machado A.B.M., Martins C.S., Drummond G.M. (eds), *Livro Vermelho da Fauna Ameaçada de Extinção do Brasil*. Belo Horizonte, Biodiversitas (in press).
- LIMA, F.C.T, ALBRECHT, M P., PAVANELLI, C.S.; VONO, V. (2008). Threatened fishes of the world: *Brycon nattereri* Günther, 1864 (Characidae). *Environmental biology of fishes*, 83(2), 207-208.
- LIMA, F. C. (2017). A revision of the cis-andean species of the genus *Brycon* Müller & Troschel (Characiformes: Characidae). *Zootaxa*, 4222(1), 1-189.
- LUIKART, G., & CORNUET, J. M. (1998). Empirical evaluation of a test for identifying recently bottlenecked populations from allele frequency data. *Conservation biology*, 12(1), 228-237.
- MATIOLI, SR. (2001). *Biologia Molecular e Evolução*. Ribeirão Preto, BR. Como escolher genes para problemas filogenéticos específicos. Ribeirão Preto: Holos Ed., 2001.
- MATSUMOTO, C.K; HILSDORF, A.W.S. (2009). Microsatellite variation and population genetic structure of a neotropical endangered Bryconinae species *Brycon insignis* Steindachner, 1877: implications for its conservation and sustainable management. *Neotropical Ichthyology*, 7(3), 395-402.
- NELSON, J. S., GRANDE, T. C., & WILSON, M. V. (2016). *Fishes of the World*. John Wiley & Sons.
- OKAZAKI, T. I., HALLERMAN, E. M., DE RESENDE, E. K., & HILSDORF, A. W. S. (2017). Genetic characterization of *Brycon hilarii* (Characiformes) populations within the Pantanal: Aspects of their conservation within a globally important neotropical wetland. *Journal of Ichthyology*, 57(3), 434-444.

- PANARARI-ANTUNES, R. D. S., PRIOLI, A. J., PRIOLI, S. M. A. P., GALDINO, A. S., JUNIOR, J., FERREIRA, H., PRIOLI, L. M. (2011). Genetic variability of *Brycon orbignyanus* (valenciennes, 1850) (characiformes: characidae) in cultivated and natural populations of the upper paraná river, and implications for the conservation of the species. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 54(4), 839-848.
- PRADO, K. S. R., DE BIASI, J. B., & HILSDORF, A. W. S. Desenvolvimento de primer universais da região d-loop do dna mitocondrial em espécies do gênero *Brycon* para estudos genéticos populacionais.
- PRITCHARD, J. K., STEPHENS, M., ROSENBERG, N. A., & DONNELLY, P. (2000). Association mapping in structured populations. *The American Journal of Human Genetics*, 67(1), 170-181.
- REIS, R. E., KULLANDER, S. O., & FERRARIS, C. J. (2003). Check list of the freshwater fishes of South and Central America. *Edipucrs*.
- RESENDE, S. V., KAVALCO, K. F., & PAZZA, R. (2016). Morphological and genetic divergence of a small stream fish species along a watershed. *Biochemical systematics and ecology*, 68, 66-73.
- ROUSSET, F. (2008). genepop'007: a complete re-implementation of the genepop software for Windows and Linux. *Molecular ecology resources*, 8(1), 103-106.
- RUO-YU, L., GONG-SHE, Y., & CHU-ZHAO, L. (2006). The genetic diversity of mtDNA D-loop and the origin of Chinese goats. *Acta Genetica Sinica*, 33(5), 420-428.
- SACCONI, C. (1994). The evolution of mitochondrial DNA. *Current Opinion in Genetic and Development* 4, 875-881.
- SANCHES, A., & GALETTI JR, P. M. (2007). Genetic evidence of population structuring in the neotropical freshwater fish *Brycon hilarii* (Valenciennes, 1850). *Brazilian Journal of Biology*, 67(4), 889-895.
- SANCHES, A; GALETTI, P. (2006). Microsatellites loci isolated in the freshwater fish *Brycon hilarii*. *Molecular Ecology Notes*, 6(4), 1045-1046.
- SHIBATTA, O. A., GEALH, A. M., & BENNEMANN, S. T. (2007). Ictiofauna dos trechos alto e médio da bacia do rio Tibagi, Paraná, Brasil. *Biota Neotropica*, 7(2).
- SILVA, J. V. D., HALLERMAN, E. M., ORFÃO, L. H., & HILSDORF, A. W. S. (2015). Genetic structuring of *Salminus hilarii* Valenciennes, 1850 (Teleostei: Characiformes) in the rio Paraná basin as revealed by microsatellite and mitochondrial DNA markers. *Neotropical Ichthyology*, 13(3), 547-556.

- TAMURA K. STECHER G., PETERSON D., FILIPSKI A., AND KUMAR S. (2013). MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* 30, 2725-2729.
- TAUTZ, D. (1989). Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. *Nucleic acids research*, 17(16), 6463-6471.
- TAUTZ, D; RENZ, M. (1984) Simple sequences are ubiquitous repetitive components of eukaryotic genomes. *Nucleic acids research*, 12(10), 4127-4138.
- THOMPSON, J.D., HIGGINS D.G. AND GIBSON T.J. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* 22, 4673-4680.
- WARD, R.D., ZEMLAK, T.S., INNES, B.H., LAST, P.R. AND HEBERT, P.D.N. 2005. DNA barcoding Australia's fish species. *Philosophical Transactions of the Royal Society B* 360, 1847–1857.
- WEIR, B. S., & COCKERHAM, C. C. (1984). Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution*, 38(6), 1358-1370.
- WRIGHT, S. (1978). *Evolution and the genetics of populations*. vol. 4. Variability within and among natural populations. Chicago, University of Chicago Press, 580p.
- VIEIRA, F., SANTOS, G. B., & ALVES, C. B. M. (2005). A ictiofauna do Parque Nacional da Serra do Cipó (Minas Gerais, Brasil) e áreas adjacentes. *Lundiana*, 6(ssupplement).
- YAMAMOTO, S.; MORITA, K.; KOIZUMI, I.; MAEKAWA, K. (2004). Genetic differentiation of White-Spotted Charr (*Salvelinus leucomaenis*) populations after habitat fragmentation: spatial-temporal changes in gene frequencies. *Conservation Genetics*, 5, 29-538.
- ZANIBONI FILHO, E; TATAJE, D.R.; WEINGARTNER, M. (2006). Potencialidad del género Brycon en la piscicultura brasileña. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 19(2), 233-240.
- ZHANG, D. X., & HEWITT, G. M. (1996). Nuclear integrations: challenges for mitochondrial DNA markers. *Trends in Ecology & Evolution*, 11(6), 247-251.