



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

DHIEGO GOMES FERREIRA

**ANÁLISE GENÉTICA DA ESPÉCIE NEOTROPICAL
GEOPHAGUS BRASILIENSIS (OSTEICHTHYES:
CICHLIDAE)**

Londrina
2013



Universidade Estadual de Londrina



Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária



Instituto Agronômico do Paraná

DHIEGO GOMES FERREIRA

**ANÁLISE GENÉTICA DA ESPÉCIE NEOTROPICAL
GEOPHAGUS BRASILIENSIS (OSTEICHTHYES:
CICHLIDAE)**

DHIEGO GOMES FERREIRA

**ANÁLISE GENÉTICA DA ESPÉCIE NEOTROPICAL
GEOPHAGUS BRASILIENSIS (OSTEICHTHYES:
CICHLIDAE)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Dra. Silvia Helena Sofia.

Londrina
2013

**Catálogo elaborado pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da
Universidade Estadual de Londrina.**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

F383a Ferreira, Dhiego Gomes.

Análise genética da espécie neotropical *Geophagus brasiliensis* (Osteichthyes:
Cichlidae) / Dhiego Gomes Ferreira. – Londrina, 2013.

121 f. : il.

Orientador: Silvia Helena Sofia.

Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade
Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação
em Genética e Biologia Molecular, 2013.

Inclui bibliografia.

1. Peixe – Genética molecular – Teses. 2. Marcadores biológicos – Teses.
3. Biodiversidade – Conservação – Teses. 4. Ictiologia – Teses. I. Sofia, Silvia
Helena. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas.
Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular. III. Instituto
Agrônomo do Paraná. IV. EMBRAPA. V. Título.

CDU 575.73:597

DHIEGO GOMES FERREIRA

**ANÁLISE GENÉTICA DA ESPÉCIE NEOTROPICAL *GEOPHAGUS*
BRASILIENSIS (OSTEICHTHYES: CICHLIDAE)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Silvia Helena Sofia
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof. Dr. Cláudio Henrique Zawadzki
Universidade Estadual de Maringá - UEM

Prof. Dr. Paulo Maurício Ruas
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 21 de fevereiro de 2013.

“Só existem dois dias no ano que nada pode ser feito. Um se chama ontem e o outro se chama amanhã, portanto hoje é o dia certo para amar, acreditar, fazer e principalmente viver.”

(Dalai Lama)

Dedico este trabalho aos meus pais e minha irmã,
pois são essenciais em minha vida, e também a
todos que acreditaram em mim!!!

AGRADECIMENTOS

Ao Programa de Pós Graduação em Genética e Biologia Molecular e ao Departamento de Biologia Geral da Universidade Estadual de Londrina por possibilitar a realização deste trabalho.

À CAPES pela oportunidade de realizar este trabalho recebendo uma bolsa de Mestrado.

À querida orientadora professora Dra. Silvia Helena Sofia, a quem já admirava antes de ser seu orientado e depois deste período, a admiração foi multiplicada exponencialmente. “Professora, muito obrigado por tudo, tenha certeza que aprendi muito com você, não apenas como profissional, mas também como ser humano”.

Ao professor, amigo e praticamente irmão, Bruno Ambrozio Galindo, pela grande ajuda na realização deste trabalho, além dos conhecimentos teóricos, técnicos e éticos, aos quais me ensinou e que sempre tentei seguir “Valeu Bruno!”

Aos professores Dr. Cláudio Henrique Zawadzki e Dr. Paulo Maurício Ruas, por aceitarem ser banca examinadora de minha dissertação, contribuindo com a avaliação deste trabalho.

À professora Fernanda Simões de Almeida, pela amizade, ensinamentos e grande contribuição para a realização deste trabalho.

À Coordenadora do PPGGBM, Dra Ana Lúcia Dias e à Secretária Sueli Miranda por toda ajuda, paciência e disponibilidade.

À professora Dra. Claudete de Fátima Ruas, pela amizade e grande contribuição para a realização de grande parte deste trabalho.

À amiga Alessandra Novaga Alves, pela paciência, por não ser brava, pela amizade, preocupação e por toda a ajuda na descrição dos *primers* de microssatélites.

À amiga Luana Alves, por toda ajuda com os marcadores AFLPs e pela paciência em responder todas as minhas dúvidas técnicas e teóricas.

À amiga Karen Mayumi Suzuki, pela amizade, paciência e grande contribuição, ensinando diversas técnicas e ajudando a resolver diversos problemas. Também à seu noivo, quase marido, Jeovane Amorim, pela amizade e pelas diversas vezes que me ajudaram nesta minha estadia em Londrina.

Ao nosso *designer* particular, Wilson Frantine da Silva, pela grande ajuda em toda a elaboração de figuras e outras coisas neste trabalho, além da grande amizade e compartilhamento de conhecimento “Valeu Virsol!”. Também ao amigo Rafael Elias (Caconde), pela amizade e bom humor, a Fernanda Midori, amiga que também me ajudou várias vezes; à Lenice Shibatta, Camila e ao Thiago (Faustinho), enfim a todos os amigos do LAGEA, que forneceram muitas contribuições para este trabalho ou mesmo auxiliaram com seus conhecimentos.

Ao professor Dr. Oscar Akio Shibatta, pela identificação dos exemplares utilizados neste trabalho.

À professora Cláudia Martinez pela amizade e contribuições. Também aos professores Rogério F. de Souza, Laurival Vilas Boas, Gyslaine Vilas Boas, Maria Helena P. Fungaro, Lúcia Giuliano, e, todos os professores que de algum modo forneceram contribuições à minha formação profissional.

Ao IBAMA e IAP pela autorização para coletas de material biológico.

Aos amigos do laboratório dos “Ruas”, Kátia (principalmente pela paciência no sequenciador), Sara, Marcos, Camila, Gabriela, Eduardo Ruas, Ana Paula e Bruna.

Às minhas queridas amigas de disciplinas e conversas engraçadas Ana Paula Ricietto, Fernanda Fazion e Josiane Scarpassa.

Àos ex-professores e amigos, membros do Colegiado de Ciências Biológicas da UENP – Conélio Procópio, principalmente Lindalva, Katia, Viviane e Carlos.

Ao ex-professor da UENP e amigo Sandremir de Carvalho, pela amizade, oportunidades determinantes, confiança e conhecimentos.

A todos os membros da família GECON, da qual tenho orgulho em pertencer. Minha grande amiga Carol Apolinário “não preciso dizer o quanto gosto de ti”. Às queridas Jessica, Moema, Mayara, Andréia, Same, Renata Alfredo e Amanda, e os queridos Raul, Gazal, Assis, Fabiano e Tavares. Também aos amigos, Tiago, Bruna, Elaine, Camila Brambila e Rick.

Meus manos de casa e eternos amigos Carlos e Xande, com que estou constantemente compartilhando os problemas e alegrias. Também aos amigos, os quais não posso esquecer, Thiely, Jamile, Paulo Tagata e Paola Ladera.

Às amigas funcionárias da UENP, a Regiane loira e a Regiane morena, Ligia e Dona Angela.

Agradeço também aos amigos Carlos César dos Santos, José Luis dos Santos e Manoel Viera, que contribuíram possibilitando que lá no começo de minha graduação, eu pudesse sair mais cedo do trabalho de sua fazenda para estudar.

Aos meus queridos pais Zenito e Clenilda e minha irmã Silvana, que sempre estiveram ao meu lado, me apoiando e incentivando, fazendo parte do alicerce sobre o qual construí a minha personalidade.

E principalmente a Deus, que me fortalece e me coloca nos caminhos corretos da vida, iluminando meus passos a cada momento!

OBRIGADO A TODOS!

FERREIRA, Dhiego Gomes Ferreira. **Análise genética da espécie Neotropical *Geophagus brasiliensis* (Osteichthyes: Cichlidae)**. 2013. 121p. Dissertação de Mestrado em Genética e Biologia Molecular. Universidade Estadual de Londrina, 128p.

RESUMO

O uso de marcadores moleculares em estudos genéticos de populações tem possibilitado importantes contribuições para o conhecimento genético de espécies da ictiofauna Neotropical. Contudo, a maior parte deste conhecimento está limitada a espécies migradoras e/ou de grande porte, de modo que pouco se sabe ainda sobre a organização genética de populações de peixes de pequeno porte e sedentários. *Geophagus brasiliensis* (Quoy & Gaimard, 1824), popularmente conhecido como acará, é um peixe Neotropical da família Cichlidae que apresenta as características de sedentarismo e cuidado parental, representando um bom modelo para o estudo genético de espécies de peixes neotropicais não migradoras. Dentre os principais marcadores empregados em estudos de peixes atualmente, destacam-se os microssatélites, os AFLPs e as análises de regiões do genoma mitocondrial. Particularmente no caso de *G. brasiliensis* a falta de *primers* de microssatélites constituía um fator limitador ao uso destes marcadores para estudos populacionais desta espécie. Com base no exposto, os objetivos deste trabalho foram: 1) desenvolver *primers* de microssatélites específicos para *G. brasiliensis* e 2) empregar marcadores microssatélites, AFLPs e análise da sequência mitocondrial D-loop no estudo da estrutura e diversidade genética de *G. brasiliensis*, amostrados em seis trechos da bacia de um rio Neotropical, sendo cinco destes na calha principal e um em um ribeirão tributário. Um total de quatorze locos polimórficos foi obtido para a espécie, com uma média de 4,2 alelos por loco, com a maioria dos locos apresentando um bom conteúdo de informação polimórfica. Os resultados das análises populacionais revelaram uma baixa diversidade genética para a espécie em relação a outros peixes da ictiofauna Neotropical. Além disto, a amostra proveniente do ribeirão apresentou maior diversidade genética que todas as amostras da calha principal, destacando uma possível importância que estes tributários podem representar como reservatórios de diversidade genética. Um padrão similar de diferenciação foi observado a partir dos três marcadores, revelando estruturação genética significativa entre as amostras. Em relação ao hábito sedentário da espécie, os resultados demonstram que o fluxo gênico pode ser mantido ao longo da calha principal, possivelmente a partir do modelo de dispersão *Stepping Stone*. No entanto, características geológicas e fatores demográficos levaram algumas amostras a não se apresentarem em concordância com este modelo. Os resultados demonstram que a variabilidade genética de *G. brasiliensis* se encontra distribuída de maneira heterogênea ao longo da bacia, o que deve ser considerado em futuras ações de manejo e conservação.

Palavras chave: Conservação. SSR. AFLP. D-loop – peixe sedentário – ictiofauna Neotropical.

FERREIRA, Dhiego Gomes Ferreira. **Genetic analysis of the Neotropical species *Geophagus brasiliensis* (Osteichthyes: Cichlidae)**. 2013. 121p. Master Dissertation in Genetics and Molecular Biology. Universidade Estadual de Londrina, 128p.

ABSTRACT

The use of molecular markers in genetic studies of populations has allowed significant contributions to genetic knowledge of Neotropical freshwater fishes. However, much of this knowledge is limited to migratory species, thus little is known about the genetic organization of populations of small fish and sedentary. *Geophagus brasiliensis* (Quoy & Gaimard, 1824), popularly known as acar, is a Neotropical Cichlidae fish that shows sedentary lifestyle and parental care, representing a good model for studying genetic neotropical non-migratory fish. Among the principal markers used in fish studies, the highlights are microsatellites, AFLP and analysis of DNAm regions. Particularly for *G. brasiliensis* the lack of microsatellite primers was a limiting factor to the use of these markers for population studies of this species. The objectives of this study were; 1) developing microsatellites primers specific for *G. brasiliensis* and 2) employ microsatellite markers, AFLPs and analysis of D-loop mitochondrial sequence in the study of the structure and genetic diversity of *G. brasiliensis*, sampled in six sections of a neotropical river basin, five in the main channel and in one site into a tributary stream. Fourteen polymorphic loci were obtained for the species, with an average of 4.2 alleles per locus, the majority had a good polymorphic information content. The results of the population genetics analysis showed that *G. brasiliensis* has a low genetic diversity compared to other Neotropical fishes, in addition, the sample from the stream showed genetic diversity greater than all the other samples of the main channel, highlighting a possible importance that streams can represent as reservoirs of genetic diversity. A similar pattern of differentiation was observed from the three markers, revealing significant genetic structure among samples. In relation to sedentary habit, the overall result showed that the gene flow can be maintained along the main channel, possibly through the *Stepping Stone* model. However, the geological and demographic factors have resulted in some of these samples outside this dispersion model. Our results demonstrate that the genetic diversity of *G. brasiliensis* is distributed heterogeneously throughout the basin, which should be considered in conservation and management actions.

Keywords: Conservation. SSR. AFLP. D-loop - sedentary fish - Neotropical ichthyofauna.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Exemplar de *Gepophagus brasiliensis* (Foto: GECON, 2009)..... 18

TRABALHO 2

Figura 1 - Mapa apresentando a bacia hidrografia do rio Laranjinha e os trechos onde foram coletadas as amostras de *Geophagus brasiliensis*.....61

Figura 2 - Coeficiente de variação para o número de marcadores amplificados, estimados a partir de 1000 sorteios bootstrap.....67

Figura 3 - Haplótipos mitocondriais encontrados entre as seis amostras de *G. brasiliensis* da bacia do rio Laranjinha. a) Distribuição e frequência dos haplótipos entre as amostras. b) Rede de haplótipos gerada através do programa Network 4.6.1.1, baseado no algoritmo median-joining74

Figura 4 - Representação gráfica dos agrupamentos Bayesianos formados a partir de $K = 3$ para as amostras de *G. brasiliensis* da bacia do rio Laranjinha. a) Gráfico gerado a partir dos dados de AFLP. b) Gráfico gerado a partir dos dados de microssatélites78

LISTA DE TABELAS

TRABALHO 1

- Tabela 1** - Descrição de 14 locos microssatélites polimórficos isolados para a o peixe Neotropical *Geophagus brasiliensis* e resultados para cada loco44
- Tabela 2** - Amplificação cruzada dos 14 locos polimórficos em cinco espécies da família Cichlidae. A amplificação e polimorfismos testados em cinco indivíduos de cada espécie46

TRABALHO 2

- Tabela 1** - Diversidade genética de *G. brasiliensis* em seis trechos da bacia do rio Laranjinha, para os três marcadores utilizados 69
- Tabela 2** - Resultados de cada loco microssatélite para cada uma das seis amostras analisadas.....71
- Tabela 3** - Alelos privados encontrados nos locos microssatélites em três amostras de *G. brasiliensis*. Tamanho do fragmento e frequência dos alelos nas amostras72
- Tabela 4** - Teste de sinal para o excesso de heterozigotidade para nove locos microssatélites aplicados nas seis populações de *G. brasiliensis* da bacia do rio Laranjinha73
- Tabela 5** - Sítios variáveis entre três haplótipos da região controle do DNA mitocondrial (D- Loop) encontrados entre 161 amostras de *G. brasiliensis* da bacia do rio Laranjinha.....73
- Tabela 6** - Análise da Variância Molecular (AMOVA) das amostras de *G. brasiliensis*, apresentando a porcentagem de variação dentro e entre as populações para os três marcadores moleculares utilizados...75
- Tabela 7** - Diferenciação genética par a par entre as amostras de *G. brasiliensis* da bacia do rio Laranjinha, estimada a partir dos três marcadores moleculares utilizados.....76
- Tabela 8** - Fluxo gênico estimado a partir de uma análise bayesiana, utilizando o programa *BeyesAss*79

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
2.1	ICTIOFUANA DE ÁGUA DOCE NEOTROPICAL	16
2.2	GEOPHAGUS BRASILIENSIS (QUOY & GAIMARD, 1824)	18
2.3	RIO LARANJINHA	20
2.4	GENÉTICA DA CONSERVAÇÃO	22
2.5	ESTRUTURA GENÉTICA DE PEIXES SEDENTÁRIOS NEOTROPICAIS	25
2.6	MARCADORES MICROSSATÉLITES.....	27
2.7	ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE LOCOS MICROSSATÉLITES.....	29
2.8	MICROSSATÉLITES EM PEIXES NEOTROPICAIS DE ÁGUA DOCE	31
2.9	MARCADORES AFLPS	32
2.10	DNA MITOCONDRIAL (D- LOOP).....	34
3	OBJETIVOS	37
3.1	GERAL	37
3.2	ESPECÍFICOS.....	37
4	TRABALHOS	38
4.1	TRABALHO 1	38
4.2	TRABALHO 2	55
5	CONCLUSÕES GERAIS	106
	REFERÊNCIAS	107

1 INTRODUÇÃO

A região Neotropical apresenta a ictiofauna de água doce mais diversa do planeta, com 4035 espécies descritas e uma estimativa de aproximadamente 6000 existentes (LÉVÊQUE et al., 2008; REIS et al., 2003). Esta rica biodiversidade corresponde a uma fauna taxonomicamente distinta que distribui ao longo das bacias hidrográficas das Américas Central e do Sul, desde os rios do sul do México até o estuário do rio da Prata, no norte da Argentina (ALBERT; REIS, 2011). Na América do Sul, aproximadamente 50% é representada por peixes de pequeno porte (CASTRO et al., 2003), ou seja, espécies que não ultrapassam 200 mm de comprimento (VAZZOLER, 1999).

A quantificação da diversidade de espécies é uma boa medida de biodiversidade, porém, segundo Geist (2011) as medidas de biodiversidade também devem ser inferidas utilizando outros parâmetros como a diversidade genética. A diversidade genética, ou, diversidade de alelos presentes nos vários locos de uma espécie (SOLÉ-CAVA; CUNHA, 2012), é um componente fundamental da biodiversidade, pois determina o potencial adaptativo/evolutivo das espécies (FERGUSON et al., 1995; FRANKHAM et al., 2010). Desse modo, o conhecimento da diversidade genética de uma espécie, e de como ela se encontra distribuída dentro e entre as populações, é essencial para compreensão de aspectos evolutivos, bem como para a elaboração de futuras ações de manejo e conservação (CARVALHO, 1993; HURT; HEDRICK, 2004; FRANKHAM et al., 2010).

O conhecimento genético de populações naturais de diferentes organismos vem sendo obtido com sucesso por meio do uso de marcadores moleculares, principalmente aqueles que possuem como base a amplificação de DNA via PCR (*Polymerase Chain Reaction*), como RAPDs, AFLPs, microssatélites e sequenciamento direto dos fragmentos (AVISE, 2004).

Estas ferramentas têm proporcionado importantes contribuições para o conhecimento da estrutura e diversidade genética de peixes de água doce da região Neotropical (PIORSKI et al., 2008), embora a maior parte destas informações se encontre reservada principalmente a espécies de grande porte e/ou migradoras (HATANAKA et al., 2006; LOPES et al., 2007; CARVALHO-COSTA et al., 2008; ABREU et al., 2009; CALCAGNOTTO; DESALLE, 2009; MATSUMOTO; HILSDORF, 2009; PEREIRA et al., 2009). De fato, ao se considerar as espécies de peixes

neotropicais de pequeno porte e hábito sedentário, as informações disponíveis na literatura sobre a organização da diversidade genética de populações de tais espécies, são bem mais limitadas e reduzidas a poucos estudos (SOFIA et al., 2008; PHILIPPSEN et al., 2009).

Dentro da categoria de espécies sedentárias e de pequeno porte, se inclui *Geophagus brasiliensis* (Quoy & Gaimard, 1824), um peixe Neotropical, popularmente conhecido como cará, acará, entre outros nomes, amplamente distribuído pela América do Sul (KULLANDER, 2003). Membro da família Cichlidae, *G. brasiliensis* geralmente habita o fundo de ambientes costeiros de rios, lagos, reservatórios e córregos (LOWE-MCCONNELL, 1991; CEMIG, 2006), sendo encontrado tanto em áreas preservadas como em locais perturbados (TEIXEIRA et al., 2005). No Brasil, esta espécie representa um componente habitual das comunidades de peixes em diferentes bacias hidrográficas (ARAÚJO; SANTOS, 2001; CASTRO et al., 2003, 2004;. SHIBATTA; SILVA-SOUZA, 2008). Considerando estas características, *G. brasiliensis* pode representar um bom modelo para o estudo da estrutura e diversidade genética de espécies de pequeno porte e sedentárias da ictiofauna Neotropical.

Dentre os marcadores moleculares atualmente disponíveis para estudos populacionais, merecem destaque os microssatélites, também conhecidos como SSR (*Simple Sequence Repeats*), os AFLPs (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) e as análises de sequências mitocondriais (AVISE, 2004; FREELAND, 2005; FRANKHAM et al. 2010). Os microssatélites são marcadores codominantes (SUNNUCKS, 2000), enquanto que os AFLPs são dominantes (LIU, 2007), contudo, ambos possibilitam bons níveis de polimorfismo (ZANE et al., 2002; LIU, 2005) e demonstram ótima aplicabilidade em estudos populacionais de peixes (MICKETT et al., 2003; LIU et al., 2005; CALCAGNOTTO; DESALLE, 2009; MATSUMOTO; HILSDORF, 2009; PEREIRA et al., 2009). A região *D-loop*, ou controle, constitui o trecho mais variável do genoma mitocondrial. Devido a suas vantagens (AVISE, 2004), tem sido utilizada com eficiência em estudos populacionais de diversas espécies da ictiofauna neotropical (MARTINS et al., 2003; MATOSO et al., 2010; GARCEZ et al., 2011).

Ainda em relação aos marcadores microssatélites, devido à grande diversidade da ictiofauna de água doce Neotropical, *primers* para a amplificação de regiões microssatélites ainda não foram descritos para a maioria das espécies

(SILVA; HILSDORF, 2011). Considerando espécies de pequeno porte e sedentárias, estes são limitados a uma pequena quantidade de publicações (MOESER; BERMINGHAM, 2005; MOYSÉS et al., 2005; TELLES et al., 2010), o que dificulta o desenvolvimento de estudos genéticos mais informativos e abrangentes para estas espécies.

Com base no exposto, os objetivos do presente trabalho foram; isolar e caracterizar locos microssatélites polimórficos para *G. brasiliensis*; e aplicá-los em associação com marcadores AFLPs e sequenciamento da região D-loop (DNAm) no estudo da estrutura e diversidade genética desta espécie ao longo da bacia de um rio Neotropical, visando fornecer informações que possam contribuir para o conhecimento da forma de organização genética de espécies neotropicais sedentárias e também em futuras ações de manejo e conservação.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 ICTIOFAUNA DE ÁGUA DOCE NEOTROPICAL

A ictiofauna de água doce neotropical é a mais diversa do planeta, com 71 famílias, apresentam o maior número de famílias registrado para este tipo de ecossistema. Entre as 13.000 espécies de peixes estimadas para os ambientes continentais de água doce, aproximadamente de 6.000 são esperadas para a região neotropical, das quais, 4.475 já são consideradas válidas e cerca de 1.550 são conhecidas, porém ainda não foram descritas (REIS et al., 2003).

Esta rica biodiversidade de peixes compõe uma fauna taxonomicamente distinta que se estende ao longo das águas continentais da América Central e do Sul, desde os rios do sul do México até o estuário do Rio da Prata, ao norte da Argentina (ALBERT; REIS, 2011). A maior parte da diversidade de peixes de água doce neotropicais, cerca de 2.500 espécies, é encontrada no Brasil, onde as águas continentais formam a mais extensa rede hidrográfica do mundo (GRAÇA; PAVANELLI, 2007).

Inventários de biodiversidade nos ambientes de água doce são ainda incompletos para diversas partes do mundo, especialmente nas regiões tropicais, o que torna as taxas de perda de espécies possivelmente maiores do que se estima atualmente (DUDGEON et al., 2006).

A resolução de incertezas taxonômicas presentes em grupos complexos, e principalmente, levantamentos ictiofaunísticos mais abrangentes, incluindo ambientes pouco amostrados e outros ainda não explorados, possibilitariam o conhecimento de um número bem maior de espécies para a região neotropical (REIS et al., 2003). Este é um fator muito importante nas bacias hidrográficas sul-americanas, onde aproximadamente metade da ictiofauna é composta por peixes de pequeno porte. Estas espécies, na maioria das vezes, exibem um elevado grau de endemismo e habitam áreas geograficamente restritas (como riachos e ribeirões), o que contribui para um grande número de espécies ainda pouco ou nada conhecidas cientificamente (CASTRO et al., 2003).

Apesar da grande diversidade que apresenta, a fauna de peixes de água doce neotropical se encontra constantemente ameaçada, declinando em consequência de diversas formas de interferência antrópica, principalmente poluição,

assoreamento, construção de represas, pesca e introduções de espécies exóticas (AGOSTINHO et al., 2005).

O desmatamento e a erosão são os grandes responsáveis pelas alterações nas cabeceiras dos córregos, assoreando e destruindo os habitats de reprodução de muitas espécies. A poluição, que resulta principalmente de esgotos e produtos químicos (resíduos agrícolas, pesticidas e fertilizantes), causa grandes pressões sobre as populações de peixes remanescentes, enquanto que, as canalizações e desvios de ribeirões eliminam zonas ripárias e destroem os ecossistemas aquáticos que mantêm a qualidade da água reciclando os nutrientes e colaborando para alimentação dos peixes (VRIJENHOEK, 1998).

Além destes, os represamentos para fins hidrelétricos se destacam como a maior fonte pontual de interferência humana sobre os regimes hídricos naturais (AGOSTINHO; BENEDITO-CECILIO, 1992). Estas construções resultam em severas alterações na hidrologia original dos rios, modificando as condições físicas e químicas da água e também a qualidade e quantidade de habitats para a flora e fauna aquática (AGOSTINHO et al., 2007).

Os principais impactos dos represamentos sobre a ictiofauna resultam da eliminação das rotas migratórias e de obstáculos naturais (importantes para a reprodução de espécies de Piracema), regularização da vazão dos rios (que influencia no ciclo reprodutivo de peixes que desovam em ninhos), redução da vegetação ciliar (importante fonte de alimento) e eliminação das lagoas marginais (fundamentais para a eclosão de ovos e desenvolvimento da fase juvenil de diversos peixes) (HILSDORF; PETRERE-JR, 2002).

Assim, do ponto de vista genético, a construção de barramentos representa uma grande ameaça ao potencial evolutivo das espécies, fragmentando as populações e reduzindo as possibilidades de dispersão e fluxo gênico, o que pode resultar em mudanças nas proporções relativas dos componentes de diversidade genética dentro e entre as populações (VRIJENHOEK, 1998).

Conhecer a composição genética de uma espécie, e de como ela está organizada (estruturada) em suas populações, é fundamental para as ações de manejo e conservação (FRANKHAM et al. 2010). Desta forma, torna-se cada vez mais urgente a necessidade de se investigar a situação atual da distribuição genética das populações de peixes, dentro e entre bacias, bem como as possíveis

relações entre destruição ambiental, perda de variabilidade genética e subdivisão de estoques (HISDORF et al., 2006).

2.2 *GEOPHAGUS BRASILIENSIS* (QUOY & GAIMARD, 1824)

O peixe neotropical *Geophagus brasiliensis* (Figura 1) espécie da família Cichlidae, é conhecida popularmente como caraúna, acarauína, acará, acará ferreira e papa terra, o ultimo devido ao habito de procurar comida no fundo dos rios e lagos (WEINZETTL; JURBERG, 1990; KULLANDER, 2003). Possui corpo alto, boca terminal protrátil, os primeiros raios das nadadeiras dorsal e anal são modificados em espinhos e apresenta um ocelo na nadadeira caudal. É um peixe de pequeno porte, atingindo no máximo 25 cm, sendo o macho um pouco maior que a fêmea (CEMIG, 2006).

Figura 1 - Exemplar de *Geophagus brasiliensis*, MZUEL6451, comprimento padrão - 125 mm (Foto: GECON, 2009).



É uma espécie amplamente distribuída no continente Sul-americano, com presença em várias bacias hidrográficas, do estado do Amapá, de leste ao Sul do Brasil até o rio da Prata (Argentina / Uruguai) (WEINZETTL; JURBERG, 1990; KULLANDER, 2003). Habita o fundo dos ambientes de margens de rios, lagos, reservatórios e córregos (LOWE-MCCONNELL, 1991), adaptando-se facilmente a vários tipos de ambientes (MENEZES et al., 2007), sendo possível apresentar

mudanças em sua biologia em decorrência das influências do habitat (MAZZONI; RIOS, 2002; SANTOS et al., 2004).

A família Cichlidae, uma das mais diversas e amplamente distribuídas famílias de peixes teleósteos do mundo, possui cerca de 1300 espécies distribuídas em ecossistemas de água doce e ocasionalmente salobros, da Américas do Sul, Central e do Norte, África, Madagascar e Índia (REIS et al., 2003; NELSON, 2006). São peixes sedentários de habito diurno e devido à existência de uma grande diversidade de espécies, apresentam ecologia trófica bastante variada, incluindo espécies planctônicas, carnívoras, onívoras e piscívoras (SILVANO et al., 2001).

Na região Neotropical, constituem a terceira mais numerosa família de peixes de água doce, com aproximadamente 600 espécies, atrás apenas de Characidae e Loricariidae (REIS et al., 2003). Cichlidae é atualmente subdividida em quatro subfamílias: Cichlinae, Etroplinae, Pythochrominae e Pseudocrenilabrinae. A subfamília Cichlinae engloba a maioria das espécies de ciclídeos neotropicais, apresentando sete tribos, Cichini, Retroculini, Astronotini, Chaetobranchini, Cichlassomatini, Heroini e Geophagini, da qual *Geophagus brasiliensis* faz parte (SMITH et al., 2008; LÓPEZ-FERNÁNDEZ et al., 2010).

Geophagus brasiliensis não é uma espécie migradora, a fecundação é externa e a desova parcelada, ocorrendo em ambientes lênticos ao longo de vários meses do ano (DUKE-ENERGY, 2008; CEMIG, 2006). O período reprodutivo é marcado pela formação de casais, estes constroem ninhos e depositam os ovos fertilizados sobre o substrato (KULLANDER, 2003). Nesta ocasião o macho desenvolve uma gibosidade na cabeça e apresenta comportamento agressivo e territorialista (CEMIG, 2006).

O comportamento de cuidado parental se estende desde o período de incubação, onde a fêmea protege os ovos na boca ventilando-os constantemente (WIMBERGER, 1992) até a fase juvenil, onde os alevinos também são refugiados na boca em situações de risco. Esta característica é evidenciada para várias espécies do gênero *Geophagus*, sendo possível ocorrer de modo biparental (KULLANDER, 2003).

O habito alimentar da espécie é descrito como detritívoro-iliófago, que se caracteriza por abocanhar a areia e/ou cascalho do fundo, filtrar a parte comestível e dispensar o restante (MENEZES et al, 2007), ou onívoro, se alimentando de insetos, moluscos, algas, plantas e sedimentos (KULLANDER,

2003). Caracteriza-se por apresentar plasticidade trófica, sendo sua alimentação, reflexo da disponibilidade e abundância dos recursos presentes no ambiente (ABELHA; GOULART, 2004; ARAÚJO, 2008).

Segundo Teixeira et al. (2005) *Geophagus brasiliensis* é uma espécie oportunista, que consegue se adaptar aproveitando os recursos disponíveis em ambientes pobres, sendo este, um dos fatores responsáveis pela sua abundância ao longo de ambientes heterogêneos. Isso é evidenciado pela análise da ictiofauna de ribeirões, onde a espécie constantemente se apresenta entre as mais frequentes (CASTRO et al., 2003; SHIBATTA; CHEIDA; 2003; VIEIRA; SHIBATTA, 2007).

Graças as suas características biológicas, é considerada por alguns autores como um ótimo modelo para estudar os prejuízos causados pelo efeito dos poluentes constantemente encontrados em ambientes aquáticos (WILHELM FILHO et al., 2001; BARBIERI, 2009; BENINCÁ et al., 2011).

Estudos que visam o conhecimento da diversidade e estruturação genética de *Geophagus brasiliensis* ainda são inexistentes. Trabalhos envolvendo seu material genético estão restritos a estudos citogenéticos e de biomonitoramentos (FELDBERG et al., 1985; VICARI et al., 2006; PIRES et al., 2008; PIRES et al., 2010; SILVA; DERGAM, 2011)

As características particulares da espécie *G. brasiliensis* podem ser importantes na compreensão de diversos aspectos dos habitats por ela explorados, sejam eles ambientes impactados ou não, como grandes rios, lagos ou mesmo os ribeirões, locais ainda carentes de estudos populacionais. O desenvolvimento de *primers* para o estudo de regiões microssatélites desta espécie possibilitaria análises mais informativas e robustas nos diversos ambientes de ocorrência da espécie, propiciando um conhecimento mais abrangente em diversas bacias hidrográficas da região neotropical.

2.3 BACIA DO RIO LARANJINHA

Em termos de ictiofauna, a bacia do alto rio Paraná é atualmente uma das mais bem estudadas da América do Sul, sendo representada, até o momento, por trezentas e dez espécies de peixes identificadas, distribuídas em doze ordens e trinta e oito famílias. Dentre as ordens conhecidas para esta bacia,

Siluriformes e Characiformes correspondem a cerca de 80% do total das espécies para esta região (LANGEANI et al., 2007).

O rio Paranapanema, um importante afluente da margem esquerda do rio Paraná, nasce na Serra de Paranapiacaba (SP), possui uma extensão aproximada de 930 km, dos quais cerca de 330 km, a partir da foz do rio Itararé, formam a divisa entre os estados de São Paulo e Paraná. Com uma área de drenagem de aproximadamente 900.000 km², devido a sua localização e seu desnível (aproximadamente 600 metros), este rio é amplamente utilizado para a geração de energia hidroelétrica, tendo em sua bacia mais de dez empreendimentos voltados para este fim, o que transformou o mesmo em um complexo sistema de cascatas artificiais (NOGUEIRA, 1996).

O reservatório de Capivara, formado no médio rio Paranapanema pelo barramento da Usina Hidrelétrica Escola Engenharia Mackenzie, tem como um dos principais afluentes, o rio das Cinzas, este último possui sua nascente no município de Piraí do Sul, e drena vários municípios da região norte do estado do Paraná (VIANNA; NOGUEIRA, 2008). Após 240 quilômetros, recebe em sua margem esquerda o seu principal tributário, o rio Laranjinha, o qual apresenta noventa afluentes ao longo de seu percurso, tendo sua nascente no município de Ventania e foz entre os municípios de Bandeirantes e Santa Mariana. Juntos, os rios Laranjinha e Cinzas, drenam uma área de 9766 km² e possuem grande importância histórica e ambiental para a região (MAACK, 2002).

Segundo Vianna e Nogueira (2008) a bacia do rio das Cinzas pode ter grande importância para a manutenção da ictiofauna do médio rio Paranapanema. Investigações preliminares, bem como relatórios históricos e populares, apontaram para o fato deste ter um papel fundamental na preservação da ictiofauna regional, dando suporte à maioria das espécies registradas no reservatório de Capivara.

Estudos sobre a estrutura genética de populações de peixes do rio Laranjinha ainda são escassos e restritos a região do médio rio Laranjinha, onde populações de *Pimelodus heraldoi* (RAMOS, 2009), *Leporinus amblyrhynchus* (FRACASSO, 2009), *Leporinus octofasciatus* (SILVA, 2010) e *Steindachnerina insculpta* (CARDOSO et al., 2010) foram estudadas quanto a influência do barramento de uma PCH (Pequena Central Hidrelétrica), por meio do uso do marcador molecular PCR-RAPD.

2.4 GENÉTICA DA CONSERVAÇÃO

A diversidade biológica do planeta tem sido rapidamente exaurida como consequência das ações humanas. Sua conservação torna-se cada vez mais necessária, justificada principalmente pelo valor econômico que os recursos biológicos representam, pela importância dos serviços ambientais prestados, pelos valores estéticos e pelas destacáveis razões éticas, que apontam para o fato que nossa espécie não tem o direito de levar outras espécies à extinção (FRANKHAM et al., 2010)

A conservação da biodiversidade constitui o principal foco da Biologia da Conservação, priorizando a identificação das possíveis causas dos declínios de populações a níveis críticos e a avaliação dos impactos das atividades humanas sobre as espécies, comunidades e ecossistemas (SOULÉ, 1985).

Intimamente inserida neste contexto está a Genética da Conservação (EIZIRIK, 1996), ciência que emprega o conhecimento das teorias e das técnicas da genética, a fim de reduzir os riscos de extinção das espécies (FRANKHAM et al., 2010), deste modo, destaca-se como sendo útil ao trabalho de profissionais interessados na conservação da biodiversidade e dos recursos naturais (SOLÉ-CAVA; CUNHA, 2012).

Além da definição de unidades de manejo, resolução de incertezas taxonômicas, emprego em questões forenses e elucidação de aspectos biológicos importantes para a conservação das espécies, os estudos da Genética da Conservação procuram identificar nas populações os efeitos de fatores como depressão endogâmica, perda de potencial evolutivo, fragmentação, redução do fluxo gênico, mutações deletérias, deriva genética e seleção natural (FRANKHAM et al., 2010).

Em longo prazo, o seu principal objetivo é preservar as espécies como entidades dinâmicas capazes de se adaptarem às mudanças ambientais (FRANKHAM et al., 2010). Para isso, procura evitar a endogamia em espécies que não são naturalmente endogâmicas, permitindo que mantenham o maior potencial evolutivo possível (ou seja, manter sua alta diversidade genética) independente dos níveis de fragmentação que apresentem atualmente (SOLÉ-CAVA; CUNHA, 2012); PEREZ-SWEENEY et al., 2004).

A fragmentação e a destruição de habitats se destacam entre as principais ameaças a conservação de biodiversidade. Ambientes fragmentados podem tornar indivíduos de uma espécie restritos a pequenas áreas, isolando-os de forma parcial ou total de outras populações. Este isolamento favorece o cruzamento entre indivíduos aparentados e pode levar aos efeitos da deriva genética e da endogamia (FRANKHAM et al., 2010). Os níveis de endogamia e de diversidade genética são inversamente relacionados, se a endogamia é alta, a heterozigosidade é baixa, e vice-versa. (PEREZ-SWEENEY et al., 2004). Assim, a redução e a fragmentação de habitats possuem como principais consequências o fluxo gênico reduzido e os efeitos da deriva genética, fatores que diminuem a variabilidade genética dentro das populações (TEMPLETON et al., 2001).

A variabilidade genética constitui o material básico para a evolução das espécies (SOLÉ-CAVA; CUNHA, 2012). Quanto maior o número de alelos, maiores as chances de existirem genótipos capazes de se adaptar a curto, médio e longo prazo às mudanças ambientais, conferindo a sobrevivência de variedades particulares (FERGUSON et al., 1995).

Definida como diversidade de alelos nos vários locos de uma espécie (SOLÉ-CAVA; CUNHA, 2012), a variabilidade genética é originada a partir de mutações e posteriormente organizada, mantida, eliminada ou dispersada entre as subpopulações, de acordo com um complexo equilíbrio entre migração, deriva genética e seleção natural (HARTL, 2008). Além da importância que a constituição genética representa para processos futuros, ela também mantém registrados os eventos que ocorreram no passado. Assim, a conservação de uma espécie é também a conservação do resultado de um processo evolutivo manifestado nas estruturas genéticas presentes em uma população (LOESCHCKE et al., 1994).

O conhecimento da composição genética de uma espécie e de como ela está organizada (estruturada) em suas populações é fundamental para as ações de manejo e conservação, pois permite entender a realidade atual dos ecossistemas, possibilitando um melhor direcionamento dos esforços de conservação para que os recursos sejam usados mais eficientemente (FRANKHAM et al., 2010).

Por meio da análise genética das populações é possível compreender a estrutura genética de uma espécie, identificando a diversidade genética dentro e entre populações em diferentes níveis hierárquicos da organização

genética, além de obter uma teoria básica para entender os mecanismos que provocam mudanças evolutivas e afetam o padrão de variação genética em populações naturais e artificiais (LOESCHCKE et al., 1994).

Se a população de uma espécie ameaçada, que ocupa uma determinada área, se apresenta estruturada, então a estratégia de conservação deve procurar preservar a diversidade da espécie naquela área, pois já podem existir adaptações locais que se perderiam no caso da população ser misturada com outras (SOLÉ-CAVA; CUNHA, 2012). Por outro lado, se a população da espécie é homogênea ao longo de toda área de ocorrência é viável concentrar a proteção da espécie em apenas uma área, usando indivíduos desta área para recolonização das outras quando necessário (HAIG, 1998).

No caso dos peixes de água doce, suas populações em geral se distribuem por locais isolados, o que pode minimizar as trocas gênicas entre elas, levando a processos de diferenciação genética (HILSDORF; PETRERE, 2002). Além disso, diferentes espécies podem compartilhar o mesmo sistema hidrográfico, mas seus comportamentos de dispersão e histórias únicas de vida podem produzir diferentes padrões e taxas de fluxo gênico (VRIJENHOEK, 1998). Desta forma, para ações de conservação destes organismos é importante considerar a distribuição genética dentro e entre bacias, bem como as possíveis relações entre destruição ambiental, perda de variabilidade genética e subdivisão de estoques (HISDORF et al., 2006).

Os padrões de migração e dispersão são frequentemente crípticos para assegurar a sobrevivência das espécies. Estas informações são difíceis de serem diretamente determinadas, mas podem ser inferidas através de análises genéticas (FRANKHAM et al., 2010).

Os marcadores moleculares demonstram grande utilidade no estudo da estrutura genética de populações (SOLÉ-CAVA, CUNHA, 2012), principalmente aqueles que buscam a detecção do polimorfismo genético ao nível de sequência de DNA (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998), pois permitem uma avaliação da diversidade genética livre de influências do ambiente ou do estágio de desenvolvimento do organismo analisado (LACERDA et al., 2002).

Entre estas ferramentas moleculares, destacam-se os marcadores que possuem como base a amplificação de DNA via PCR (*Polymerase Chain Reaction*), como RAPDs, AFLPs, Microsatélites, SNPs e análises de sequências

(MATIOLI; PASSOS-BUENO, 2012). A facilidade, rapidez, versatilidade e sensibilidade da PCR, torna a técnica particularmente poderosa no estudo de populações (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998).

2.5 ESTRUTURA GENÉTICA DE PEIXES SEDENTÁRIOS NEOTROPICAIS

A análise de DNA tem proporcionado um crescimento significativo no conhecimento sobre estrutura genética das espécies e suas respostas às alterações ambientais. Isto é fundamental para o manejo das populações de peixes nativos e para o estabelecimento de Unidades Evolutivas Significantes capazes de conservar a integridade genética dessas populações (PIORSKI et al., 2008).

Grande parte do conhecimento que se tem sobre a estrutura e diversidade genética de peixes de água doce na região neotropical está relacionada a espécies migradoras. Populações naturais de espécies como *Pimelodus maculatus* (ALMEIDA et al., 2003) e *Salminus brasiliensis* (LOPES et al., 2007) foram estudadas na bacia do rio Paranapanema (alto rio Paraná). No rio Paraná *Pseudoplatystoma corruscans* (SEKINE et al., 2002; PEREIRA et al., 2009) e na bacia do rio Paraguai *Brycon hilarii* (SANCHES e GALETTI, 2008), *Pseudoplatystoma reticulatum* (ABREU et al., 2009) e *Piaractus mesopotamicus* (CALCAGNOTTO; DESALLE, 2009) este último também estudado na bacia do rio Paraná.

Na bacia do rio São Francisco, estudos de genética de populações foram realizados em *Brycon lundii* (WASKO; GALETTI, 2002), *Prochilodus costatus* (CARVALHO-COSTA et al., 2008), *Prochilodus argenteus* (HATANAKA et al., 2006), *Prochilodus marggravii* (HATANAKA; GALETTI, 2003). Na bacia do rio Paraíba do Sul, *Brycon insignis* (MATSUMOTO; HILSDORF, 2009) e na bacia do Rio Uruguay as espécies *Pimelodus maculatus*, *Prochilodus lineatus*, *Salminus brasiliensis* e *Steindachneridion scripta* (RAMELLA et al., 2006).

Considerando a estrutura genética de espécies não migradoras, alguns estudos foram realizados com lambaris das espécies *Astyanax altiparanae* (PRIOLI et al., 2002; PERES et al., 2005; LEUZZI et al., 2004), *Astyanax scabripinis* (SOFIA et al., 2006), *Astyanax fasciatus* (PAZZA et al., 2007) e *Astyanax aff. bimaculatus* (PAMPONET et al., 2008). No entanto, estas espécies não podem ser ditas sedentárias, já que executam pequenos deslocamentos durante o período reprodutivo (DUKE-ENERGY, 2008).

Entre os poucos estudos envolvendo espécies sedentárias, uma boa parte (principalmente os mais elaborados, utilizando marcadores mais informativos) está relacionada a espécies que apresentam algum valor econômico nas bacias onde ocorrem. Na bacia Amazônica, o pirarucu (*Arapaima gigas*), importante recurso pesqueiro da região (FARIAS et al., 2003), foi estudado por meio do DNA mitocondrial em oito localidades da bacia, sendo evidenciada relações entre os padrões de diferenciação e a sobre-exploração (HRBEK et al., 2005). Dois anos depois, Hrbek et al. (2007) analisam a mesma espécie através de marcadores microsatélites em sete localidades, adquirindo informações importantes para planos de conservação.

As espécies amazonenses do gênero *Cichla* (Tucunarés) integram a família Cichlidae e constituem um grande problema de introdução de espécies para varias outras bacias (CARVALHO et al., 2009). Oliveira et al. (2006) usando PCR-RAPD analisaram espécies deste gênero da bacia do Amazonas e do alto Paraná através de DNA mitocondrial e PCR-RAPD, identificando para bacia do alto Paraná, possíveis introduções múltiplas e presença de híbridos.

A espécie *Hoplias malabaricus* (Traira) foi estudada através de análises de PCR-RAPD e DNA mitocondrial por Dergam et al. (2002) em ambientes lacustres e ribeirinhos da bacia do Rio Doce (MG), sendo testada a diferenciação genética das populações e as relações biográficas com outras bacias. Os resultados demonstraram diferenças genéticas entre os tipos de ambientes e um padrão biogeográfico compartilhado entre as bacias vizinhas.

Para as espécies sedentárias que fazem parte do grupo de peixes considerados de pequeno porte, ou, seja, que não ultrapassam 200 mm de comprimento total (VAZZOLER, 1999), o conhecimento sobre estrutura e diversidade genética é limitado a um pequeno número de publicações que envolvem a aplicação de aloenzimas e PCR-RAPD, o que destaca a necessidade de mais estudos e desenvolvimento de marcadores mais informativos.

Philippsen et al. (2009) utilizaram aloenzimas para analisar quatro populações de *Neoplecostomus yapo* provenientes de ribeirões da bacia do rio Paranapanema, observando baixos índices de diversidade e poucas diferenças entre as populações. Sofia et al. (2008) aplicaram a técnica de RAPD no estudo de populações de *Hypostomus ancistroides* amostradas em quatro locais ao longo de um ribeirão da bacia do rio Tibagi (PR), sugerindo o sedentarismo da espécie como

possível explicação para a estruturação e os diferentes níveis de variabilidade observados.

Estudos visando à compreensão da distribuição genética de espécies de pequeno porte são essenciais para a conservação da ictiofauna neotropical. Na América do Sul, estas constituem aproximadamente 50% do total de espécies de peixes de água doce, exibindo um elevado grau de endemismo em diversas bacias (CASTRO et al., 2003). Em um levantamento realizado por Langeani et al. (2007) na bacia do alto rio Paraná, 65% das trezentas e dez espécies encontradas eram de pequeno porte.

Reforçando esta importância, destaca-se que grande parte destas espécies habitam ribeirões (CASTRO, 1999; CASTRO et al., 2003; SHIBATTA; CHEIDA, 2003), ambientes que apresentam características exclusivas, não sendo possível a aplicação dos conhecimentos adquiridos em corpos d'água maiores (ESTEVES e ARANHA, 1999). O pequeno volume de água que apresentam e a fragilidade de sua ictiofauna tornam estes ambientes muito sensíveis às ações antropogênicas que interferem no ambiente (LUIZ et al., 1988).

2.6 MARCADORES MICROSSATÉLITES

Dentre uma ampla variedade de marcadores moleculares disponíveis para medir a diversidade genética nas sequências de bases do DNA, a técnica de microssatélites se destaca como uma das preferidas (FRANKHAM et al., 2010). Considerada a ferramenta molecular com maior potencial global em estudos de peixes (O'CONNELL; WRIGHT, 1997), este marcador constitui atualmente uma das principais ferramentas no estudo populacional destes organismos (PIORSKI et al., 2008).

Também conhecidos como repetições curtas em *tandem* (*STR - short tandem repeats*) ou sequências simples repetidas (*SSR - simple sequence repeats*) (MATIOLI; PASSOS-BUENO, 2012), os microssatélites são *motifs* (unidades de repetição) de 1 a 6 bases repetidas em *tandem* encontradas em maior ou menor abundância no genoma nuclear e organelas de quase todos os organismos conhecidos. Eles estão presentes em regiões codificantes e não codificantes do DNA e são geralmente caracterizados por um alto grau de polimorfismos decorrentes de variações no número de repetições do *motifs*. Além

disso, apresentam padrão de herança mendeliana codominante e tamanho pequeno, o que facilita a genotipagem por amplificação via (PCR) (LIU, 2007; ZANE et al., 2002; CHAMBERS; MACAVOY, 2000).

Os microssatélites são estruturas muito frequentes que apresentam distribuição aleatória, permitindo uma ampla cobertura do genoma eucariótico (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998). Estas características fornecem a base para a sua utilização bem sucedida em um grande número de estudos dos principais campos relacionados à biologia e a medicina, incluindo forense, epidemiologia, epidemiologia molecular, parasitologia, genética de populações e da conservação, mapeamento genético e análise genética de características complexas (CHISTIÁKOV et al., 2006).

Os microssatélites são mais vantajosos que muitos os outros métodos de avaliação de polimorfismo de DNA, pois, sua alta variação, permite que genótipos individuais sejam diretamente inferidos e que indivíduos possam ser genotipados após amostragem não invasiva (FRANKHAM et al., 2010). Seu padrão de herança codominante (onde cada um dos dois alelos em um loco pode ser identificado) possibilita análises muito mais robustas, flexíveis e informativas do que marcadores dominantes (SUNNUCKS, 2000).

Possivelmente, os erros na replicação do DNA que resultam do deslizamento da enzima DNA Polimerase (*replication slippage*) constituem o principal mecanismo de mutação envolvido na origem dos vários alelos microssatélites. Por outro lado, pareamentos e *crossing-overs* desiguais parecem ter um papel mais importante no surgimento de polimorfismos em sequências repetitivas com repetições maiores que 10 pb (ELLEGRÉN, 2004).

Reconhecendo o papel da mutação, dois modelos foram desenvolvidos para lidar com análises microssatélites. Estes são o *Infinite Alleles Model* (IAM) ou modelo de alelos infinitos e o *Stepwise Mutation Model* (SMM) ou modelo de mutação passo a passo. Dentro do modelo IAM, cada mutação converte um alelo em outro pelo ganho ou perda instantânea de qualquer número de repetições em *tandem*. Em contraste, no modelo SMM, a mutação resulta apenas no ganho ou perda de uma única unidade de repetição e, assim, a variação é gerada de forma gradual para cima ou para baixo do estado alélico inicial (LOWE et al., 2004). Contudo, nenhum destes dois modelos (IAM e SMM) parece se encaixar perfeitamente nos padrões observados nos microssatélites, o qual provavelmente

encontra-se em algum lugar entre estes dois modelos extremos de mutações (BALLOUX e LUGON-MOULIN, 2002).

Considerando a dificuldade na definição do padrão mutacional dos microsatélites, foi desenvolvido o modelo *Two Phase Model* (TPM) ou modelo de duas fases (que considera IAM e SSM). Este modelo tem como base a teoria de coalescência, assumido diferentes processos mutacionais e a história demográfica na estimativa da variância do número de repetições de um microsatélite. O modelo TPM propõe que a instabilidade dos alelos é devida principalmente ao aumento ou diminuição de uma unidade repetitiva, com probabilidade igual a p , mas que mutações envolvendo mais de uma unidade repetitiva também podem acontecer, com probabilidade igual a $1-p$ (DI RIENZO et al., 1994).

Os altos níveis de variabilidade dos microsatélites, sua velocidade de processamento e o potencial de um conjunto de locos suficientes, fornecem um sistema marcador capaz de detectar diferenças entre populações estreitamente relacionadas (O'CONNELL; WRIGHT, 1997). Deste modo, pode encontrar divergências consideráveis até mesmo entre populações separadas por curtas distâncias geográficas (KOSKINEN et al., 2002).

2.7 ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE LOCOS MICROSSATÉLITES

Um dos fatores limitantes para o emprego da técnica de microsatélites é a disponibilidade de informação (em termos de sequências de nucleotídeos) a respeito de regiões que possuem as repetições nos organismos que se deseja estudar. (MATIOLI; PASSOS-BUENO, 2012). Na maioria das vezes, esses marcadores precisam ser isolados e caracterizados de *novo* para cada espécie de interesse, sendo financeiramente custoso e tecnicamente elaborado e intensivo (ZANE et al., 2002).

Em casos onde as informações de sequenciamento da região ou do genoma da espécie de interesse não estão disponíveis nos bancos de dados, uma das opções para o isolamento de microsatélites são os métodos que tem como base a construção de bibliotecas genômicas (MATIOLI; PASSOS-BUENO, 2012). Metodologias mais tradicionais com esta finalidade acabam sendo demoradas e com uma baixa eficiência, no entanto, em organismos com um elevado número de

microsatélites (por exemplo, peixes) otimizações de protocolos possibilitam bom acesso as essas regiões (ZANE et al., 2002).

A forma mais tradicional para se localizar os fragmentos com regiões repetitivas entre os clones de uma biblioteca genômica, consiste em hibridação entre sondas repetitivas marcadas e o DNA dos clones imobilizados em uma membrana. Uma vez detectados, estes são sequenciados para obter a sequência das regiões que flanqueiam as repetições e também para confirmar a existência da repetição. A etapa seguinte é o desenho dos *primers* que deverão ser empregados na análise de genótipos (MATIOLI; PASSOS-BUENO, 2012). Zane et al. (2002) também propuseram uma metodologia que possibilita rápido isolamento de regiões microsatélites, o método conhecido como FIASCO (*"Fasted Isolation by AFLP of Sequences Containing Repeats"*) se baseia nos princípios da técnica AFLP (*"Amplified Fragment Length Polymorphism"*).

Alternativamente, um método preferível para obtenção de regiões microsatélites são as bibliotecas enriquecidas (ZANE et al., 2002). Este tipo de biblioteca é construída enriquecendo o DNA digerido com fragmentos que possuem regiões repetitivas antes da clonagem, para isso empregam oligonucleotídeos sintéticos associados a partículas paramagnéticas seguindo o protocolo de Refseth et al. (1997). Com base neste princípio um método mais eficaz e com menor custo foi descrito por Billote et al. (1999).

A base deste protocolo consiste na utilização de oligonucleotídeos repetitivos ligados quimicamente à biotina. Nas etapas iniciais é necessária a ligação de adaptadores com sequências conhecidas (uso de DNA ligase) as extremidades coesivas resultantes da digestão do genoma por enzimas de restrição, o que possibilita a amplificação via PCR. Posteriormente o DNA é desnaturado e hibridado com os oligonucleotídeos repetitivos. Partículas paramagnéticas recobertas com estreptavidina (uma proteína com alta afinidade por biotina) são então adicionadas e em seguida, atraídas por ímãs. As partículas são lavadas e, quando aquecidas, liberam os fragmentos que contenham sequências microsatélites. A PCR possibilita tanto o enriquecimento da fração do genoma que possui as repetições desejadas, como a reconstituição da fita dupla, o que possibilita a clonagem posterior. Os clones individuais têm então seus incertos sequenciados e aqueles que possuem tanto as sequências com repetições como as regiões flanqueadoras são utilizadas para o desenho dos *primers* (MATIOLI; PASSOS-BUENO, 2012)

2.8 MICROSSATÉLITES EM PEIXES NEOTROPICAIS DE ÁGUA DOCE

Apesar da grande diversidade da ictiofauna de água doce neotropical, poucas espécies apresentam locos microssatélites descritos (SILVA; HILDORF, 2011). Contudo, publicações com o isolamento e caracterização de *primers* para a amplificação de locos microssatélites destas espécies estão se tornando mais comuns nos últimos anos.

Locos microssatélites estão disponíveis na literatura para peixes neotropicais como *Phractocephalus hemiliopterus* (SOUZA et al., 2012) *Salminus hilarii* (SILVA; HILDORF, 2011), *Colossoma macropomum* (HAMOY et al., 2011), *Pseudoplatystoma punctifer* (SAULO-MACHADO et al., 2011), *Salminus brasiliensis* (RUEDA et al., 2011), *Prochilodus lineatus* (YAZBECK; KALAPOTHAKIS et al., 2011), *Cichla monoculus* (LIMA et al., 2010), *Hoplias malabaricus* (GONDIM et al., 2010), *Brachyplatystoma vaillantii* (RODRIGUES et al., 2009), *Cichla piquiti* (CARVALHO et al., 2009), *Zungaro jahu* (CARRILLO-AVILA et al., 2009), *Prochilodus argenteus* (BARBOSA et al., 2008), *Pimelodus maculatus* (PAIVA; KALAPOTHAKIS, 2008), *Leporinus macrocephalus* (MORELLI et al., 2007), *Prochilodus costatus* (CARVALHO - COSTA et al., 2006), *Prochilodus argenteus* (BARBOSA et al., 2006), *Brycon hilarii* (SANCHES; GALETTI, 2006), *Pseudoplatystoma corruscans* (REVALDAVES; PEREIRA, 2005), *Brycon opalinus* (BARROSO et al., 2003), *Arapaima gigas* (FARIAS et al., 2003) e *Piaractus mesopotamicus* (CALCAGNOTTO et al., 2001).

Contudo, é importante destacar que todas as espécies citadas acima são de grande porte e/ou migradoras. Para espécies não migradoras de pequeno porte existem poucas publicações, limitando-se a *Astyanax altiparanae* (ZAGANINI et al., 2012) e *Astyanax fasciatus* (STRECKER, 2003), *Hypostomus gymnorhynchus* (TELLES et al., 2010), *Pimelodella chagresi* (MOESER; BERMINGHAM, 2005) e *Eigenmannia sp.* (MOYSÉS et al., 2005), de modo que, apenas os três últimos são peixes de hábito sedentário.

O uso de marcadores microssatélites tem demonstrado um grande sucesso em estudos genéticos de populações naturais de peixes neotropicais, possibilitando importantes conclusões. Em espécies da ordem siluriformes estes marcadores possibilitaram a detecção de evidências de estruturação genética em *Pseudoplatystoma reticulatum* de diferentes locais da Bacia do rio Paraguay

(ABREU et al., 2009) e de fidelidade aos locais de reprodução em *Pseudoplatystoma corruscans* (PEREIRA et al., 2009). Para a espécie da ordem Osteoglossiformes *Araipama gigas*, estes marcadores possibilitaram identificar restrições na capacidade de fluxo gênico, relacionadas à distância geográfica entre ecossistemas Amazônicos de várzea (HRBEK et al., 2007).

Em espécies da ordem Characiformes, permitiram a identificação de diferenciação genética baixa, porém significativa, entre populações de *Piaractus mesopotamicus* provenientes de rios livres de barreiras físicas no Pantanal e rios da bacia do rio Paraná, alterados por inúmeras barragens (CALCAGNOTTO; DESALLE, 2009), também evidências de eventos demográficos e estruturação em populações de *Brycon insignis* na região sudeste do Brasil (MATSUMOTO; HILSDORF, 2009), caracterização de uma única unidade reprodutiva para *Prochilodus costatus* de três localidades a jusante de barragem de Três Marias no rio São Francisco (CARVALHO-COSTA et al., 2008) e ocorrência de sub-estruturação em populações de *Prochilodus argenteus* da mesma localidade (HATANAKA et al., 2006,).

Além disso, também possibilitam um bom conhecimento da diversidade genética em estoques de peixes em cativeiro (BARROSO et al., 2005; MOREIRA et al., 2007; LOPERA-BARRERO et al., 2010; RODRIGUEZ-RODRIGUEZ et al., 2010; POVH et al., 2011).

Considerando que nenhum destes trabalhos envolve peixes sedentários de pequeno porte e que são poucas as publicações de *primers* para o estudo de regiões microssatélites nestas espécies, novas descrições e o desenvolvimento de mais estudos, possibilitariam um grande avanço no conhecimento genético das populações destas espécies, sendo isto essencial em futuras ações de conservação.

2.9 MARCADORES AFLPS

O AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*), ou seja, polimorfismos de tamanho de fragmentos amplificados é uma técnica que permite a amplificação de fragmentos do genoma através de PCR, após estes terem sido originados pela digestão do genoma por enzimas de restrição (MATIOLI; PASSOS-BUENO, 2012). Esta técnica combina os princípios dos marcadores RAPD e RFLP. Os fragmentos (80 a 500 pb) são obtidos através da digestão do DNA por enzimas

de restrição, seguidos da ligação de oligonucleotídeos adaptadores, amplificação dos fragmentos a partir de *primers* que se hibridam com os adaptadores e eletroforese em géis de alta resolução, sendo visualizados por auto-radiografia, coloração com nitrato de prata ou fluorescência (VOS et al., 1995)

A fase crítica diz respeito à quantificação cuidadosa do DNA digerido e dos adaptadores para a reação de ligação (MATIOLI; PASSOS-BUENO, 2012). A técnica tem como base quatro etapas: a primeira envolve a clivagem do DNA genômico através de duas enzimas de restrição diferentes, uma que realiza cortes raros (reconhecendo sítios de corte com seis a oito nucleotídeos) como *EcoRI*, e outra que realiza cortes frequentes (reconhecendo sítios de corte com quatro nucleotídeos) como *MseI*; a segunda etapa envolve a ligação de adaptadores, oligonucleotídeos complementares às extremidades que resultam da clivagem realizada pelas enzimas de restrição; na terceira etapa os fragmentos são pré-amplificados a partir da utilização de *primers* que são complementares aos adaptadores, mas possuem uma base seletiva adicional em 3' (Ex: adaptador *EcoRI* + C e adaptador *MseI* + T) e na quarta etapa é realizada uma amplificação seletiva utilizando *primers* contendo dois ou três nucleotídeos adicionais na extremidade 3'. O número de fragmentos detectados em uma única reação pode ser "ajustado" pela seleção de conjuntos de *primers* específicos (VOS et al., 1995).

AFLP é bem adaptado para vários tipos de análises genéticas, tais como sistemática molecular, análise de estruturas de populações, migração, identificação de híbridos, identificação de estirpes, identificação de paternidade, análise de recursos genéticos, diversidade genética, contribuições para a reprodução, proteção de espécies ameaçadas de extinção, ecologia molecular, seleção assistida por marcadores e mapeamento do genoma (LIU, 2007). É uma técnica robusta, que pode fornecer uma das análises mais eficientes, confiáveis e econômicas dentro da genética de populações. São marcadores de DNA nuclear com padrão de herança mendeliana, em contraste aos marcadores ambientais e mitocondriais. Comparado a outros marcadores nucleares, como RFLP e RAPD, fornecem um nível muito maior de polimorfismo e uma cobertura muito mais ampla do genoma (LIU, 2005).

É uma ótima técnica molecular para estudos de conservação e manejo da biodiversidade, com utilidade em uma grande variedade de aplicações (LUCCHINI, 2003). A maior limitação da técnica provém de sua natureza dominante,

o que relativamente fornece menos informações genéticas, uma vez que indivíduos homocigotos e heterocigotos não podem ser diferenciados (LIU, 2007). Contudo, essa desvantagem é compensada pelos altos níveis de polimorfismo e também pelo fornecimento de um grande nível de compartilhamento de bandas, o que é necessário para estabelecer relacionamento entre as populações (LIU, 2005).

Utilizando temperaturas rigorosas de pareamento dos *primers*, a reprodutibilidade do AFLP é aumentada substancialmente (LIU, 2007), se apresentando bem maior do que outros marcadores como o RAPD (BAGLEY et al., 2001). Segundo Savelkoul et al. (1999) a técnica é um método de genotipagem amplamente aplicável, com alto grau de reprodutibilidade e poder discriminatório, de modo que poderia permitir a elaboração de uma base de dados de genótipos e o intercâmbio de dados entre os laboratórios.

Este marcador vem se demonstrando uma eficiente ferramenta no estudo da genética de peixes (KOCHER et al., 1998; CHONG et al., 2000; WANG et al., 2000; LIU et al., 2003; CAMPBELL; BERNATCHEZ, 2004; SULLIVAN et al., 2004; BARLUENGA et al., 2006; BARRETO; MCCARTNEY, 2007), no entanto ainda é escasso o seu uso em estudos populacionais de peixes de água doce neotropicais.

2.10 DNA MITOCONDRIAL (*D-LOOP*)

O DNA mitocondrial (DNAMt) animal constitui uma molécula de dupla fita circular e que codifica aproximadamente 5% de toda a maquinaria necessária para o funcionamento da mitocôndria (ARIAS; INFANTE-MALACHIAS, 2012). Sua organização inclui 37 genes, 13 que codificam RNA mensageiros de proteínas envolvidas diretamente no processo de transporte de elétrons e fosforilação oxidativa, 22 de RNA transportadores (tRNAs), 2 de RNA ribossômicos (12S e 16S rRNA) e uma região não codificadora chamada de região controle ou alça D (*D-loop*) (ANDERSON et al., 1981; AVISE et al., 1986).

O DNA mitocondrial é tido como uma molécula econômica, pois toda sua sequência de nucleotídeos (exceto a alça D) possui função codificadora. Regiões espaçadoras são raramente descritas e presença de *introns*, pseudogenes e sequências repetitivas são ainda mais raras ou ausentes. O conteúdo em termos de genes e o arranjo em sua ordem são extremamente conservados, algumas diferenças na ordem são relatadas normalmente em comparações entre organismos

que divergiram há muito tempo, como entre táxons ao nível das categorias taxonômicas de ordem e classe. Na maioria das vezes, essas alterações de ordem (ou seja, translocações de gene) envolvem genes codificadores de RNA transportador (ARIAS; INFANTE-MALACHIAS, 2012).

Entre os principais atrativos para o uso de DNAm_t em estudos genéticos pode-se incluir a sua facilidade de purificação. Esta característica é resultante de uma densidade dinâmica incomum, um elevado número de cópias, tamanho pequeno e também pelo fato da molécula estar localizada em uma organela diferente do núcleo (AVISE et al., 1984; WILSON et al., 1985).

Além da estrutura simples de organização, outros fatores são determinantes para seu grande potencial em análises populacionais e evolutivas. O fato de ser uma herança citoplasmática, herdada apenas via materna, elimina a ocorrência de eventos de recombinação. Estes dois fatores, herança materna e a não recombinação, tornam um genótipo ou haplótipo mitocondrial muito útil no delineamento da genealogia materna ou mesmo filogenia materna (ARIAS; INFANTE-MALACHIAS, 2012). Além disso, o DNA mitocondrial possui a vantagem de ter uma alta taxa de evolução (mutações), cerca de 5 a 10 vezes maior ($5,7 \times 10^{-8}$ substituição/sítio/ano) do que os genes codificadores de proteínas do DNA nuclear (BROWN, 1980; BROWN et al., 1982).

Esta elevada taxa evolutiva possivelmente está ligada a baixa eficiência do sistema de reparo da organela, visto que todas as enzimas envolvidas nesse processo são codificadas pelo genoma nuclear e, portanto, importadas para a mitocôndria ou, ainda, a alta exposição a radicais livres que poderiam ser gerados durante o processo de respiração. Apesar da frequência elevada de mutações, os indivíduos normalmente apresentam somente um tipo de molécula de DNAm_t em todas as células de todos os tecidos (ARIAS; INFANTE-MALACHIAS, 2012).

A taxa mutacional apresentada pelo DNAm_t permite que ele possa ser utilizado para inferir relações filogenéticas entre populações ou espécies com tempos de divergência relativamente recentes entre milhares e alguns milhões de anos (BROWN et al., 1979). Contudo, existe uma diferença entre na taxa de acúmulo de substituições de base entre os diferentes genes ou regiões do DNAm_t. Alguns genes acumulam mais rapidamente essas substituições (ex. NADH , COX-1 e tRNA) e outros são muito conservados (ex. Cit *b* e subunidades ribossômicas) (ARIAS; INFANTE-MALACHIAS, 2012).

O maior acúmulo de mutações dentro do DNA mitocondrial se localiza na sequência da região controladora da replicação. Este trecho de DNA, conhecido como região A+T nos invertebrados e “alça D” ou *D-loop* nos vertebrados, possui o controle da replicação e da transcrição das fitas H (pesada) e L (leve) do DNAm e não codifica nenhuma proteína. Suas mutações podem ser do tipo substituição de base ou inserção/deleção, esse último, muito comum para a região, levando a alterações no tamanho total da molécula (BROWN et al., 1986; ARIAS; INFANTE-MALACHIAS, 2012).

A região controle “*D-loop*” apresenta sequências variáveis que evoluem quatro a cinco vezes mais rápido que outros trechos da molécula de DNAm (HORAI; HAYASAKA, 1990). Desse modo, em estudos de espécies estreitamente relacionadas ou populações de uma mesma espécie, o sequenciamento desta região pode proporcionar um melhor resultado envolvendo menos esforço do que seria necessário a partir de outras técnicas (TABERLET, 1996).

O estudo da região controle do DNAm (*D-loop*) tem fornecido grandes contribuições ao conhecimento genético de peixes da região Neotropical, apresentando grande eficiência em análises biogeográficas (SIVASUNDAR et al., 2001; MONTOYA - BURGOS et al., 2003) e filogeográficas (BATISTA; ALVES-GOMES, 2006), em estudos filogenéticos (PANARARI-ANTUNES et al., 2008; BIGNOTTO et al., 2009; PIE et al., 2009; TERCENIO et al., 2012) e em análises de estrutura e diversidade genética de populações naturais de diversas espécies desta região (MARTINS et al., 2003; MATOSO et al., 2010; GARCEZ et al., 2011).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Considerando a falta de conhecimento sobre a estrutura e diversidade genética de espécies de peixes de pequeno porte e sedentárias da região Neotropical, este trabalho teve como objetivos principais, isolar e caracterizar locos microssatélites polimórficos para *G. brasiliensis*, e posteriormente empregar tais marcadores juntamente com marcadores AFLPs e mitocondrial (*D-loop*) em um estudo de estrutura e diversidade genética da espécie ao longo de uma bacia hidrográfica Neotropical.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Confeccionar uma biblioteca genômica enriquecida em regiões repetitivas para *G. brasiliensis* e identificar os fragmentos com regiões microssatélites.
- Desenhar *primers* para os locos microssatélites, otimizar as condições de amplificação e análise dos *primers* e testar sua aplicabilidade em estudos populacionais de *G. brasiliensis* e de outros membros da família Cichlidae.
- Analisar por meio de marcadores microssatélites, AFLPs e sequência mitocondrial (*D-loop*) a estrutura e a diversidade genética de amostras de *G. brasiliensis*, coletadas em cinco trechos do rio Laranjinha e um trecho de um pequeno tributário (ribeirão do Penacho).
- Buscar informações que possam contribuir com um melhor entendimento da forma de organização diversidade genética de espécies de pequeno porte e sedentárias, além dos fatores que podem influenciar em seus padrões de estruturação genética e fluxo gênico.
- Contribuir com conhecimentos que possam ser importantes para futuras ações de manejo e conservação da espécie.

4 TRABALHOS

4.1 TRABALHO 1

Desenvolvimento e caracterização de quatorze *loci* microssatélites no peixe Neotropical *Geophagus brasiliensis* (Perciformes, Cichlidae)

¹Este trabalho foi submetido à revista ***Journal of Fish Biology***

Desenvolvimento e caracterização de quatorze *loci* microssatélites no peixe Neotropical *Geophagus brasiliensis* (Perciformes, Cichlidae)

D. G. FERREIRA¹, B. A. GALINDO², A. N. ALVES¹, F. S. ALMEIDA¹, C. F. RUAS¹ AND S. H. SOFIA^{1*}

RESUMO

Quatorze locos microssatélites polimórficos foram isolados e caracterizados para o ciclídeo Neotropical *Geophagus brasiliensis* e testados em 30 indivíduos pertencentes a uma única população. Do total de *loci* descritos, quatro apresentaram uma possível presença de alelos nulos, inferida a partir do excesso de genótipos homozigotos detectado. Destes quatro *loci*, três apresentaram desvios significativos do equilíbrio de Hardy-Weinberg. Cinquenta e nove alelos diferentes foram detectados, os quais variaram de dois a oito alelos por *locus*. Os níveis de heterozigidade observada (H_o) e esperada (H_e) variaram de 0,167 a 0,667 e 0,259 a 0,825, respectivamente. O conteúdo de informação polimórfica (PIC) variou de 0,222 a 0,656, media de 0,502. Sucessos na amplificação cruzada destes *primers* foram obtidos para outras cinco espécies da família Cichlidae.

Palavra chave: Marcador molecular. Geophagini. Biblioteca genômica. SSR.

Introdução

O peixe Neotropical *Geophagus brasiliensis* (Quoy & Gaimard, 1824), popularmente conhecido como acará, cará, papa terra, entre outros nomes, é uma espécie da família Cichlidae amplamente distribuída na América do Sul (Kullander, 2003). Esta espécie geralmente habita o fundo de ambientes costeiros de rios, lagos, reservatórios e córregos (Lowe-McConnell, 1991), sendo encontrada tanto em locais preservados como em perturbados (Teixeira et al., 2005), onde explora uma grande variação de itens alimentares, incluindo frutas, sementes, restos de sedimentos e invertebrados aquáticos (Abelha & Goulart, 2004). No Brasil, *G. brasiliensis* representa um componente habitual da ictiofauna de diferentes bacias hidrográficas (Araújo & Santos, 2001; Castro et al. 2003, 2004; Shibatta & Silva-Souza, 2008).

¹ Departamento de Biologia Geral, Universidade Estadual de Londrina, Rod. Celso Garcia Cid, km 380, Londrina, PR, 86051-980, Brazil

² Laboratório de Genética e Conservação (GECON), Universidade Estadual do Norte Paraná, Rua Portugal, 340, Cornélio Procópio, PR, 86300-000, Brazil

* Autor para correspondência. Telefone: +55 43 33714417; email: shsofia@uel.br

Semelhante a outros membros da família Cichlidae encontrados na América do Sul, *G. brasiliensis* apresenta hábito sedentário (Winemiller, 1989) e cuidado parental (Wimberger, 1991, 1992; Kullander, 2003; Menezes et al, 2007.). Durante o período reprodutivo, que varia, com algumas exceções (Mazzoni & Iglesias-Rios, 2002), de setembro a abril (Santos & Fontoura, 2000), um casal de *G. brasiliensis* efetua a desova sobre uma superfície limpa e geralmente elevada, onde os ovos aderem (Wimberger, 1991, 1992). Embora o cuidado parental geralmente seja apresentado por ambos os sexos em espécies de cichlideos neotropicais, em *G. brasiliensis*, o cuidado parental é em sua maioria realizado pelas fêmeas, que incubam os ovos e fornecem refúgio para as larvas recém-nascidas em sua boca (Kullander, 2003; Menezes et al., 2007). Os ovos eclodem em cerca de cinco dias, e quando os filhotes estão com cerca de 3-4 mm, começam a se alimentar de forma exógena (Wimberger, 1991).

A ictiofauna de água doce neotropical é uma das mais diversificadas do planeta, com 71 famílias e uma estimativa de mais de 6000 espécies existentes, das quais, 600 pertencem à família Cichlidae (Reis *et al.*, 2003). Infelizmente, várias formas de interferência antrópica, principalmente desmatamento, poluição ambiental, pesca descontrolada, introdução de espécies exóticas e construção de barramentos, têm causado a degradação dos diversos ecossistemas aquáticos continentais, resultando no declínio desta rica biodiversidade (Agostinho *et al.*, 2005). Diante de tantas ameaças, compreender como as espécies de peixes estão geneticamente organizadas ao longo das bacias hidrográficas é fundamental para a elaboração de estratégias eficientes de manejo e conservação de suas populações (Carvalho, 1993; Galetti Jr *et al.*, 2008). Atualmente, as ferramentas moleculares mais utilizadas no estudo da estrutura e diversidade genética de peixes são os microssatélites (Piorsk *et al.*, 2008), marcadores codominantes e altamente polimórficos (Sunnucks, 2000; Zane *et al.*, 2002).

Apesar da grande diversidade da ictiofauna neotropical, locos microssatélites ainda não foram isolados e caracterizados para a maioria das espécies (Silva & Hilsdorf, 2011). No caso particular de espécies de peixes sedentárias de pequeno porte, o número de publicações é ainda mais limitado (Moeser & Bermingham, 2005; Moysés *et al.*, 2005; Telles *et al.*, 2010), dificultando o desenvolvimento de estudos genéticos populacionais mais elaborados para as espécies com estas características.

O presente trabalho apresenta a descrição do isolamento e caracterização de 14 locos microssatélites para *G. brasiliensis*, que poderão ser úteis para estudos genéticos de populações desta espécie de peixe neotropical e, potencialmente, outras pequenas espécies da tribo Geophagini (família Cichlidae), onde for possível a amplificação cruzada.

Metodologia

Uma biblioteca genômica enriquecida foi construída para *Geophagus brasiliensis* de acordo com o protocolo descrito por Billotte *et al.* (1999) com algumas modificações propostas por Brito *et al.* (2009). O DNA foi isolado do tecido muscular usando um protocolo padrão de fenol/clorofórmio (Almeida *et al.*, 2001). O DNA genômico (5 µg) foi digerido com 50 U de *Rsa* I e, em seguida, ligado através de T4 DNA ligase (Invitrogen, MA), aos adaptadores de fita simples (10 µM cada): *Rsa*21 (5'CTCTTGCTTACGCGTGGACTA3') e *Rsa*25 (5'TAGTCCACGCGTAAGCAAGAGCACAA3'). Os fragmentos foram selecionados pelas sondas (CT)₈ e (GT)₈ e em seguida clonados utilizando o vetor pGem®-T (Promega). Os plasmídeos recombinantes foram utilizados para transformar *E. coli* DH5- α linhagem. Um total de 96 clones recombinantes foram selecionados e sequenciados utilizando o kit Big Dye Terminator™ (v 3.1 - Applied Biosystems), sendo a leitura das sequências efetuada em sequenciador automático ABI 3730. As sequências foram analisadas usando programa BioEdit v.7.0 (Hall, 1999) e os *primers* desenhados utilizando o programa Primer 3 (Rozen & Skaletsky, 2000). Os *primers forward* selecionados receberam uma sequência adicional M13 (5'-TGTAACGACGGCCAGT-3') na extremidade terminal 5' (Schuelke, 2000). O programa AutoDimer (Vallone & Butler, 2004) foi utilizado para testar as possibilidades de problemas com a formação de alças e dímeros entre os *primers*. A genotipagem individual foi realizada em sequenciador automático ABI 3500xL.

Os polimorfismos foram testados usando 30 indivíduos de *G. brasiliensis* coletados no rio Laranjinha (23°25'00"S and 50°21'00"W), estado do Paraná, região sul do Brasil. Os testes de amplificação cruzada foram realizados em cinco outras espécies da família Cichlidae, *Crenicichla jaguarensis* Haseman 1911 e *Cichlasoma paranensis* Kullander, 1983, ambas também do rio Laranjinha (23°25'00"S e 50°21'00"W), *Apistogramma borellii* (Regan, 1906) e *Laetacara*

dorsigera (Heckel,1840), amostradas no rio Miranda (MS) (19°34' 37"S e 57°00' 42"W), e *Gymnogeophagus rhabdotus* (Hensel, 1870), amostrada na Lagoa Bacopari (RS) (30°31'16,20"S e 50°23' 41"W), usando cinco indivíduos de cada.

As reações de PCR foram realizadas em volume final de 5µL, contendo 1 X GoTaq Master Mix (Promega), 10 ng de DNA, glicerol 1%, 0,125 µM de *primer* marcado (FAM , HEX ou NED, Applied Biosystems, CA), 0,125 µM de *primer Reverse*, 0,0125 µM de *primer Forward*. As amplificações foram realizadas utilizando um passo inicial de desnaturação de 94°C por 4 min, seguido por 35 ciclos de 94°C durante 40 s, 48°C, 54°C ou 60°C durante 1 min, 72°C durante 1 min, e uma extensão final de 72°C durante 30 min. Os produtos de PCR foram submetidos a eletroforese em sequenciador automático (Applied Biosystems 3500 Genetic Analyzer) utilizando como padrão de peso molecular o marcador GeneScan 600 Liz (Applied Biosystems).

Os indivíduos foram genotipados através do programa GeneMarker 1,85 (SoftGenetics, State College, PA) através de uma verificação manual. Os testes de Hardy-Weinberg (HWE) e a presença de desequilíbrio de ligação entre os pares de locos foram calculados pelo programa GENEPOP 4.0.10 (Raymond & Rousset, 1995; Rousset, 2008), subsequentemente, os valores de P foram ajustados pela correção sequencial de Bonferroni (Rice, 1989). O programa GenAlEx v.6.41 (Peakall & Smouse, 2006) foi usado para estimar a heterozigotidade observada (H_o) e esperada (H_e) e o número médio de alelos por *lócus*. As estimativas do conteúdo de informação polimórfica (PIC) e possíveis alelos nulos foram obtidas através dos programas Cervus v.3.0 (Marshall *et al.*, 1998) e MicroChecker v.2.2.3 (Van Oosterhout *et al.*, 2004), respectivamente. A probabilidade de exclusão de paternidade (Q) (Weir, 1996), e as probabilidades de identidade genética (I) (Paetkau *et al.*, 1995) foram estimadas usando o aplicativo Identity 1.0 (Wagner & Sefc 1999).

Resultados e discussões

Dos 96 clones sequenciados, 65 apresentaram regiões microssatélites. Em seguida foram desenhados e confeccionados *primers* para 39 destes. Após o teste de diferentes condições de amplificação e da aplicabilidade dos

locos em estudos populacionais, 14 locos amplificaram com sucesso, demonstrando polimorfismo e ótimas condições de análise (Tabela 1).

Tabela 1 - Descrição de 14 *locos* microssatélites polimórficos isolados para a o peixe Neotropical *Geophagus brasiliensis* e resultados para cada um. *Primers* flanqueadores, T_a = temperatura de anelamento, k = número de alelos, tamanho do alelo (pb), H_o = heterozigozidade observada e H_e = heterozigozidade esperada, estimados a partir de 30 indivíduos. Q = probabilidade de exclusão de paternidade, I = probabilidade de identidade gênica, F_{IS} = coeficiente de endogamia, PIC = conteúdo de informação polimórfica, números de acesso no GenBank.

Loco	Sequência	<i>Primers</i> (5'- 3')	T_a (°C)	k	Tamanho do alelo (pb)	H_o	H_e	(Q)	(I)	PIC	F_{IS}	Acesso ao GenBank
Gbra06	(GT) ₁₀	F: GAGTCCTCTGCTGTGTGCAG R: CCTGTCAGTCCAGAGATCAG	54	4	180 - 188	0,300*	0,526	0,252	0,311	0,439	0,434 [#]	JX863375
Gbra16	(AC) ₁₃ (TC) ₉	F: TTGAAGTGAAGCCACGAG R: TGGATTACTGCAGCAAGTGG	60	4	184 - 198	0,467	0,422	0,234	0,367	0,389	-0,108	JX863376
Gbra17	(AC) ₁₂	F: CAGTGAATCACCATGCTTCC R: TGAGTAGGTGCTACATCAGTATCG	54	4	156 - 160	0,667	0,561	0,274	0,283	0,469	-0,192	JX863377
Gbra21	(TG) ₅₀	F: ACAGATGACATGAGTTGGCAC R: ACTGACGGCACCATGCTC	54	4	157 - 191	0,533	0,721	0,450	0,139	0,655	0,264 [#]	JX863378
Gbra25	(GT) ₁₀ (GA) ₆	F: CGGAGACTGTACAGAGTTAGC R: TCCAGTACACTTACTGCATCTTTG	48	3	142 - 166	0,467	0,371	0,161	0,458	0,309	-0,263	JX863379
Gbra34	(CA) ₉	F: CATAATGAAGCCCGCTCTTG R: CCTGTGAGGAGTTCAGTTGC	54	2	210 - 214	0,167	0,269	0,111	0,587	0,222	0,361	JX863380
Gbra39	(GT) ₂₆	F: CAGCTGGATTCTGTGACGAC R: AATCATGAGGCTGGCAGGTG	48	6	261 - 284	0,214*	0,825	0,662	0,050	0,784	0,744 [#]	JX863381
Gbra47	(TG) ₇ GC(GCGT) ₄	F: CATGAACCTTTACAACCTCCTCAG R: CTGTCGTACGTTCTTGTATCTGG	48	3	230 - 238	0,700	0,615	0,312	0,239	0,521	-0,141	JX863382
Gbra55	(GA) ₁₃	F: TGGCTCAGGTGTTCCACTTC R: GTTTATGGCCAGTTCCATAG	48	4	158 - 164	0,533	0,487	0,252	0,322	0,428	-0,097	JX863383
Gbra62	(CA) ₃₁	F: CACTCGCATCATGCACAAC R: CACATCAGGCCTAACAACACC	54	8	213 - 271	0,667	0,641	0,400	0,178	0,588	-0,040	JX863384
Gbra63	(TATC) ₁₅	F: GCATCCCTGCCTGAGAATC R: AGGCCGCTAGTGCTTATGG	60	4	163 - 171	0,667	0,721	0,453	0,137	0,656	0,076	JX863385
Gbra70	(CGCA) ₈ (CA) ₁₃	F: AACATCCATATCCAGGAGGTC R: CAAGGGCACACAATGATAAGG	48	6	193 - 233	0,600	0,663	0,383	0,186	0,587	0,096	JX863386
Gbra80	(TG) ₈	F: CATGCAATATGTAGAGGTGCAG R: AGAGGAAGTGCTGTCTACTGGAG	54	3	167 - 179	0,167*	0,538	0,268	0,291	0,459	0,694 [#]	JX863387
Gbra96	(TG) ₂₆	F: GCGTGAATAGGCTGTGACGAG R: AGATTCTGCAAGTGGATCTGG	54	4	203 - 269	0,533	0,615	0,327	0,232	0,529	0,134	JX863388
Todos os locos				4,2		0,477	0,569	0,997	1,47x10 ⁻⁹	0,502	0,140	

* Desvios significativos no equilíbrio de Hardy-Weinberg ($P < 0,05$). [#] Valor significativo par o coeficiente de endogamia (F_{IS}).

Entre os 30 indivíduos de *Geophagus brasiliensis* analisados, foi obtido um total de 59 alelos diferentes. O número de alelos por loco variou de 2 a 8, com uma média de 4,2 alelos por loco. As heterozigosidades observada e esperada variaram de 0,167 a 0,667 e 0,259 a 0,825, respectivamente. Um alto valor para a probabilidade combinada de exclusão de paternidade (0,997) e um baixo valor para as probabilidades combinadas de identidade genética ($1,47 \times 10^{-9}$), foram obtidos, mostrando que o conjunto de locos descritos para *G. brasiliensis* exibem boa aplicabilidade em estudos de parentesco e diferenciação populacional nesta espécie.

O conteúdo de informação polimórfica (PIC) variou de 0,222 a 0,656. Valores de PIC acima de 0,5 indicam marcadores muito informativos, enquanto que de 0,25 a 0,5, razoavelmente informativos e abaixo de 0,25 pouco informativos (Botstein *et al.*, 1980). Dos 14 locos obtidos, sete demonstram serem muito informativos (Gbra21, Gbra39, Gbra47, Gbra62, Gbra63, Gbra70, Gbra96) com PIC igual ou superior a 0,521, seis foram razoavelmente informativos (Gbra06, Gbra16, Gbra17, Gbra25, Gbra55, Gbra80) apresentando valores PIC igual ou maiores que 0,309. Apenas um loco (Gbra34) não foi muito informativo, apresentando um valor de PIC igual a 0,222.

Após a aplicação da correção sequencial de Bonferroni, não foi observada a presença de desequilíbrio de ligação entre nenhum dos pares de locos analisados, contudo, três locos (Gbra06, Gbra39 e Gbra80) apresentaram desvios significativos no equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) ($P < 0,05$). Estes três locos demonstraram uma possível presença de alelos nulos, inferida a partir do excesso de genótipos homozigotos detectados, fato que poderia explicar os desvios do EHW observados para estes locos. Em contrapartida, o locus Gbra21 demonstrou um excesso de homozigotos e a possível presença de alelos nulos, mas não apresentou nenhum desvio do EHW. Os únicos locos que apresentaram valores significativos para o índice de endogamia (F_{IS}) foram Gbra06, Gbra39, Gbra80 e Gbra21.

A amplificação cruzada testada nas cinco espécies de Cichlidae apresentou os melhores resultados, em relação a locos polimórficos, para *Crenicichla jaguarensis*, *Gymnogeophagus rhabdotus* e *Apistogramma borelli*, que exibiram 10, 8 e 7 locos polimórficos, respectivamente (Tabela 2). *Laetacara dorsigera* apresentou altos níveis de polimorfismo em cinco locos amplificados e *Cichlassoma paranensis* apenas 1.

Tabela 2 - Amplificação cruzada dos 14 locos polimórficos em cinco espécies da família Cichlidae. Amplificação e o polimorfismo testado em cinco indivíduos de cada espécie.

Espécies	Primers													
	Gbra06	Gbra16	Gbra17	Gbra21	Gbra25	Gbra34	Gbra39	Gbra47	Gbra55	Gbra70	Gbra62	Gbra63	Gbra80	Gbra96
	Amplitude do tamanho dos alelos (pb)													
<i>C. jaguarensis</i>	180-194	188-190	156-158	157-161	139-141	—	—	227-230	147-149	—	204- 220	159-167	226-264	—
<i>C. paranensis</i>	175	—	154	—	141	—	—	230-238	142	—	—	159	180	210
<i>A. borellii</i>	182-188	182-198	124-145	—	139-141	—	—	230-234	142	142-144	203- 251	159	—	194
<i>L. dorsigera</i>	177	—	148	—	139-141	—	—	230-238	—	142-144	—	150-162	163	194-198
<i>G. rhabdotus</i>	182-188	200-204	152-154	—	131-141	—	—	230-238	—	140-144	—	159-171	226-137	176

—, não amplificação

A maioria dos Ciclídeos neotropicais se encontra na subfamília Cichlinae, especialmente nas tribos Geophagini, Cichlassomatini e Heroini (Smith *et al.* 2008). O nível de relação filogenética é determinante para o sucesso da transferabilidade de locos microssatélites (Barbara *et al.*, 2007). No presente trabalho, a maior proximidade filogenética entre os gêneros *Geophagus*, *Gymnogeophagus*, *Crenicichla* e *Apistogramma*, membros da tribo Geophagini, poderia explicar o resultado de um maior número de locos Gbra com sucesso na amplificação cruzada e maior nível de polimorfismo nas espécies dos três últimos gêneros. Diferentemente, o menor sucesso observado em relação à transferabilidade dos locos microssatélites de *G. brasiliensis* e o menor nível de polimorfismo encontrado nas duas espécies da tribo Cichlassomatini (*Cichlassoma paranensis* e *Laetacara dorsigera*), que são filogeneticamente mais distantes de *Geophagus*, pode ser atribuída a maior distância genética que estas espécies apresentam em relação a *Geophagus brasiliensis*.

Pouco se sabe sobre a estrutura e diversidade genética de pequenos peixes Neotropicais sedentários, uma vez que este conhecimento é restrito a poucos estudos e espécies (Sofia *et al.*, 2008; Zawadzki *et al.*, 2008; Philippsen *et al.*, 2009). Sem dúvida, a falta de descrições de locos microssatélites constitui um fator que dificulta o desenvolvimento de estudos mais informativos sobre estas espécies. Particularmente no caso de tais espécies de peixes, marcadores microssatélites foram recentemente descritas para apenas três espécies: *Pimelodella chagresi* (Moeser & Bermingham, 2005), *Hypostomus gymnorhynchus* (Telles *et al.*, 2010.) e *Eigenmannia sp.* (Moysés *et al.*, 2005) e já estão disponíveis na literatura. De acordo com alguns dos autores acima, a descrição destes locos podem fornecer importantes dados para os estudos genéticos das espécies envolvidas (Moeser & Bermingham, 2005; Moysés *et al.*, 2005).

Da mesma forma, os locos aqui apresentados poderão contribuir para o desenvolvimento de estudos populacionais envolvendo *Geophagus brasiliensis*, permitindo a caracterização genética da espécie nos diferentes ambientes onde ela ocorre e uma melhor compreensão da estrutura genética de espécies não migratórias e, conseqüentemente, contribuir para a sua conservação.

Agradecimentos

Somos gratos a CAPES pela concessão da bolsa de estudos a D.G. Ferreira, ao Dr. Oscar Akio Shibatta (Universidade Estadual de Londrina), por sua valiosa ajuda na identificação das espécies de peixes aqui analisado, a Dra. Lucia Giuliano Caetano e Dra. Larissa Bettin Pires (UEL) pela doação das amostras de *G. rhabdotus* e ao IBAMA/SISBIO e IAP pela permissão para as coletas de peixes.

Referências

- Abelha, M. C. F. & Goulart, E. (2004). Oportunismo trófico de *Geophagus brasiliensis* (Quoy & Gaimard, 1824) (Osteichthyes, Cichlidae) no reservatório de Capivari, Estado do Paraná, Brasil. *Acta Scientiarum* **26**, 37-45.
- Agostinho, A. A., Thomaz, S. M. & Gomes, L. C. (2005). Conservation of the biodiversity of Brazil's inland waters. *Conservation Biology* **19**, 646-652.
- Almeida, F. S., Pelegrinelli, M. H. & Sodr , L. M. K. (2001). RAPD and isoenzyme analysis of genetic variability in three allied species of catfish (Siluriformes: Pimelodidae) from the Tibagi River, Brazil. *Journal of Zoology* **253**, 113-120.
- Araújo, F. G. & Santos, L. N. (2001). Distribution of fish assemblages in Lajes reservoir, Rio de Janeiro, Brazil. *Brazilian Journal of Biology* **61**, 563-576.
- Barbará, T., Palma-Silva, C., Paggi, G. M., Bered, F., Fay, M. F. & Lexer, C. (2007). Cross-species transfer of nuclear microsatellite markers: potential and limitations. *Molecular Ecology* **16**, 3759-3767.
- Billotte, N., Lagoda, P. J, Risterucci, A. M. & Baurens. F. C. (1999). Microsatellite enriched libraries: applied methodology for the development of SSR markers in tropical crops. *Fruits* **54**, 277–288.

- Botstein, D., White, L. R., Skolnick, M. & Davis, R. W. (1980). Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *American Journal of Human Genetics* **32**, 314-331.
- Brito, R. M., Francisco, F. O., Domingues-Yamada, A. M. T., Gonçalves, P. H. P., Pioker, F. C., Soares, A. E. E. & Arias, M. C. (2009). Characterization of microsatellite loci of *Tetragonisca angustula* (Hymenoptera, Apidae, Meliponini). *Conservation Genetics Resources* **1**, 183–187.
- Carvalho, G. R. (1993). Evolutionary aspects of fish distribution: genetic variability and adaptation. *Journal of Fish Biology* **43**, 53-73.
- Galetti Jr, P. M., Rodrigues, F. P., Solé-Cava, A., Miyaki, C. Y., Carvalho, D.; Eizirik, E., Veasey, E. A., Santos, F. R., Farias, I. P., Vianna, J. A., Oliveira, L. R., Weber, L. I., Almeida-Toledo, L. F., Francisco, M. R., Redondo, R. A. F., Siciliano, S., Del Lama, S. N.; Freitas, T. R. O.; Hrbek, T. & Molina, W. F. (2008). Genética da conservação brasileira. In *Fundamentos de Genética da Conservação* (Frankham, R., Ballou, J. D. & Briscoe, D. A., eds.), pp. 244-274, Ribeirão Preto, SP: Editora SBG.
- Hall, T. A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* **41**, 95-98.
- Kullander, S. O. (2003). Family Cichlidae (Cichlids). In *Check List of the Freshwater Fishes of South and Central America* (Reis, R. E., Kullander, S. O. & Ferraris Jr, C. J., eds.). pp. 605–654. Porto Alegre, RS: EDIPUCRS.
- Lowe-McConnell, R. H. (1991). Ecology of cichlids in South American and African waters, excluding the African Great Lakes. In *Cichlid Fishes Behavior, Ecology,*

and Evolution (Keenleyside, M. H. A., ed), pp. 60–85. London, GL: Chapman and Hall.

Marshall, T. C., Slate, J., Kruuk, L. E . B. & Pemberton, J. M. (1998). Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations. *Molecular Ecology* **7**, 639-655.

Mazzoni, R. & Iglesias-Rios, R. (2002). Environmentally related life history variations in *Geophagus brasiliensis*. *Journal of Fish Biology* **61**, 1606–1618.

Menezes, N., Weitzman, S. H., Oyakawa, O., Lima, F. C. T., Castro, R. M. C. & Weitzman, M. J. (eds.) (2007). *Peixes de água doce da bacia da Mata Atlântica. Lista Preliminar de Espécies e Comentários Sobre Conservação de Peixes de Água Doce Neotropicais*. São Paulo, SP: Museu de Zoologia, Universidade de São Paulo.

Moeser, A. A. & Bermingham, E. (2005). Isolation and characterization of eight microsatellite loci for the Neotropical freshwater catfish *Pimelodella chagresi* (Teleostei: Pimelodidae). *Molecular Ecology Notes* **5**, 363–365.

Moysés, C. B., Mockford, S., Almeida-Toledo, L. F. & Wright, J. M. (2005). Nine polymorphic microsatellite loci in the Neotropical electric eel *Eigenmannia* (Teleostei, Gymnotiformes). *Molecular Ecology Notes* **5**, 7-9.

Peakall, R. & Smouse, P. E. (2006). GENEALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes* **6**, 288-295.

Philippsen, J. S., Renesto, E., Gealh, A. M., Artoni, R. F., Shibatta, O. A. & Zawadzki, C. H. (2009). Genetic variability in four samples of *Neoplecostomus yapo* (Teleostei: Loricariidae) from the rio Paranapanema basin, Brazil. *Neotropical Ichthyology* **7**, 25-30.

- Piorski, N. M., Sanches, A., Carvalho-Costa, L. F., Hatanaka, T., Carrillo-Avila, M., Freitas, P. D. & Galetti Jr, P. M. (2008). Contribution of conservation genetics in assessing neotropical freshwater fish biodiversity. *Brazilian Journal of Biology*, **68**, 1039-1050.
- Raymond, M. & Rousset, F. (1995). GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. *Journal of Heredity* **86**, 248-249.
- Reis, R. E., Kullander, S. O. & Ferraris-Jr., C. J. (eds.) (2003). *Check List of the Freshwater Fishes of South and Central America*. Porto Alegre, RS: EDIPUCRS.
- Rice, W. R. (1989). Analyzing tables of statistical tests. *Evolution* **43**, 223-225.
- Rousset, F. (2008). GENEPOP'007: a complete re-implementation the GENEPOP software for Windows and Linux. *Molecular Ecology Resources* **8**, 103-106.
- Rozen, S. & Skaletsky, H. J. (2000). Primer 3 on the www for general users and for biologist programmers. In *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology* (Krawetz, S. & Misener, S., eds.), pp. 365-386. Totowa, NJ: Humana Press.
- Santos, G.O. & Fontoura, N. F. (2000). Dinâmica reprodutiva de *Geophagus brasiliensis* (Quoy & Gaimard, 1824), no açude Águas Belas, Viamão, Rio Grande do Sul. (Teleostei — Cichlidae). *Pesquisa Agropecuária Gaúcha* **6**, 131-144.
- Schuelke, M. (2000). An economic method for the fluorescent labelling of PCR fragments. *Nature Biotechnologies* **18**, 223-234.
- Silva, J. V. & Hilsdorf, A. W. S. (2011). Isolation and characterization of polymorphic microsatellite loci from *Salminus hilarii* (Characiformes: Characidae). *Conservation Genetics and Molecular Research* **3**, 437-439.

- Shibatta, O. A. & Silva-Souza, A. T. (2008). Fish, Ribeirão do Feijão basin, São Carlos, São Paulo, Brazil. *Check List* **4**, 75–78.
- Smith, W., Chakrabarty, P. & Sparks, J. S. (2008). Phylogeny, taxonomy, and evolution of Neotropical cichlids (Teleostei: Cichlidae: Cichlinae). *Cladistics* **24**, 625–641.
- Sofia, S. H., Galindo, B. A., Paula, F. M., Sodr , L. M. K. & Martinez, C B. R. (2008). Genetic diversity of *Hypostomus ancistroides* (Teleostei, Loricariidae) from an urban stream. *Genetics and Molecular Biology* **31**, 317-323.
- Sunnucks, P. (2000). Efficient genetic markers for population biology. *Trends in Ecology and Evolution* **15**, 199-203.
- Teixeira, T. P., Pinto, B. C. T., Terra, B. F., Estiliano, E. O., Gracia, D. & Araújo. F. G. (2005). Diversidade das assembl as de peixes nas quatro unidades geográficas do rio Paraíba do Sul. *Iheringia, Série Zoologia* **95**, 347-357.
- Telles, M. P. C., Resende, L. V., Brondani, R. P. V., Collevatti, R. G., Costa, M. C. & Silva Júnior, N. J. (2010). Isolation and characterization of microsatellite markers in the armored catfish *Hypostomus gymnorhynchus* (Loricariidae). *Genetics and Molecular Research* **9**, 1770-1774.
- Vallone, M. V. & Butler J. M. (2004). AutoDimer: a screening tool for primer-dimer and hairpin structures. *BioTechniques* **37**, 226-231.
- Van Oosterhout, C., Hutchinson, W. F., Wills, D. P. M. & Shipley, P. F. (2004). MicroChecker: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes* **4**, 535-538.
- Weir, B. S. (ed.) (1996). *Genetic Data Analysis II*. Sunderland, MA: Sinauer Associates, Inc.

- Zane, L., Bargelloni, L. & Patarnello, T. (2002). Strategies for microsatellite isolation: A review. *Molecular Ecology* **11**, 1-16.
- Wimberger, P. H. (1991). Plasticity of jaw and skull morphology in the Neotropical Cichlids *Geophagus brasiliensis* and *G. steindachneri*. *Evolution* **45**, 1545-1563.
- Wimberger, P. H. (1992). Plasticity of fish body shape. The effects of diet, development, family and age in two species of *Geophagus* (Pisces: Cichlidae). *Biological Journal of the Linnean Society* **45**, 197-218.
- Winemiller, K. O. (1989). Patterns of variation in life history among South American fishes in seasonal environments. *Oecologia* **81**, 225-241.
- Zawadzki, C. H., Renesto, E., Peres, M. D. & Paiva, S. (2008). Allozyme variation among three populations of the armored catfish *Hypostomus regani* (Ihering, 1905) (Siluriformes, Loricariidae) from the Paraná and Paraguay river basins, Brazil. *Genetics and Molecular Biology* **31**, 767-771.

Referências Eletrônicas

- Castro, R. M. C., Casatti, L., Santos, H. F., Ferreira, K. M., Ribeiro, A. C., Benine, R. C., Dardis, G. Z. P., Melo, A. L. A., Abreu, T. X., Bockmann, F. A., Carvalho, M., Gibran, F. Z. & Lima, F. C. T. (2003). Estrutura e composição da ictiofauna de riachos do Rio Paranapanema, sudeste e sul do Brasil. *Biota Neotropica* **3 (1)**, <http://www.biotaneotropica.org.br/v3n1/pt/abstract?article+BN01703012003>.
- Castro, R. M. C., Casatti, L., Santos, H. F., Melo, A. L. A., Martins, L. S. F., Ferreira, K. M., Gibran, F. Z., Benine, R. C., Carvalho, M., Ribeiro, A. C., Abreu, T. X., Bockmann, F. A., Dardis, G. Z. P., Stopiglia, R. & Langeani, F. (2004). Estrutura e composição da ictiofauna de riachos da bacia do Rio Grande, no Estado de

São Paulo, Sudeste do Brasil. *Biota Neotropica* **4** (1),

<http://www.biotaneotropica.org.br/v4n1/pt/abstract?article+BN0170402004>.

Wagner, H. W. & Sefc, K. M. (1999). *IDENTITY 1.0*. Centre for Applied Genetics,

University of Agricultural Sciences, Vienna. Available at

<http://www.boku.ac.at/zag/forsch/identity.htm>.

4.2 TRABALHO 2

Abordagem genética de populações de *Geophagus brasiliensis* (Perciformes, Cichlidae): uma espécie de peixe Neotropical sedentária¹

¹Este trabalho será submetido à revista *Freshwater Biology*

Abordagem genética de populações de *Geophagus brasiliensis* (Perciformes, Cichlidae): uma espécie de peixe Neotropical sedentária

FERREIRA, D. G¹, GALINDO, B. A^{2,1}, ALMEIDA, F. S¹ e SOFIA, S. H^{1*}.

RESUMO

1. O conhecimento da organização genética em populações de espécies da ictiofauna neotropical encontra-se, em sua grande maioria, limitado a espécies de grande porte e/ou migradoras. *Geophagus brasiliensis* (Quoy & Gaimard, 1824), espécie popularmente conhecida como cará ou acará, é um peixe neotropical da família Cichlidae que apresenta as características de sedentarismo e cuidado parental, de modo que fornece um bom modelo para o estudo genético populacional de espécies não migradoras.
2. Neste estudo foram empregados marcadores microsatélites, AFLP e DNAmT (D-loop) na análise genética de populações de *G. brasiliensis* coletadas ao longo de um rio neotropical (rio Laranjinha) e um ribeirão tributário (ribeirão do Penacho).
3. Os resultados demonstram baixos níveis de diversidade genética para a espécie em relação a outros peixes da ictiofauna neotropical. Os níveis de mais altos de diversidade genética foram encontrados na amostra do ribeirão (AFLP - $\bar{P} = 24,62\%$, SSR - $H_E = 0,706$ e D-loop - $h = 0,653$), sugerindo um importante papel destes pequenos tributários como reserva de diversidade genética nas bacias hidrográficas.
4. Um padrão comum de estruturação genética foi observado a partir dos três marcadores moleculares utilizados, revelando a formação de três grupos entre as amostras estudadas, com valores de diferenciação que variaram de 0,019 (D_{EST} - SSR) a 0,610 (Φ_{ST} - D-loop).
5. Mesmo sendo uma espécie sedentária, o fluxo gênico é possivelmente mantido através do modelo de dispersão *Stepping-Stone*. No entanto, foi observado que tanto barreiras físicas naturais ou artificiais (barramentos ou a disposição geográfica dos trechos na bacia hidrográfica) como eventos demográficos podem alterar este padrão de dispersão entre as populações.
6. De modo geral, os resultados indicaram que mesmo em distâncias curtas, a diversidade genética da espécie se encontra distribuída de maneira heterogênea ao longo da bacia, o que deve ser considerado em futuras ações de manejo e conservação.

Palavras-chave: Diversidade genética. Peixe sedentário. SSR. D-loop. AFLP.

¹ Laboratório de Genética e Ecologia Animal (LAGEA), Departamento de Biologia Geral, Universidade Estadual de Londrina, Rod. Celso Garcia Cid, km 380, Londrina, PR, 86051-980, Brasil

² Laboratório de Genética e Conservação (GECON), Universidade Estadual do Norte Paraná, Rua Portugal, 340, Cornélio Procópio, PR, 86300-000, Brasil

* Autor para correspondência: Telefone: +55 43 33714417; email: shsofia@uel.br

INTRODUÇÃO

Os ecossistemas de água doce representam áreas prioritárias para a conservação de biodiversidade no planeta. Mesmo ocupando menos de 1% da superfície terrestre, estes ambientes abrigam quase 10 % de toda a diversidade de espécies descritas para a fauna mundial (Dudgeon *et al.*, 2006; Strayer & Dudgeon, 2010). Dentre os diferentes táxons que contribuem para esta porcentagem, os peixes se destacam como um dos grupos mais diversos. Esta rica ictiofauna apresenta quase 13.000 espécies, correspondendo a praticamente 70 % do total de vertebrados descritos para os ambientes de água doce e a, aproximadamente, metade das espécies de peixes conhecidas (considerando ambientes marinhos e de água doce) (Nelson, 2006; Balian *et al.*, 2008; Lévêque *et al.*, 2008).

Apesar de serem muito diversos, os ecossistemas de doce estão entre os ambientes naturais mais ameaçados da atualidade (Dudgeon *et al.*, 2006; Strayer & Dudgeon, 2010). Em diferentes regiões do planeta, tanto peixes como outros organismos que habitam estes ambientes apresentam constantes perdas de diversidade. Este declínio resulta principalmente dos impactos causados por diferentes formas de interferência antrópica, dentre as quais destaca-se a super-exploração, a poluição ambiental, a degradação de habitats, as alterações no fluxo dos rios (principalmente por barramentos), a fragmentação de habitats e a introdução de espécies exóticas (Allan & Flecker, 1993; Agostinho *et al.*, 2005; Dudgeon *et al.*, 2006; Carpenter *et al.*, 2011).

Em termos de diversidade de peixes de água doce, a região Neotropical possui a mais diversa do planeta, apresentando 4035 espécies descritas e uma estimativa de aproximadamente 6000 existentes (Reis *et al.*, 2003; Lévêque *et al.*, 2008). Compreendendo uma fauna taxonomicamente distinta, esta rica diversidade de espécies distribui-se ao longo das bacias hidrográficas das Américas Central e do Sul, desde os rios do sul do México até o estuário do rio da Prata, no norte da Argentina (Albert & Reis, 2011). Na América do Sul, aproximadamente metade desta ictiofauna é representada por peixes de pequeno porte (Castro *et al.*, 2003), ou seja, espécies que não ultrapassam 200 mm de comprimento (Vazzoler, 1999).

Quantificar a diversidade de espécies é uma boa medida da biodiversidade, porém, segundo Geist (2011) as medidas de biodiversidade também

devem ser inferidas utilizando-se outros parâmetros, como a diversidade genética. A diversidade genética, ou, diversidade de alelos presentes nos vários locos de uma espécie, constitui um componente fundamental da biodiversidade, pois determina o potencial adaptativo/evolutivo das espécies, possibilitando que elas se possam adaptar às mudanças ambientais (Ferguson *et al.*, 1995; Frankham *et al.*, 2010). Desse modo, o conhecimento da diversidade genética de uma espécie, e de como ela encontra-se distribuída dentro e entre as populações, é essencial para compreensão de aspectos evolutivos, bem como para a elaboração de futuras ações de manejo e conservação (Carvalho, 1993; Hurt & Hedrick, 2004; Frankham *et al.*, 2010).

O conhecimento genético de populações naturais de diferentes organismos vem sendo obtido com sucesso por meio do uso de marcadores moleculares, principalmente aqueles que possuem como base a amplificação de DNA via PCR (*Polymerase Chain Reaction*), como RAPDs, AFLPs, microssatélites e sequenciamento de regiões do DNA (Awise, 2004; Freeland, 2005).

Estas ferramentas têm proporcionado importantes contribuições para o conhecimento da estrutura e diversidade genética de peixes de água doce da região Neotropical (PIORSKI *et al.*, 2008), embora a maior parte deste conhecimento esteja reservada principalmente a espécies de grande porte e/ou migradoras (Hatanaka *et al.*, 2006; Lopes *et al.*, 2007; Carvalho-Costa *et al.*, 2008; Abreu *et al.*, 2009; Calcagnotto & Desalle, 2009; Matsumoto & Hilsdorf, 2009; Pereira *et al.*, 2009). De fato, considerando somente espécies de peixes neotropicais que apresentam pequeno porte e hábito sedentário, existem poucas informações sobre a genética de populações disponíveis na literatura, sendo bem mais limitadas e reduzidas a poucos estudos (Sofia *et al.*, 2008; Philippsen *et al.*, 2009).

Dentro da categoria de espécie sedentária e de pequeno porte está *Geophagus brasiliensis* (Quoy & Gaimard, 1824), uma espécie popularmente conhecida como cará, acará, papa-terra, entre outros nomes. Apresenta ampla distribuição na América do Sul (Kullander, 2003), onde geralmente habita o fundo de ambientes marginais de rios, lagos, reservatórios e córregos (Lowe-McConnell, 1991), sendo encontrada tanto em locais preservados como em perturbados (Teixeira *et al.*, 2005). No Brasil, representa um componente habitual das comunidades de peixes em diferentes bacias hidrográficas (Araújo & Santos, 2001; Castro *et al.*, 2003, 2004; Shibatta & Silva-Souza, 2008). Como outros membros da

família Cichlidae encontrados na América do Sul, *G. brasiliensis* apresenta hábito sedentário (Winemiller, 1989) e cuidado parental (Wimberger, 1991, 1992; Kullander, 2003; Menezes et al., 2007). Durante sua fase reprodutiva são formados casais que constroem ninhos e depositam os ovos fecundados sobre substrato (Kullander, 2003). Seu hábito alimentar é descrito como detritívoro-iliófago (filtrando a parte comestível do substrato) (Menezes, 2007) ou onívoro (insetos, algas, moluscos, plantas e sedimentos) (Abelha & Goulart, 2004).

Considerando o conjunto de características biológicas apresentadas por *G. brasiliensis*, esta espécie pode representar um bom modelo para o estudo da estrutura e diversidade genética de espécies de pequeno porte e sedentárias da ictiofauna Neotropical.

Dentre os marcadores moleculares atualmente disponíveis para estudos populacionais, merecem destaque os microssatélites, também conhecidos como SSR (*Simple Sequence Repeats*) e os marcadores AFLPs (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) (Avisé, 2004; Freeland, 2005; Frankham et al., 2010). Embora ambos sejam marcadores nucleares, bastante polimórficos e de boa reprodutibilidade, existem diferenças marcantes entre estes (Zane et al., 2002; Liu, 2005). Enquanto, os microssatélites possuem um padrão de herança codominante (Sunnucks, 2000), os marcadores AFLP são de natureza dominante (Liu, 2007).

Os microssatélites constituem as ferramentas mais utilizadas no estudo genético de populações de peixes de água doce da região Neotropical (Piorski et al., 2008), apresentando contribuições importantes em análises de diversas espécies (Hatanaka et al., 2006; Hrbek et al., 2007; Carvalho-Costa et al., 2008; Abreu et al., 2009; Calcagnotto & Desalle, 2009; Matsumoto & Hilsdorf, 2009; Pereira et al., 2009). No caso dos AFLPs, embora ainda pouco utilizados em estudos genéticos de peixes neotropicais, também demonstram uma ótima aplicabilidade em estudos genéticos destes organismos, se destacando tanto em análises populacionais (Chong et al., 2000; Wang et al., 2000; David et al., 2001; Liu et al., 2003; Mickett et al., 2003; Liu et al., 2005;) como em estudos filogenéticos (Campbell & Bernatchez, 2004; Sullivan et al., 2004; Barluenga et al., 2006; Barreto & McCartney, 2007).

A análise do DNA mitocondrial (DNAMt) também é de grande relevância no estudo genético de populações, uma vez que pelas características inerentes a este genoma, incluindo o padrão haplóide, herança uniparental

(materna) e ausência de recombinação genética (Awise, 2004), pode fornecer informações adicionais às encontradas a partir da análise do genoma nuclear. Em estudos com peixes, a região conhecida como *D-loop* ou controle, a qual é quatro a cinco vezes mais variável que outras regiões do DNAm de vertebrados (Horai & Hayasaka, 1990), tem sido amplamente utilizada em diferentes abordagens genéticas envolvendo diversas espécies de peixes neotropicais (Sivasundar *et al.*, 2001; Montoya - Burgos *et al.*, 2003; Martins *et al.*, 2003; Matoso *et al.*, 2010; Garcez *et al.*, 2011; Terencio *et al.*, 2012).

Com base no exposto, o presente trabalho empregou marcadores microssatélites, AFLPs e sequenciamento da região controle do DNA mitocondrial (*D-loop*) no estudo da estrutura e diversidade genética de populações de *G. brasiliensis*, coletadas ao longo da bacia de um rio Neotropical onde a espécie constitui um importante componente da comunidade de peixes (Galindo, B.A, comunicação pessoal). Assim, buscaram-se informações que possam ser relevantes na compreensão da organização da diversidade genética desta espécie e no conhecimento genético-populacional de espécies de água doce de pequeno porte e sedentárias.

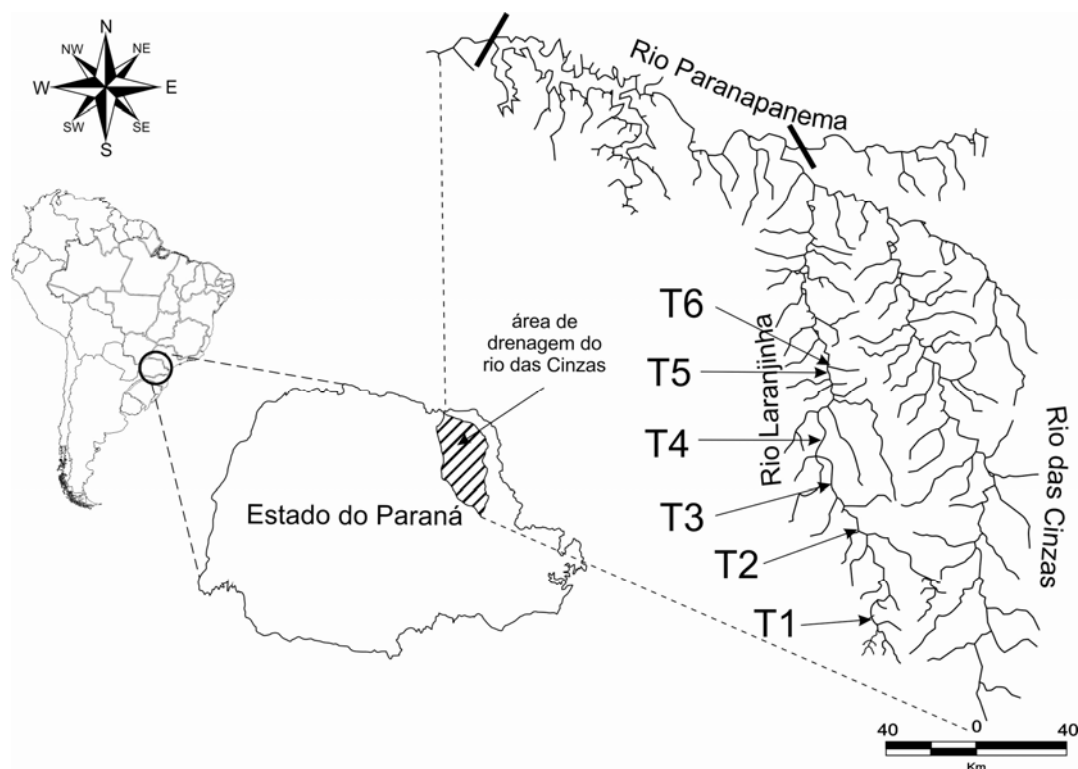
MATERIAIS E MÉTODOS

Trechos de amostragem

As amostragens foram realizadas em cinco trechos do rio Laranjinha, distribuídos sequencialmente da nascente até região médio-baixa, indicados como T1 (24°13'24,61"S, 50°11'56,45"O), T2 (24°1'29,76"S, 50°11'20,73"O), T3 (23°51'36,65"S, 50°22'45,18"O), T4 (23°43'35,81"S, 50°26'25,36"O) e T5 (23°24'52,75"S, 50°27'12,69"O), e em um trecho no ribeirão do Penacho, tributário da margem direita deste rio, indicado como T6 (23°23'20,02"S, 50°26'40,34"O) (Figura 1). O rio Laranjinha é o maior tributário da margem esquerda da bacia do rio das Cinzas. Nasce no município de Ventania, norte do estado do Paraná (sul do Brasil), recebe 90 afluentes ao longo de seu percurso e deságua entre dois outros municípios paranaenses (Bandeirantes e Santa Mariana), localizados no norte deste estado brasileiro. Juntas, as bacias do rio das Cinzas e Laranjinha drenam uma área de 9766 km² e representam recursos hídricos de

grande importância histórica e ambiental para a região norte do estado do Paraná (Maack, 2002).

Figura 1 - Mapa apresentando a bacia hidrografia do rio Laranjinha e os trechos onde foram coletadas as amostras de *Geophagus brasiliensis*.



Considerando a extensão de aproximadamente 350 km do rio Laranjinha (considerando a sinuosidade), os trechos foram escolhidos com uma distância média de 50 km entre si, com exceção de T6 que fica 5,6 km a jusante de T5 (Figura 1). Também é importante destacar que entre o trecho de amostragem T5 e T4 existe um barramento de uma PCH (Pequena Central Hidrelétrica) construída a mais de 50 anos.

Em cada trecho, foram realizadas sete coletas sazonais no período de outubro de 2010 a julho de 2012. As amostragens foram realizadas em um período de 24 horas, empregando redes de espera, tarrafas e peneiras. Amostras de musculatura e nadadeira raiada foram retidas, armazenadas em microtubos com álcool 70% e mantidas a -20°C . Um total de 161 amostras foi utilizado na análise, sendo 30 de cada trecho, com exceção de T1, onde mesmo com vários esforços de coleta, apenas 11 amostras foram obtidas. A confirmação taxonômica dos

exemplares foi realizada pelo Dr. Oscar Akio Shibatta (UEL) e alguns exemplares depositados na coleção ictiológica do Museu de Zoologia da Universidade Estadual de Londrina (MZUEL), número de tombo MZUEL 6451.

Extração e quantificação do DNA

O DNA genômico foi obtido a partir da musculatura empregando o protocolo baseado em fenol/clorofórmio proposto por Almeida *et al.* (2001). A concentração do DNA foi determinada a partir fluorímetro DyNA Quant 200 (Hoefer) usando o tampão Hoechst 33258 dye. A diluição das amostras foi realizada em água ultrapura e variou de acordo com a necessidade de cada marcador molecular utilizado (ou seja, 100 ng/ μ L, 10 ng/ μ L e 5 ng/ μ L, respectivamente, nas análises de marcadores AFLP; microssatélites e DNAm - *D-loop*).

Marcadores AFLP

As reações de AFLP foram realizadas seguindo o protocolo descrito por Vos *et al.* (1995), com pequenas modificações. O DNA das amostras (cerca de 700 ng) foi digerido com as endonucleases *EcoRI/MseI* (5 e 50 U, respectivamente), gerando fragmentos que foram ligados a adaptadores específicos para o corte destas enzimas. Após uma incubação de 16 horas a 37 °C, as reações de digestão-ligação foram diluídas (1:5) em água ultrapura e utilizadas nas reações de pré-amplificação. As reações de pré-amplificação foram realizadas com um par de *primers* que apresentam sequência complementar aos adaptadores e um nucleotídeo seletivo adicional em 3'. Posteriormente, os produtos destas reações foram diluídos (1:5) e utilizados nas amplificações seletivas, realizadas a partir de *primers* com dois nucleotídios seletivos adicionais em 3'.

Oito combinações de *primers* seletivos *MseI/EcoRI* foram escolhidas para a análise, são elas: CTA/AGG, CTA/ACG, CTA/AGC, CTA/ATC, CTT/AAG, CTT/ACT, CTT/AGC e CTG/ATC. Os produtos da amplificação seletiva foram separados por eletroforese em gel de poliacrilamida 7% (29:1 acrilamida:bisacrilamida) por três horas a 200 V e corados com nitrato de prata a 20%. O peso molecular dos fragmentos gerados foi estimado a partir do marcador de peso molecular 50 pb. Nesta análise foram utilizados apenas os fragmentos que

se encontravam dentro da amplitude de 100 a 500 pb. Estes foram então analisados quanto à presença ou ausência de bandas e transferidos para as matrizes de entrada dos programas de análise genéticas.

Marcadores Microssatélites

Dos 14 pares de *primers* previamente descritos para a amplificação de locos microssatélites em *G. brasiliensis* (dados não publicados), nove (Gbra16, Gbra17, Gbra21, Gbra25, Gbra47, Gbra55, Gbra62, Gbra63 e Gbra96) foram selecionados para esta análise. Para posterior leitura em sequenciador automático, o *primer Forward* de cada loco foi confeccionado com uma sequência adicional M13 (5'-TGTAACGACGGCCAGT-3') na extremidade 5', possibilitando a marcação com fluorescências na PCR (Schuelke, 2000).

As reações de PCR foram realizadas em um volume final de 5 µL contendo 1X *GoTaq Master Mix Color Less* (Promega), 10 ng da amostra de DNA, 1% de glicerol, 0,125 µM de *primer* M13 marcado com fluorescência (FAM, HEX ou NED, Applied Biosystems, CA), 0,125 µM de *primer Reverse*, 0,0125 µM de *primer Forward*. As amplificações foram conduzidas com um passo de desnaturação inicial de 94 °C por 4 min, seguido por 35 ciclos de 94 °C por 40 s, 48 °C (Gbra25, Gbra47, Gbra55), 54 °C (Gbra17, Gbra21, Gbra62, Gbra96) ou 60 °C (Gbra16, Gbra63) por 1 min e 72 °C por 1 min, com uma extensão final de 72 °C por 30 min.

Os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese em sequenciador automático ABI-PRISM 3500 xL (Applied Biosystems), usando o GeneScan 600 Liz (Applied Biosystems) como marcador de peso molecular. A leitura dos genótipos foi realizada utilizando o programa GeneMarker 1.85 (SoftGenetics, State College, PA) a partir da checagem manual.

Marcador DNAm (D-loop)

Parte da região controle do DNA mitocondrial foi amplificada para as amostras de *G. brasiliensis* a partir dos *primers* L 5'-AGAGCGTCGGTCTTGTAACC-3' (Cronin *et al.*, 1993) e H 5'-CCTGAAGTAGGAACCAGATG-3' (Meyer *et al.*, 1990). A reação de PCR foi realizada em um volume final de 25 µL contendo 1X *GoTaq Master Mix Color Less*

(Promega), 1 μ M de cada *primer*, 15 ng de DNA e água ultrapura para completar o volume. A amplificação foi conduzida com um ciclo inicial de 94°C por 4 min, seguido de 41 ciclos de 94°C por 15 s, 56°C por 30 e 72°C por 2 min, e uma extensão final de 72°C por 10 min.

Após a amplificação, os produtos de PCR foram purificados através da enzima EXOSap IT® (Prodinol) e utilizados nas reações de sequenciamento. Estas reações foram realizadas independentemente para ambas as fitas (H e L) com o kit *Big Dye Terminator* (Applied Biosystems), seguindo as recomendações do fabricante, com posterior leitura em sequenciador automático ABI-PRISM 3500 XL (Applied Biosystems).

A análise de qualidade das sequências e geração dos *contigs* foram realizadas a partir do aplicativo da *on-line Electropherogram Quality Analysis* (Togawa & Brigido, 2003) acessado em: <http://asparagin.cenargen.embrapa.br/phph/>. A avaliação dos *contings* foi efetuada manualmente por meio do programa DNA Baser v 3.5.5.216 (Heracle BioSoft SRL). Posteriormente, as sequências foram alinhadas pelo aplicativo Clustal W (Thompson, 1994) no programa BioEdit 7.1.3.0 (Hall, 1999).

Para a confirmação da origem do fragmento, as sequências foram submetidas a uma busca no BLAST - *Basic Local Alignment Search Tool* (Altschul *et al.*, 1990) na página do NCBI – *National Center for Biotechnology Information*, acessada em: [Blast.cgi](http://blast.cgi). O programa tRNAscan-SE (Lowe & Eddy, 1997) foi utilizado *on-line* no sítio: <http://lowelab.ucsc.edu/tRNAscan-SE/> para buscar possíveis tRNA. As sequências dos diferentes haplótipos encontrados foram depositadas no GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>).

Análises genéticas

a) *Diversidade genética*

Na análise com marcadores AFLPs foram empregados os programas: i) dBoot v. 1. 1. (Coelho, 2001) para avaliar o coeficiente de variação (CV%) do número de marcadores AFLPs amplificados, parâmetro que determina a confiabilidade dos resultados estatísticos; e, ii) POPGEN v. 1.31 (Yeh *et al.*, 2000), para calcular a proporção de locos polimórficos (\bar{P}), diversidade genética de Nei (1978) e (I) Índice de Shannon.

Na análise com marcadores microssatélites foram empregados os programas: i) POPGEN v. 1.31 (Yeh *et al.*, 2000), para calcular a quantidade de alelos, proporção de locos polimórficos (\bar{P}), número de alelos efetivos (N_E) número de alelos privados (N_p) diversidade genética de Nei (1978), heteroziguidade observada (H_O) e heteroziguidade esperada (H_E); ii) Fstat v2.9.3 (Goudet, 2001), para calcular as frequências alélicas e genotípicas, riqueza alélica e o F_{IS} (índice de endogamia) por loco e por população; iii) GENEPOP v.1.2 (Raymond & Rousset, 1995), para testar o Equilíbrio de Hardy-Weinberg e o desequilíbrio de ligação entre os pares de locos, com a significância (valor de P) posteriormente ajustada através da correção sequencial de Bonferroni (Rice, 1989); e, iv) MICRO-CHECKER 2.2.1 (Van Oosterhout *et al.*, 2004), para testar a eventual presença de alelos nulos ou outros erros de genotipagem, como alelos *dropout* e erros de leitura em virtude de picos *stutter*.

Ainda para os dados de microssatélite, foi empregado o programa BOTTLENECK 1.2.02 (Cornuet & Luikart, 1996), para verificar evidências de possíveis reduções recentes no tamanho populacional das amostras, utilizando a análise do excesso ou deficiência de heteroziguidade a partir dos modelos evolutivos para locos de microssatélites *Infinite alleles Model* (IAM), *Two-Phase Model* (TPM – com 90% SMM e 10% IAM) e *Stepwise Mutation Model* (SMM). O teste de Wilcoxon foi escolhido para avaliar o nível de significância do excesso ou deficiência de heterozigotos apresentado para cada modelo, considerando $P < 0,05$.

Na análise com DNAMt foram empregados os programas: i) DnaSP v.5 (Librado & Rozas, 2009), para o calcular o número de haplótipos, diversidade haplotípica (h) e diversidade nucleotídica (π); e, ii) ARLEQUIN 3.5.1.3 (Excoffier *et al.*, 2005), para a determinação dos haplótipos, estimativas de frequências haplotípicas e teste de neutralidade seletiva, empregando o modelo de sítios infinitos de Tajima (D) (Tajima, 1989) e Fu (Fs) (Fu, 1997), testes que também fornecem bons indicativos da ocorrência de eventos demográficos, como *bottlenecks* e expansões populacionais (Garcez *et al.*, 2011).

b) Estrutura genética

O programa ARLEQUIN 3.11 (Excoffier *et al.*, 2005) foi empregado na análise da AMOVA (Análise da Variância Molecular), usado para estimar a partição da variação genética dentro e entre as amostras (aqui também chamadas

de 'populações') para os três marcadores aplicados. A partir da AMOVA também foi calculada a diferenciação genética entre as amostras (Excoffier *et al.*, 1992), utilizando o índice Φ_{ST} (análogo de F_{ST}) (Weir & Cockerham, 1984), nas comparações par a par dos dados de AFLP e DNAm. As estimativas de significância foram conduzidas com base em 10.000 permutações.

Na análise com microssatélites foi utilizado o programa Fstat 2.9.3.2 (Goudet, 2002), para calcular o índice F_{ST} (Weir & Cockerham, 1984), assumindo o modelo de alelos infinitos (IAM) e o programa ARLEQUIN 3.11 (Excoffier *et al.*, 2005), para calcular o índice R_{ST} (Slatkin, 1995), que considera o modelo passo a passo (SMM). Em ambos os casos a significância foi testada a partir de 10.000 permutações. Considerando os questionamentos sobre a eficiência do F_{ST} (e seus análogos) em identificar diferenciação populacional (Jost, 2008; Jost, 2009; Meirmans & Hedrick, 2011), em dados de microssatélites, também foi aplicada a recentemente desenvolvida estimativa de diferenciação D_{EST} (Jost, 2008), utilizando o programa SMOGD 1.2.5 (Crawford, 2010). Para AFLP e microssatélites, o programa POPGEN v. 1.31 (Yeh *et al.*, 2000) foi utilizado para calcular a distância e identidade genética de Nei (1978).

A fim de avaliar a relação entre as amostras a partir de agrupamentos Bayesianos, o programa STRUCTURE v.2.3.3 (Pritchard *et al.*, 2000) foi utilizado nos dados de AFLP e microssatélites. Em ambos os casos foi empregado o modelo *admixture*, modelo que assume que os indivíduos podem ter ancestralidade mista, com contribuições genóticas de diferentes populações (Pritchard *et al.*, 2000). As estimativas de K (número de populações) foram realizadas em simulações variando de um a nove ($K = 1 - 9$), reproduzindo 20 corridas para cada valor de K, segundo a metodologia de Evanno *et al.* (2005), com 10.000 interações no "burn-in" e 100.000 interações na Cadeia de Markov Monte Carlo (MCMC). O STRUCTURE HARVESTER 0.6.7 (Earl, 2011) foi utilizado para ordenar os resultados e inferir estatisticamente qual o K mais provável da análise usando a estatística ΔK (Evanno *et al.*, 2005).

Uma análise bayesiana de fluxo gênico também foi aplicada para os dados de microssatélites utilizando programa BAYESASS 1.3 (Wilson & Rannala, 2003), inferindo taxas de migrações recentes e a direção da migração entre os trechos de amostragem.

A correlação entre diferenciação genética e a distância geográfica foi avaliada à partir de um teste de Mantel (Mantel, 1967), confrontando os valores linearizados de F_{ST} e de distância geográfica, empregando o programa TFPGA v.1.3 (Miller, 1997).

Para a construção da rede de haplótipos dos dados de DNAm foi empregado o programa Network 4.6.1.1 (Fluxus Technology Ltd - <http://www.fluxus-engineering.com>), baseado no algoritmo *median-joining* (Bandelt *et al.*, 1999).

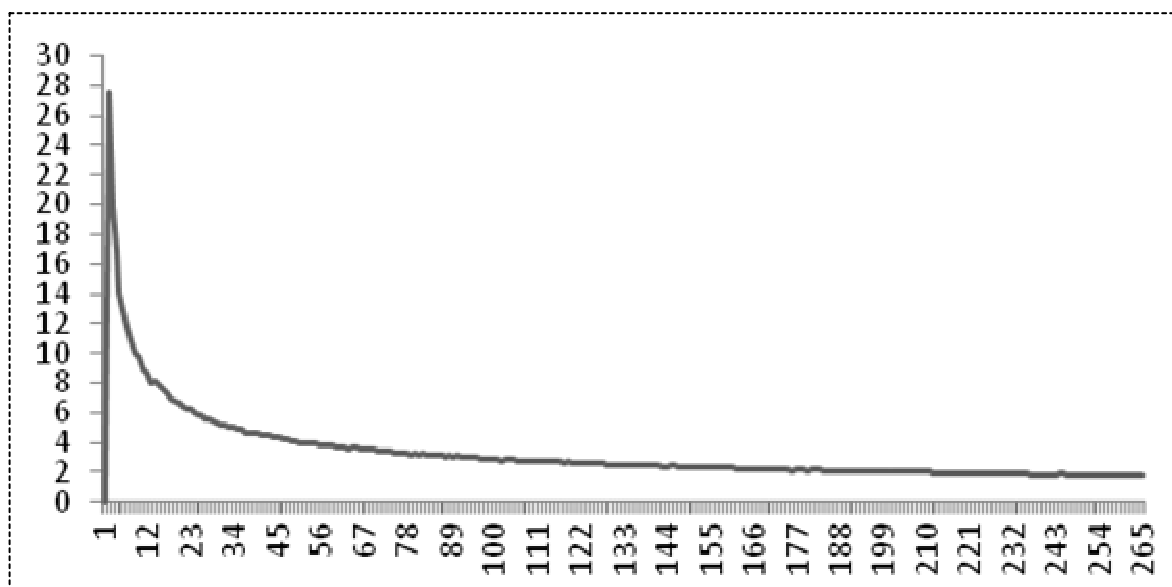
RESULTADOS

Diversidade genética

- Marcadores AFLP

Um total de 264 bandas (dentro da amplitude de 100 a 500 pb) foi obtido a partir da amplificação de oito combinações de *primers* seletivos. O total de locos analisados mostrou-se suficiente para uma análise com confiabilidade nos resultados, uma vez que uma estabilidade na curva do coeficiente de variação (CV%), ao nível de 2 %, foi atingida após cerca de 200 locos de AFLP terem sido amostrados (Figura 2).

Figura 2 - Coeficiente de variação para o número de marcadores amplificados, estimados a partir de 1000 aleatorizações. Eixo Y: Coeficiente de variação (CV%), eixo X: número de marcadores AFLP amplificados.



Os menores valores de proporção de locos polimórficos ($\bar{P} = 11,36\%$), diversidade genética de Nei ($Hs = 0,0409$) e índice de Shannon ($I = 0,0605$), foram apresentados pela amostra T2, enquanto os maiores valores para estes estimadores foram encontrados na amostra T6 ($\bar{P} = 24,62\%$, $Hs = 0,0889$ e $I = 0,1323$), (Tabela 1).

Tabela 1 - Diversidade genética de *G. brasiliensis* em seis trechos da bacia do rio Laranjinha, para os três marcadores utilizados. **N** – número de indivíduos analisados, **L_p** – quantidade de locos polimórficos, **P̄** – proporção de locos polimórficos, **H_S** – diversidade genética de Nei (1973), **I** – Índice de Shannon, **A** – número total de alelos encontrados por população, **N̄_A** – média de alelos para todos os locos na população, **N_E** – média de alelos efetivos para todos os locos na população, **H_O** – heterozigotidade observada, **H_E** – heterozigotidade esperada, **F_{IS}** – índice de endogâmia dentro da população, **Nh** – número de haplótipos encontrados, **h** – diversidade haplotípica, **π** – Diversidade nucleotídica, **D** - teste de neutralidade de Tajima (1989), **F_s** – teste de neutralidade de Fu (1997).

Amostras		AFLP				SSR							D-loop				
Trecho	N	L _p	P̄	H _S	I	A	N̄ _A	N̄ _E	H _O	H _E	H _S	F _{IS}	Nh	h	π	D	F _s
T1	11	48	18,18%	0,0558	0,085	32	3,55	2,72	0,474	0,638	0,609	0,265 * (P = 0,0009)	2	0,545	0,014	2,615	9,952
T2	30	30	11,36 %	0,0409	0,060	37	4,11	2,26	0,509	0,534	0,525	0,047 (P = 0,1935)	1	0	0	0	0
T3	30	63	23,86 %	0,0739	0,112	36	4	2,49	0,614	0,587	0,577	-0,048 (P = 0,8426)	2	0,239	0,006	-0,174	8,747
T4	30	63	23,86 %	0,0818	0,122	35	3,88	2,45	0,566	0,578	0,569	0,021 (P = 0,3538)	2	0,434	0,011	2,381	13,695
T5	30	64	24,24 %	0,0861	0,128	34	3,77	2,52	0,592	0,590	0,580	-0,003 (P = 0,1935)	2	0,287	0,007	0,457	10,082
T6	30	65	24,62 %	0,0889	0,132	48	5,33	3,62	0,628	0,706	0,694	0,112 (P = 0,1935)	3	0,653	0,013	2,635	12,214

* Valores significativos para o F_{IS} e para os testes de Neutralidade (**D** e **F_s**) ($P < 0,05$).

- *Marcadores Microssatélites*

Um total de 57 alelos (média de 37 por amostra ou população) foi identificado para todos os locos em todas as amostras, variando de quatro (Gbra17) a onze (Gbra62) por loco. Por amostra a quantidade de alelos variou de 32 (T1) a 48 (T6) e, por loco em cada amostra, variou de dois (Gra25 em T1 e T4, Gbra16 em T1) a oito (Gbra16 em T6). A heterozigozidade observada (H_O) variou de 0,474 (T1) a 0,628 (T6) e a heterozigozidade esperada (H_E) de 0,534 (T2) a 0,706 (T6). Os maiores valores de diversidade genética de Nei ($H_S = 0,694$), número de alelos ($A = 48$), média de alelos por locos ($N_A = 5,33$), número de alelos efetivos ($N_E = 3,62$) e riqueza alélica ($R_A = 4,72$) foram apresentados pela amostra T6. De modo diverso, as menores quantidades de alelos ($A = 32$) e média de alelos por loco ($N_A = 3,55$) foram obtidas para T1, enquanto a menor diversidade genética de Nei ($H_S = 0,525$) e o número de alelos efetivos ($N_E = 2,26$) foram observados para T2 e a menor riqueza alélica ($R_A = 3,46$) para T4 e T5 (Tabelas 1 e 2).

Tabela 2 - Resultados de cada loco microssatélite para cada uma das seis amostras analisadas. **N** – número de indivíduos, **Na** – número de alelos, **Na_{f>5%}** - número de alelos com frequência acima de 5%, **Np** – número de alelos privados, **R_A** – riqueza alélica, **H_O** – heterozigotidade observada, **H_E** – heterozigotidade esperada, **F_{IS}** – índice de endogamia, **EHW** – teste de significância para possíveis desvios no Equilíbrio de Hardy-Weinberg (valor de P < 0,05 após a correção sequencial de Bonferroni considerando $\alpha = 0,05$).

Amostras e estimadores	Locos										Todos os locos
	N	Gbra16	Gbra17	Gbra21	Gbra25	Gbra47	Gbra55	Gbra62	Gbra63	Gbra96	
Amostra T1	11										
Na/Na_{f>5%}		2/2	3/3	4/4	2/2	3/3	5/4	4/4	5/4	4/3	32/32
Ne/Np		1,65/0	2,35/0	3,84/0	1,98/0	2,49/0	3,40/0	2,84/0	2,91/0	2,98/0	2,72/0
R_A		2	3	4	2	3	5	4	5	4	3,55
H_O		0,545	0,182	0,364	0,364	0,273	0,545	0,727	0,455	0,818	0,474
H_E		0,397	0,574	0,740	0,496	0,599	0,707	0,649	0,657	0,665	0,638
F_{IS}		-0,333	0,708*	0,542*	0,310	0,577*	0,272	-0,073	0,350	-0,184	0,265*
EHW		0,503	0,002*	0,011*	0,541	0,035	0,191	0,671	0,102	0,167	
Amostra T2	30										
Na/Na_{f>5%}		4/4	4/2	4/4	3/2	4/3	3/3	5/2	4/4	6/6	37/30
Ne/Np		1,70/1	1,32/1	3,05/0	2,11/0	1,89/2	2,68/0	2,02/1	2,33/0	3,25/2	2,26/7
R_A		3,62	3,06	3,84	2,60	3,56	2,99	3,33	3,60	5,56	3,57
H_O		0,333	0,133	0,567	0,567	0,600	0,655	0,500	0,600	0,633	0,509
H_E		0,414	0,242	0,673	0,527	0,473	0,628	0,507	0,572	0,693	0,534
F_{IS}		0,211	0,462*	0,174	-0,059	-0,251	-0,026	0,031	-0,032	0,102	0,047
EHW		0,159	0,004*	0,044	1,000	0,576	0,002*	0,698	0,416	0,235	
Amostra T3	30										
Na/Na_{f>5%}		4/3	4/2	4/4	3/2	3/3	4/4	5/4	4/4	5/3	36/29
Ne/Np		1,89/0	1,82/0	2,96/0	1,73/0	2,41/0	2,28/0	3,24/0	3,06/0	3,06/0	2,49/0
R_A		3,55	2,73	3,93	2,60	2,98	3,60	4,50	3,84	3,73	3,49
H_O		0,567	0,467	0,533	0,567	0,767	0,500	0,800	0,700	0,633	0,614
H_E		0,473	0,452	0,663	0,423	0,585	0,563	0,692	0,673	0,674	0,587
F_{IS}		-0,182	-0,015	0,211	-0,325	-0,295	0,128	-0,140	-0,022	0,077	-0,048
EHW		0,486	0,605	0,093	0,167	0,101	0,064	0,769	0,663	0,098	
Amostra T4	30										
Na/Na_{f>5%}		4/4	3/3	4/3	2/2	3/3	4/4	7/4	4/4	4/3	35/30
Ne/Np		1,77/0	2,20/0	2,93/0	1,47/0	2,59/0	2,62/0	2,83/1	3,22/0	2,43/0	2,45/1
R_A		3,72	2,75	3,60	1,99	2,98	3,74	4,93	3,95	3,45	3,46
H_O		0,433	0,533	0,733	0,333	0,600	0,667	0,633	0,700	0,467	0,566
H_E		0,437	0,546	0,659	0,320	0,615	0,619	0,647	0,690	0,589	0,578
F_{IS}		0,025	0,040	-0,095	-0,024	0,041	-0,059	0,037	0,002	0,223	0,021
EHW		0,600	1,000	0,581	1,000	0,955	0,942	0,583	0,616	0,004	
Amostra T5	30										
Na/Na_{f>5%}		4/3	3/3	3/3	3/2	3/3	4/4	6/4	4/4	4/3	34/29
Ne/Np		1,82/0	2,28/0	2,9/0	1,5/0	2,9/0	2,62/0	3,42/0	2,60/0	2,49/0	2,52/0
R_A		3,53	2,90	3,00	2,36	3,00	3,91	5,10	3,83	3,51	3,46
H_O		0,500	0,700	0,600	0,367	0,667	0,633	0,767	0,600	0,500	0,592
H_E		0,453	0,562	0,660	0,346	0,666	0,619	0,708	0,616	0,598	0,590
F_{IS}		-0,087	-0,230	0,107	-0,042	0,016	-0,005	-0,066	0,043	0,180	-0,003
EHW		0,751	0,411	0,186	1,000	0,090	0,669	0,339	1,000	0,403	
Amostra T6	30										
Na/Na_{f>5%}		8/5	3/3	4/3	4/4	4/3	6/5	9/7	6/6	4/3	48/40
Ne/Np		3,90/3	2,58/0	3,22/0	2,08/0	3,05/1	4,62/1	5,84/2	4,74/0	2,55/0	3,62/7
R_A		5,93	2,99	3,86	3,82	3,61	5,41	7,63	5,66	3,59	4,72
H_O		0,800	0,567	0,655	0,393	0,655	0,857	0,667	0,733	0,333	0,628
H_E		0,744	0,613	0,690	0,521	0,673	0,784	0,829	0,789	0,608	0,706
F_{IS}		-0,058	0,092	0,067	0,263*	0,044	-0,075	0,211*	0,087	0,465*	0,112
EHW		0,828	0,188	0,541	0,06	0,063	0,787	0,0063*	0,777	0,003*	

* Valores significativos (Valor de P < 0,05)

Após a aplicação da correção sequencial de Bonferroni, foram evidenciados desvios significativos no equilíbrio de Hardy-Weinberg ($P < 0,05$) nas amostras T1 (Gbra17), T2 (Gbra17 e Gbra55) e T6 (Gbra96 e Gbra62) (Tabela 2). Em todos os casos, a presença de alelos nulos foi inferida pelo programa MICRO-CHECKER como possível causador do excesso de homozigotos apresentado. Valores significativos para a presença de desequilíbrio de ligação foram observados na amostra T1 (Gbra17 - Gbra96 e Gbra55 - Gbra63) e T6 (Gbra62 - Gbra96) (Tabela 2). Valores significativos de F_{IS} (índice de endogamia) foram observados na amostra T1 (Gbra17, Gbra21 e Gbra47), T2 (Gbra17) e T6 (Gbra25, Gbra62) (Tabela 2). Contudo, T1 foi a única amostra que apresentou um F_{IS} geral significativo (Tabelas 1 e 2).

De todos os alelos encontrados, 14 foram privados, sete na amostra T2, sete na amostra T6 e um na amostra T4 (Tabela 2). O único alelo restrito encontrado em T4 se apresentou como raro, com frequência abaixo de 5%, enquanto que nas amostras T2 e T6, alguns dos alelos privados chegaram a 13% de frequência (Tabela 3).

Tabela 3 - Alelos privados encontrados nos locos microssatélites em três amostras de *G. brasiliensis*. Tamanho do fragmento e frequência na população e frequência dos alelos nas amostras.

Amostra	Gbra16	Gbra 17	Gbra47	Gbra55	Gbra62	Gbra96
T2	202- 11,7%	164- 3,3%	228 - 13,3% 242 - 3,3%		241- 3%	243- 6,7% 257- 8,3%
T4					208- 1,7%	
T6	172 - 1,7% 196 - 10% 204- 1,7%		226- 3,4%	152- 3,6%	223- 3,3% 251- 10%	

A análise realizada pelo programa *Bottleneck* não forneceu indicativos para possíveis reduções recentes no tamanho populacional efetivo da amostra T2 em nenhum dos modelos (IAM, SSM e TPM). De modo diferente, no modelo IAM foram observados valores significativos para excesso de heterozigotidade em T1, T3, T4 e T5, enquanto que a amostra T6, apresentou valores significativos para os modelos IAM e TPM (Tabela 4).

Tabela 4 - Teste de sinal para o excesso de heterozigotidade para nove locos microssatélites aplicados nas seis populações de *G. brasiliensis* da bacia do rio Laranjinha. $P \leq 0,05$ indica excesso de heterozigotos.

Amostras	Número de indivíduos	IAM ^a	TPM ^b	SMM ^c
		valor de P	valor de P	valor de P
T1	11	0,0023*	0,0645	0,1796
T2	30	0,1015	0,8496	0,8750
T3	30	0,0019*	0,3261	0,5000
T4	30	0,0048*	0,2851	0,3261
T5	30	0,0048	0,2480	0,5000
T6	30	0,0009*	0,0097*	0,1250

^a Modelo de alelos infinitos (*Infinite Allele Model*), ^b Modelo bifásico (90% SSM) (*Two Phase Model*), ^c Modelo passo a passo (*Stepwise Mutation Model*).

- DNAm (D-loop)

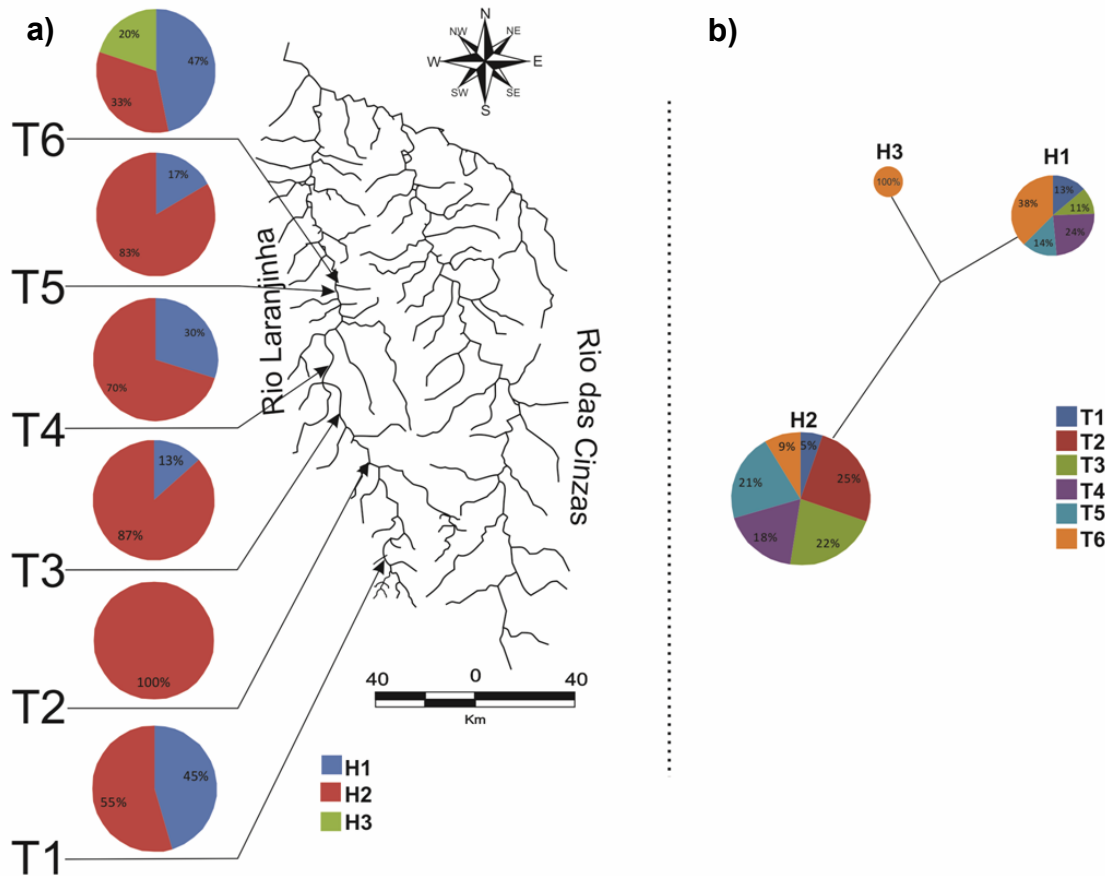
Um fragmento de 488 pb foi obtido a partir do sequenciamento da região controle de DNAm (D-loop), apresentando 15 sítios polimórficos, todos mutações de transição, e a presença de três háplótipos (Tabela 5, Figura 3, b).

Tabela 5 - Sítios variáveis entre três háplótipos da região controle do DNA mitocondrial (D-Loop) encontrados entre 161 amostras de *G. brasiliensis* da bacia do rio Laranjinha. Háplótipos (Hap), quantidade de cada háplótipo em cada amostra (N), código de acesso GenBank.

Seq.	D-loop	N						Nº. número de acesso no GenBank
		T1	T2	T3	T4	T5	T6	
		Posição do nucleotídeo						
	1 1 1 1 1 1 2 2 2 2 2 2 2 2 3							JX8623155
	0 1 4 5 9 9 2 3 5 5 6 7 7 7 8							JX8623156
	4 2 4 0 3 9 4 3 2 6 6 1 4 5 6							JX8623157
Hap 1	G G T A T A G A A G G G A C A	5		4	9	5	14	
Hap 2	A A C G C G . . G A A A G T G	6	30	26	21	25	10	
Hap 3	. . C . . . A G . A						6	
▲	S S S S S S S S S S S S S S S S							

s – Transição, v – Transversão

Figura 3 – Haplótipos mitocondriais encontrados entre as seis amostras de *G. brasiliensis* da bacia do rio Laranjinha. **a)** Distribuição e frequência dos haplótipos entre as amostras. **b)** rede de haplótipos gerada através do programa Network 4.6.1.1, baseado no algoritmo *median-joining*, o tamanho dos círculos é proporcional à frequência do haplótipo



O haplótipo H2 foi encontrado em todas as amostras, enquanto que H1 mostrou-se ausente na amostra T2 e H3 foi encontrado apenas na amostra T6. Na rede de haplótipos, o haplótipo H2 foi o mais frequente da análise e em quase todas as amostras, com exceção de T6, na qual H1 foi o haplótipo de maior frequência (Figura 3b). Deste modo, T1, T3, T4, T5 apresentaram dois haplótipos (H1 e H2), T2 apenas um (H2) e T6 três (H1, H2 e H3) (Tabela 5, Figura 3b). A diversidade haplotípica (h) variou de nula (0) em T2 (apenas um haplótipo) a 0,653 na amostra T6. A diversidade nucleotídica (π) também foi nula em T2, enquanto o maior valor foi apresentado pela amostra T1 ($\pi = 0,014$) (Tabela 1).

O teste de neutralidade de Tajima (D) apresentou valores positivos, no entanto, estes não foram significativos para nenhuma das amostras (Tabela 1). Os valores de F_s do teste Fu, mais sensível a eventos de expansão populacional quando D é negativo, também não foram significativos (Tabela 1).

Estrutura genética

- Marcadores AFLP, Microssatélites e Mitocondrial (D-loop)

A AMOVA indicou para os dados de AFLP, que a maior parte da variação genética encontrada para as amostras analisadas de *G. brasiliensis* se encontra dentro das populações, com 84,86%. Contudo, existe uma porcentagem significativa de variação entre as amostras, revelando estruturação populacional entre estas, $\Phi_{ST} = 0,1513$ ($P = 0,0002$) (Tabela 6).

Tabela 6 – Análise da Variância Molecular (AMOVA) das amostras de *G. brasiliensis*, apresentando a porcentagem de variação dentro e entre as populações para os três marcadores moleculares utilizados.

Fonte de variação	Porcentagem de Variação			
	AFLP	SSR		D-loop
	Φ_{ST}	Φ_{ST}	R_{ST}	Φ_{ST}
Entre populações	15,14%*	7,85%*	8,26%*	25,24%*
Dentro de populações	84,86%*	92,15%*	91,74%*	74,76%*
Índice de Fixação	0,1513*	0,0784*	0,0825*	0,2524*

* $P < 0,01$ (teste de significância através de 1023 permutações)

No caso dos marcadores microssatélites a AMOVA também revelou uma estruturação significativa entre as amostras ($\Phi_{ST} = 0,0785$, $P = 0,0003$; $R_{ST} = 0,0825$, $P = 0,004$). Com base nestes dois estimadores (Φ_{ST} e R_{ST}), respectivamente, 7,85% e 8,26% da variação genética se mostraram presente entre as amostras e 92,15% e 91,74% dentro destas (Tabela 6).

Em relação aos marcadores mitocondriais, a AMOVA, aplicada aos resultados obtidos com o sequenciamento de segmento de parte do gene *D-loop*, evidenciou uma grande e significativa estruturação genética para as amostras de *G. brasiliensis*, com tal estruturação, inclusive, maior que a revelada pelos marcadores AFLP e microssatélites (Tabela 6). Mesmo com a maior parte da variação genética (74,76%) estando presente dentro das amostras dos seis pontos de estudo, 25,24% da variação encontrada se mostrou presente entre as amostras analisadas, com um índice de fixação alélica (Φ_{ST}) de 0,2524 (Tabela 6).

Todos os valores de Φ_{ST} par a par com base nos marcadores AFLP foram significativos, variando de 0,022 entre T3 e T4 a 0,373 entre T2 e T6 (Tabela 7). Ainda, em relação à distância genética de Nei (1978), os resultados mostraram uma variação de 0,003 (T4 e T5) a 0,030 (T2 e T6) (Tabela 7).

Tabela 7 – Diferenciação genética par a par entre as amostras de *G. brasiliensis* da bacia do rio Laranjinha, estimada a partir dos três marcadores moleculares utilizados. Φ_{ST} , F_{ST} , e R_{ST} – parâmetros possuem como base as estatísticas F de Wright, D_{EST} - parâmetro de Jost (2008), D_{Nei} - distância genética de Nei (1978).

Pares de Amostras	AFLP		Microssatélites				DNAmt
	Φ_{ST}	D_{Nei}	F_{ST}	R_{ST}	D_{EST}	D_{Nei}	Φ_{ST}
T1 x T2	0,195*	0,010	0,063*	0,006	0,061*	0,084	0,585*
T1 x T3	0,033*	0,008	0,014	-0,004	0,077*	0,019	0,208
T1 x T4	0,115*	0,013	0,008	0,025	0,054*	0,007	-0,010
T1 x T5	0,093*	0,012	0,016	0,039	0,113*	0,022	0,146
T1 x T6	0,155*	0,016	0,063*	0,092*	0,159*	0,147	0,021
T2 x T3	0,204*	0,013	0,072*	0,028	0,076*	0,104	0,103
T2 x T4	0,285*	0,020	0,135*	0,092*	0,144*	0,219	0,275*
T2 x T5	0,279*	0,021	0,141*	0,113*	0,188*	0,237	0,137*
T2 x T6	0,373*	0,030	0,202*	0,200*	0,335*	0,504	0,610*
T3 x T4	0,022*	0,003	0,021*	0,042	0,020*	0,031	0,046
T3 x T5	0,043*	0,005	0,020*	0,035	0,035*	0,030	-0,029
T3 x T6	0,127*	0,012	0,100*	0,093*	0,163*	0,209	0,398*
T4 x T5	0,024*	0,003	-0,005	0,019	0,019*	-0,008	0,015
T4 x T6	0,105*	0,009	0,069*	0,178*	0,108*	0,124	0,185*
T5 x T6	0,083*	0,009	0,061*	0,103*	0,098*	0,111	0,350*

* Valores significativos (Valor de $P < 0,05$)

Em relação aos marcadores microssatélites, os valores de F_{ST} das análises par a par não foram significativos para as combinações T1xT3, T1xT4, T1xT5 e T4xT5; entre os valores significativos, o mais alto foi observado entre as amostras T2 e T6 ($F_{ST} = 0,202$) e o menor entre as amostras T3 e T5 ($F_{ST} = 0,020$) (Tabela 7). Para o estimador R_{ST} , os valores significativos foram observados apenas em combinações envolvendo a amostra T2 ou T6, com exceção de T2xT3 (Tabela 7).

O índice D_{EST} foi significativo para todas as combinações, apresentando o menor valor entre as amostras T4 e T5 ($D_{EST} = 0,019$) e o maior entre as amostras T2 e T6 ($D_{EST} = 0,373$) (Tabela 7). Merece destaque o fato de que,

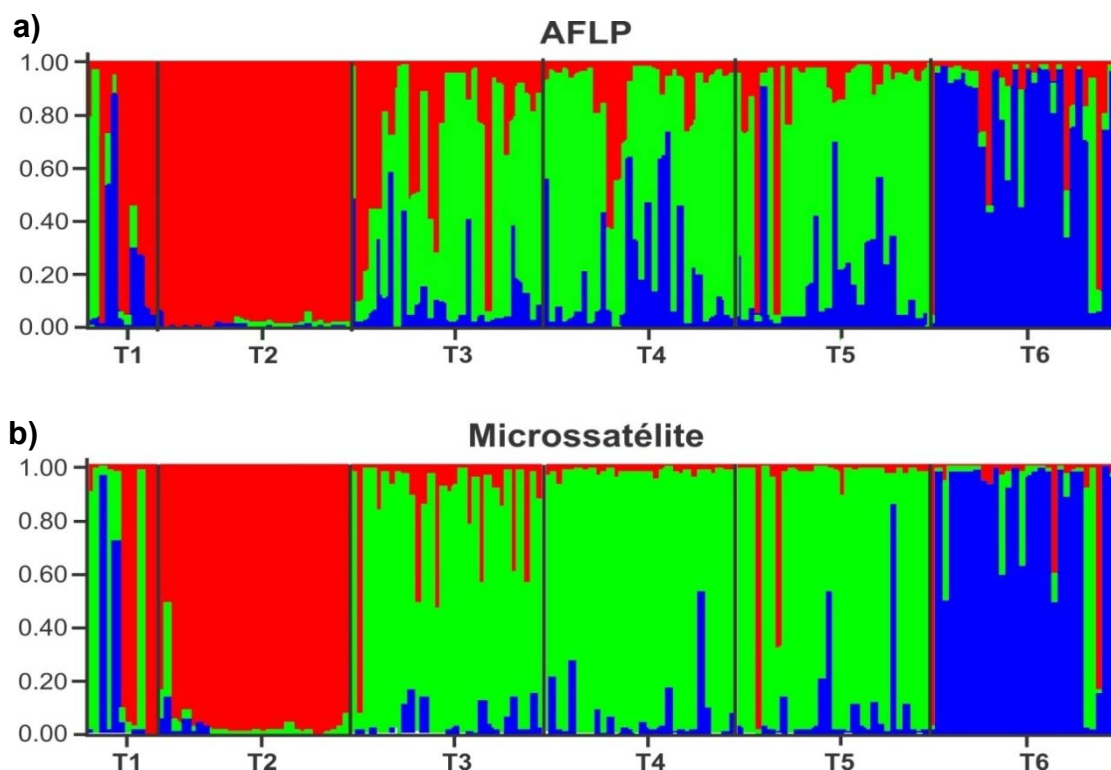
para a maioria dos pares de comparações os valores de D_{EST} se mostraram, no mínimo, ligeiramente superiores aos revelados pelos estimadores F_{ST} e R_{ST} (Tabela 7). A distância genética de Nei (1978) para os dados de microssatélites mostraram os maiores valores em combinações envolvendo a amostra T2 ou T6, com o menor valor para a combinação T4 x T5 (- 0,008) e o maior para a combinação T2 x T6 (0,504) (Tabela 7).

Nas análises mitocondriais, os valores Φ_{ST} par a par foram significativos em quase todas as comparações envolvendo as amostras T2 ou T6, exceto para as combinações T2 x T3 e T1 x T6 (valor de $P > 0,05$). Entre os valores significativos, o maior valor foi apresentado pela combinação T2 x T6 ($\Phi_{ST} = 0,610$) e o menor pela combinação T2 x T5 ($\Phi_{ST} = 0,137$) (Tabela 7).

O teste de Mantel, aplicado para testar a correlação entre as distâncias geográficas e os valores de diferenciação genética (F_{ST}), não apresentou valores significativos.

Na análise de agrupamentos bayesianos (*Structure*) realizada para os dados de AFLP, o K (número de agrupamentos) mais provável, calculado a partir do delta K (ΔK) dos valores de $\ln(PD)$ (Evanno *et al.*, 2005), foi $K = 3$. A representação gráfica deste valor demonstra a existência de três grupos bem definidos entre as amostras, um formado por T2, outro formado por T6 e um terceiro formado por T3, T4 e T5 (Figura 4).

Figura 4 – Representação gráfica dos agrupamentos Bayesianos formados a partir de $K = 3$ para as amostras de *G. brasiliensis* da bacia do rio Laranjinha. **a)** Gráfico gerado a partir dos dados de AFLP. **b)** Gráfico gerado a partir dos dados de microssatélites.



O agrupamento bayesiano (*Structure*) realizado para os dados de microssatélites, também indicou um $K = 3$ no método Evanno *et al.* (2005), evidenciando um gráfico de distribuição parecido com o apresentado pelos marcadores AFLPs (Figura 4).

Também para os dados dos microssatélites, a estimativa bayesiana de fluxo gênico, realizada através do programa BayesAss, indicou que nas amostras T2 e T5 quase toda a diversidade genética resulta de indivíduos não migrantes (98,4% e 98,5% respectivamente). No entanto, ao contrário de T2, que demonstra contribuir apenas com a diversidade genética de T1 (11%), a amostra T5 apresentou uma boa representatividade dentro das amostras do rio (11,9% em T1, 29,8% em T3 e 30,1% em T4) e foi única com mais de 5% em na amostra T6, no ribeirão do Penacho (5,4%). As amostras T1, T2 e T3 apresentaram de 67,7% a 69,3% de não migrantes e pequenas contribuições entre si. A amostra T6 (ribeirão do Penacho) apresentou 86,5% de não migrantes e valores abaixo de 5% das outras amostras, com exceção de T5 (5,4%) (Tabela 8).

Tabela 8 – Fluxo gênico estimado a partir de uma análise bayesiana, utilizando o programa BeysAss. Porcentagem de migrantes e de não migrantes dentro de cada uma das seis amostras estudadas (T1 a T6). Entre parênteses intervalo de confiança (IC).

Nº não migrantes (95% IC)					
T1	T2	T3	T4	T5	T6
0,693 (0,66 - 0,75)	0,984 (0,941 - 0,990)	0,677 (0,666 - 0,705)	0,677 (0,666 - 0,706)	0,985 (0,948 - 0,999)	0,865 (0,797 - 0,932)
Nº migrantes (95% IC)					
T1	T2	T3	T4	T5	T6
T2 - 0,119 (0,044 - 0,213)	T1 - 0,002 (2,40 ⁻⁸ - 0,016)	T1 - 0,005 (1,56 ⁻⁶ - 0,027)	T1 - 0,005 (5,41 ⁻⁶ - 0,028)	T1 - 0,002 (1,81 ⁻⁸ - 0,015)	T1 - 0,017 (2,16 ⁻⁵ - 0,081)
T3 - 0,014 (9,28 ⁻⁵ - 0,060)	T3 - 0,003 (3,45 ⁻⁸ - 0,022)	T2 - 0,008 (1,12 ⁻⁵ - 0,037)	T2 - 0,005 (3,11 ⁻⁶ - 0,027)	T2 - 0,003 (2,84 ⁻⁸ - 0,023)	T2 - 0,02 (0,0003-0,071)
T4 - 0,014 (0,000 - 0,061)	T4 - 0,002 (2,86 ⁻⁸ - 0,015)	T4 - 0,004 (3,44 ⁻⁶ - 0,024)	T3 - 0,004 (4,29 ⁻⁶ - 0,023)	T3 - 0,002 (2,43 ⁻⁸ - 0,018)	T3 - 0,018 (1,36 ⁻⁵ - 0,097)
T5 - 0,119 (0,043, 0,208)	T5 - 0,004 (7,30 ⁻⁸ - 0,025)	T5 - 0,298 (0,253 - 0,327)	T5 - 0,301 (0,257 - 0,328)	T4 - 0,002 (1,28 ⁻⁸ - 0,016)	T4 - 0,018 (1,91 ⁻⁵ - 0,096)
T6 - 0,038 (0,001, 0,107)	T6 - 0,002 (1,20 ⁻⁷ - 0,019)	T6 - 0,005 (6,96 ⁻⁶ - 0,025)	T6 - 0,005 (3,03 ⁻⁶ - 0,025)	T6 - 0,003 (6,22 ⁻⁸ - 0,021)	T5 - 0,054 (0,012 - 0,117)

DISCUSSÃO

Diversidade genética

Os níveis de diversidade genética são fundamentais na sustentação do potencial adaptativo/evolutivo de uma espécie (Frankham *et al.*, 2010). Maiores níveis de diversidade genética possibilitam maiores oportunidades para o surgimento de genótipos resistentes às alterações no ambiente (Ferguson *et al.*, 1995). *Geophagus brasiliensis* ocupa com eficiência diferentes tipos de ambientes dentro das bacias hidrográficas onde ocorre. Deste modo, é considerada uma espécie oportunista, que consegue aproveitar os poucos recursos disponíveis, tornando-se abundante ao logo de ambientes heterogêneos (Teixeira *et al.*, 2005).

Mesmo exibindo este potencial de adaptação a diferentes ambientes, os níveis de diversidade genética identificados no presente trabalho, especialmente pelos marcadores AFLP e mitocondriais, de um modo geral, foram

inferiores a de outras espécies da ictiofauna neotropical (Almeida *et al.*, 2003; Martins *et al.*, 2003; Batista & Alves-Gomes, 2006; Lopes *et al.*, 2007).

Embora não existam estudos populacionais de outras espécies da ictiofauna de água doce neotropical com marcadores AFLPs, trabalhos realizados com marcadores PCR-RAPD, técnica que apresenta características similares ao AFLP (ou seja, marcador multiloco e dominante) (Avise, 2004), usualmente revelam uma maior diversidade genética para diferentes espécies (Almeida *et al.*, 2003; Leuzzi *et al.*, 2004; Sofia *et al.*, 2006, Lopes *et al.*, 2007) em relação à encontrada em *G. brasiliensis*. A principal exceção envolve *Hypostomus ancistroides* (Sofia *et al.*, 2008), outra espécie Neotropical, sedentária e que também exhibe cuidado parental (Zawadzki *et al.*, 2005).

No caso da análise mitocondrial, o número de haplótipos e os valores das diversidades haplotípica (h) e nucleotídica (π), revelados para *G. brasiliensis* a partir da análise da região D-loop, também foram comparativamente inferiores aos descritos para outras espécies de peixes neotropicais (Martins *et al.*, 2003; Garcez *et al.*, 2011). Contudo, é importante destacar que, ao contrário de *G. brasiliensis*, as espécies estudadas nos trabalhos anteriormente citados eram migradoras e o estudo envolvia áreas mais abrangentes dentro das bacias hidrográficas.

De qualquer forma, os resultados obtidos a partir destes dois tipos de marcadores permitem sugerir que os níveis de variabilidade genética apresentados por *G. brasiliensis* possivelmente estão mais relacionados à biologia particular da espécie que necessariamente a um caso específico de depleção da variabilidade. Apesar disto, ao se considerar a conservação de populações de espécies com hábitos sedentários, uma maior atenção deve ser dirigida a estas, uma vez que podem já estar inerentemente sujeitas a uma menor diversidade genética.

Diferente do observado com AFLP e DNAm_t, os níveis de heterozigosidade esperada (H_E), estimados a partir dos marcadores microsatélites, revelaram valores dentro da média relatada para peixes de água doce ($H_E = 0,54$) (Dewoody & Avise, 2000). Em relação a outros peixes neotropicais, os valores de H_E de *G. brasiliensis* foram próximos aos apresentados por populações naturais de algumas espécies migradoras (Abreu *et al.*, 2009; Calcagnotto & Desalle, 2009), e inferiores aos de outras (Barroso *et al.*, 2005; Matsumoto & Hilsdorf, 2009). Contudo, considerando a diversidade alélica dentro das populações, as médias de alelos por

loco de *G. brasiliensis* (3,55 a 5,33) se mostraram abaixo da relatada para peixes de água doce, que é de 9,1 alelos por loco (Dewoody & Avise, 2000), e menor ou bem menor que a apresentada pelas espécies dos trabalhos anteriormente citados.

Com base em outros tipos de marcadores moleculares, a exemplo de isoenzimas e RAPD, alguns autores argumentam que a baixa diversidade genética de alguns peixes neotropicais sedentários parece estar relacionada aos movimentos restritos que estas espécies efetuam dentro dos sistemas hídricos (Zawadzki *et al.*, 2005; Sofia *et al.*, 2008; Philippsen *et al.*, 2009). De fato, a mobilidade do organismo consiste em um dos fatores determinantes para grau de fluxo gênico entre suas populações (Avise, 2004). Conseqüentemente, espécies que apresentam populações com tamanho efetivo reduzido e limitações nos seus níveis de fluxo gênico são mais suscetíveis aos efeitos da deriva genética (perda e fixação aleatória de alelos), resultando na diminuição da diversidade genética dentro das populações (Templeton, 2011).

De modo contrário, altos níveis de diversidade genética são mais comuns e esperados em peixes migratórios que apresentam grandes populações panmíticas. Neste caso, o grande tamanho efetivo das populações e as altas taxas de migração atuam minimizando os efeitos da deriva genética (Santos *et al.*, 2007; Ribolli *et al.*, 2012). Além disso, uma das importantes conseqüências da migração para estas espécies é a reunião de uma grande quantidade de indivíduos de ambos os sexos nas áreas de reprodução (Agostinho *et al.*, 2003), diferente de *G. brasiliensis*, que além de não efetuar migrações, apresenta a característica de formar casais durante o período reprodutivo (Kullander, 2003). Estas diferenças nos comportamentos reprodutivos podem ser determinantes para a origem de uma maior quantidade de genótipos diferentes e conseqüentemente, maior diversidade genética.

Apesar da amostra T1 ter sido analisada com um número amostral ($N = 11$) abaixo do indicado para estudos populacionais de espécies com diversidade genética desconhecida (Kalinowski *et al.*, 2005; Pruett & Winker, 2008), sua análise forneceu informações relevantes para o estudo, embora devam ser interpretadas com cautela devido ao reduzido tamanho desta amostra. A proporção de locos AFLPs polimórficos de T1 foi menor que a da maioria das outras amostras, com exceção da amostra T2 (a jusante). Além disso, T1 apresentou o haplótipo mitocondrial H1, ausente em T2, mas presente em todas as outras amostras. Nas

análises de microssatélites, apresentou um menor número de alelos (32), no entanto, todos com frequência acima de 5%, similar às médias das outras amostras, desconsiderando-se os alelos raros. Segundo Barroso *et al.* (2005), apesar do tamanho da amostra interferir no número total de alelos por loco, o mesmo pode não afetar a ocorrência dos alelos mais comuns.

Dentre as seis amostras de *G. brasiliensis* analisadas neste estudo, é notável o fato de que T2 apresentou praticamente metade da proporção de locos AFLPs polimórficos das demais amostras, a menor diversidade genética ($H_E = 0,534$) e uma diversidade haplotípica nula, exibindo apenas um haplótipo mitocondrial. Tais resultados sugerem que T2 tenha sofrido um declínio em sua diversidade genética. Apesar de aparentemente não existirem barreiras físicas que poderiam limitar a conectividade entre os trechos T1, T2 e T3, a amostra T2 demonstra indicativos de limitações no fluxo gênico. Além da ausência de migrantes provenientes de outras amostras, inferida pela análise bayesiana, esta amostra não apresentou o haplótipo mitocondrial H1, presente a montante (T1) e a jusante (T3), e sete alelos microssatélites privados. Considerando a importância do fluxo gênico em diminuir as diferenças entre as populações e aumentar a diversidade genética dentro das populações (Allendorf *et al.*, 2012), os resultados apresentados por T2 sugerem uma possível relação entre a baixa diversidade genética e as limitações no fluxo gênico. Populações que se encontram isoladas ou que apresentam baixos níveis de fluxo gênico são mais susceptíveis aos efeitos da deriva genética e da endogamia, fatores que geralmente resultam na diminuição da diversidade genética (Frankham *et al.*, 2010; Hartl & Clark, 2010).

Apesar de serem observadas relações entre a endogamia e o hábito sedentário de alguns peixes de água doce (Zawadzki *et al.*, 1999; Peres *et al.*, 2002; Zawadzki *et al.*, 2005; Sofia *et al.*, 2008; Philippsen *et al.*, 2009), os resultados apresentados para T2 (a partir dos microssatélites) não demonstram relações com uma situação particular de endogamia, pois, similar ao apresentado pelas amostras T3, T4, T5 e T6, o F_{IS} (índice de endogamia) geral desta amostra não foi significativo ($F_{IS} = 0,047$, valor de $P = 0,1935$). Mesmo sem indicativos de endogamia, T2 apresentou dois locos microssatélites com excesso de homozigotos, resultando em desvios significativos no equilíbrio de Hardy-Weinberg, o que, neste caso, possivelmente está relacionado aos efeitos da deriva genética em função da subdivisão populacional (Young *et al.*, 2000).

Considerando os resultados encontrados nas demais amostras, a redução na diversidade genética de T2 possivelmente não está ligada apenas às limitações no fluxo gênico. Embora na análise com microssatélites esta amostra não tenha apresentado indicativos de reduções recentes no tamanho efetivo da população (excesso de heterozigoidade) (Cornuet & Luikart, 1996), os resultados dos marcadores AFLP e DNAmT sugerem este evento como responsável pelo declínio da diversidade genética (Nei *et al.*, 1975; Templeton, 2011). A partir do DNAmT, os indicativos de um gargalo genético em T2 relacionam-se principalmente ao fato desta amostra ter apresentado apenas um haplótipo mitocondrial (H2). O haplótipo H1 foi menos frequente que H2 entre as amostras do rio, no entanto, foi encontrado em quase todas as amostras, inclusive a montante (T1) e a jusante (T3) de T2, o que sugere que ele foi eliminado da amostra T2.

Reforçando os indicativos do DNAmT, os marcadores AFLP também identificaram reduções consideráveis na variabilidade genética da amostra T2. Considerando a taxa de mutação dos marcadores AFLPs, de 10^{-6} (Marette *et al.*, 2001), e a dos microssatélites, de 10^{-3} a 10^{-4} (Estoup & Angers, 1998), é possível que a redução no tamanho efetivo da amostra T2 tenha sido um evento mais antigo, que não pôde ser detectado pelos microssatélites, tendo em vista que o teste de sinal *bottleneck* considera eventos recentes (Piry *et al.*, 1999).

Por outro lado, deve ser destacado que, embora menos drásticos que os declínios observados a partir dos AFLPs e DNAmT, T2 também apresentou reduções nos níveis de diversidade genética dos locos microssatélites. Do total de alelos microssatélites encontrados nesta amostra, sete foram alelos privados, sendo quatro com contribuições acima de 7%, o que sugere a origem e a fixação destes alelos por deriva genética após um gargalo genético. Tendo em vista que a diversidade genética dos microssatélites responde mais rápido as reduções populacionais que a diversidade do DNAmT (McCusker & Bentzen, 2010), as informações obtidas a partir dos AFLPs, DNAmT e microssatélites reforçam a hipótese de que a amostra T2 tenha passado por um gargalo genético mais antigo, com os microssatélites tendo apresentado uma recuperação na diversidade genética, a qual não foi acompanhada pelos marcadores AFLP e DNAmT.

O conhecimento genético de populações possui grande importância na definição de prioridades para a conservação dos ecossistemas de água doce (Geist, 2011). Dentre as amostras de *G. brasiliensis* estudadas na bacia do rio

Laranjinha, os maiores níveis de diversidade genética não foram encontrados nos trechos da calha principal e sim no trecho do ribeirão do Penacho (T6). Mesmo sendo a amostra de apenas um trecho do ribeirão, os resultados de T6 fornecem indicativos da importância que os ribeirões possivelmente desempenham como refúgios de diversidade genética dentro das bacias hidrográficas, o que deve ser considerado em medidas de conservação.

Além das maiores estimativas de variabilidade genética ($\bar{P} = 24,62\%$, $H_E = 0,7066$ e $h = 0,653$), T6 apresentou onze alelos microssatélites a mais que a média das outras amostras (37). Mesmo com nove destes sendo raros, a amostra manteve a maior média de alelos efetivos por loco (3,62) e se destacou como a única com três haplótipos mitocondriais, sendo um deles restrito (H3) à esta amostra. Similar ao observado em T2, os déficit de heterozigotos de alguns locos microssatélites fora do EHW e em desequilíbrio de ligação na amostra T6 demonstram uma relação pouco provável com alelos nulos. Em peixes, o déficit de heterozigotos é comumente observado em casos de populações com altos níveis de endogamia ou devido às interferências do efeito Wahlund (O'Connell & Wright, 1997).

Mesmo sendo mais diversa que as demais amostras, T6 apresentou indicativos de redução no tamanho efetivo da população, exibindo excesso de heterozigozidade em dois dos modelos utilizados no teste *bottleneck* (IAM e TPM). Contudo, os resultados dos AFLPs e DNAmT não corroboram a ocorrência de um gargalo genético recente nesta amostra, pois na análise de marcadores AFLPs ela demonstra uma diversidade genética semelhante a encontrada nas amostras do rio Laranjinha, enquanto que na análise mitocondrial ela mostrou a maior diversidade, com três haplótipos.

Considerando que o teste de sinal para reduções no tamanho efetivo de populações possui como base a presença de excesso de heterozigozidade (Cornuet & Luikart, 1996), outra possível explicação para os resultados dos microssatélites para a amostra T6 seria a origem da população a partir de um número pequeno de indivíduos (efeito fundador), hipótese que é reforçada pela presença dos haplótipos H1 e H2 (comuns às amostras do rio Laranjinha) e pelo indicativo de fluxo gênico proveniente de T5 (BayesAss). Contudo, tendo em vista que tanto o efeito fundador como o gargalo genético são mais drásticos sobre o número de alelos de uma população (Allendorf *et al.*, 2012), este

evento se torna menos provável em T6, pois, além desta amostra ter apresentado a maior quantidade de alelos da análise, também apresentou dez alelos frequentes (> 5%) a mais que as outras amostras, além de sete alelos privados.

Desse modo, parece mais provável que o excesso de heterozigozidade indicado para T6 esteja mais relacionado ao fato da amostra não ter englobado toda a extensão da população dentro do ribeirão, ou mesmo, que a amostra esteja sofrendo influências de indivíduos provenientes de outros locais dentro do ribeirão estudado ou do rio Laranjinha, uma vez que a amostra fica próxima à foz do ribeirão Penacho e demonstra receber migrantes do rio. Adicionalmente, é importante destacar que ribeirões possuem diversas características particulares, de modo que muitas das condições ambientais fornecidas aos organismos dentro deles são diferentes das de um rio (Castro, 1999; Esteves & Aranha, 1999).

Estrutura genética

Os três marcadores utilizados neste estudo, apesar de possuírem diferenças intrínsecas (Sunnucks, 2000; Avise, 2004), revelaram um padrão semelhante de estruturação genética para as amostras de *G. brasiliensis* na bacia do rio estudado. Juntos, os resultados das estimativas de diferenciação (Φ_{ST} , F_{ST} , R_{ST} e D_{EST}), distância genética de Nei (1978) e agrupamentos bayesianos, indicaram a formação de três grupos entre as amostras. Um grupo formado por T3, T4 e T5, na região média do rio, outro formado por indivíduos de T2, na região alta do rio Laranjinha e um terceiro grupo formado por indivíduos de T6, no ribeirão do Penacho. Apesar do baixo número amostral de T1, grande parte dos resultados indica que a amostra deste local pertence ao primeiro grupo.

Embora os três marcadores tenham detectado porcentagens significativas de variação molecular (AMOVA) entre amostras, a quantidade de variação foi diferente em cada caso, especialmente entre os marcadores nucleares e o mitocondrial. Como os três marcadores corroboraram um padrão comum de divergência, as discrepâncias em suas intensidades de diferenciação sugerem uma maior relação com as diferenças na taxa evolutiva de cada marcador e também, no caso do DNAm, com relação à origem de cada marcador (Birky *et al.*, 1983, Avise, 2004; Freeland, 2005).

Segundo Allan & Flecker (2003) em virtude de fatores geológicos e comportamentais, peixes de água doce tendem a apresentar diferenciações genéticas entre suas populações. No entanto, os níveis de estruturação genética entre populações dependem da quantidade de fluxo gênico que resulta da dispersão e da biologia reprodutiva de cada espécie, deste modo, os níveis de estruturação podem ser variáveis ou mesmo inexistentes (Templeton, 2011). Diferentes espécies de peixes podem compartilhar o mesmo sistema hidrográfico, mas seus comportamentos de dispersão e histórias únicas de vida podem resultar em diferentes padrões e taxas de fluxo gênico (Vrijenhoek, 1998).

Espécies que apresentam grande potencial de dispersão e/ou altas taxas de migração, comumente, possuem maiores níveis de fluxo gênico e conseqüentemente menor estruturação populacional (Freeland, 2005; Adamson *et al.*, 2012). De modo geral, espécies de peixes de pequeno porte, a exemplo de *G. brasiliensis*, apresentam baixa capacidade de deslocamento dentro das drenagens que habitam (Castro, 1999). Adicionalmente, *G. brasiliensis* é apontado como uma espécie não migradora e que exibe cuidado parental (Winemiller, 1989; Kullander, 2003), características evidenciadas em peixes com altos níveis de estruturação populacional (Dergam *et al.*, 2002; Sofia *et al.*, 2008; Adamson *et al.*, 2012).

Tomando-se como base os resultados das análises de diferenciação genética entre combinações de amostras e os níveis de diferenciação propostos para os valores de F_{ST} (e análogos) por Wright (1978), baixos níveis de divergência genética foram encontrados entre as amostras T3, T4 e T5, na calha principal do rio. Contudo, mesmo indicando uma baixa diferenciação, os valores significativos de F_{ST} (encontrados principalmente a partir dos AFLPs) devem ser considerados, pois, podem refletir uma estrutura genética importante para as populações estudadas (Balloux & Lugon-Moulin, 2002; Freeland, 2005), especialmente no caso de uma espécie não migradora e exibindo cuidado parental, como é o caso de *G. brasiliensis*.

De modo distinto, a amostra T2, apresentou uma grande estruturação genética, variando de moderada (microssatélites) a muito alta (AFLP e DNAm). Seus níveis de fluxo gênico foram muito baixos, de modo que a análise bayesiana inferiu que ela praticamente não recebe migrantes. Segundo Winemiller (1989), Ciclídeos neotropicais apresentam uma estratégia de equilíbrio em seus habitats, com populações locais sedentárias, recursos alimentares estáveis, estação

reprodutiva prolongada e cuidado parental. Tais características poderiam justificar os baixos níveis de fluxo gênico e a grande estruturação genética de T2 (Freeland, 2005; Adamson *et al.*, 2012). No entanto, considerando o declínio na diversidade genética desta amostra (principalmente AFLP e DNAmt) e o padrão de diferenciação observado entre T3, T4 e T5, outros fatores devem ser adicionados às considerações sobre esta diferenciação.

Segundo Slatkin (1987), se a distribuição geográfica de uma espécie permanece a mesma por uma quantidade de tempo evolutivo significativa e se as populações locais persistem por longos períodos, então o fluxo gênico ocorre preferencialmente por meio de movimentos de indivíduos entre as populações estabelecidas, de modo que a quantidade de fluxo gênico dependerá da biologia reprodutiva de cada espécie. Contudo, os níveis de fluxo gênico e a estrutura genética de uma espécie são influenciados não apenas por fatores biológicos, como o potencial de mobilidade, traços comportamentais (ex. alianças sociais e filopatria), padrões de dispersão e migrações reprodutivas, como também por fatores de caráter ambiental, como presença de barreiras físicas ou ecológicas, histórias únicas de vida, seleção natural em locos nucleares ou mitocondriais, eventos demográficos e distância geográfica entre populações (Avice, 2004).

Os resultados apresentados pela amostra T2 sugerem que seus níveis de diferenciação genética originaram-se de uma associação entre fatores biológicos e demográficos. Um gargalo genético teria resultado na considerável redução de diversidade genética apresentada pela amostra (principalmente AFLP e DNAmt) (ex., ver Frankham *et al.*, 2010 e Templeton, 2011), e conseqüentemente, o hábito sedentário de *G. brasiliensis* facilitou a atuação da deriva genética, resultando em uma estruturação genética discrepante da observada nas demais amostras do rio.

A análise bayesiana de fluxo gênico, estimativa atualmente utilizada com eficiência definição de padrões de dispersão e fluxo gênico entre populações naturais (Palstra *et al.*, 2007; Massa-Gallucci *et al.*, 2010; Lamphere & Blum, 2012), indicou que entre as amostras do rio existe uma tendência do fluxo gênico ocorrer no sentido jusante-montante. Enquanto a amostra T5 (a jusante) praticamente não recebe migração, em direção a montante ela contribui com 30,1% em T4 e 29,86% em T3, não contribui em T2 (grande estruturação genética), voltando a contribuir com 11,9 % na amostra seguinte (T1), mesma porcentagem de contribuição de T2

para T1. A partir deste padrão de fluxo gênico foi possível fazer algumas inferências relacionadas à interferência dos barramentos sobre populações de peixes sedentários.

O trecho T5, o qual fica localizado a jusante do barramento de uma PCH (Pequena Central Hidrelétrica), construída a mais de 50 anos na região média do rio Laranjinha, as inferências da análise bayesiana sugerem que a presença deste obstáculo resultou na ausência de contribuições das amostras a montante em T5. Dentre outros impactos, a implantação de barramentos como PCHs resulta na fragmentação geográfica das espécies, podendo causar mudanças nas proporções relativas dos componentes de diversidade genética dentro e entre as populações (Vrijenhoek, 1998). Como a diferenciação genética entre a amostra T5 e a amostra subsequente T4 foi baixa, a representação de migrantes de T5 nas amostras T3 e T4 possivelmente foi originada de indivíduos que formavam com T5 uma única população antes da construção do barramento. Após a construção, os indivíduos de T5 (atual à jusante da barragem) não puderam subir rio acima, nem receber indivíduos localizados à montante da barragem, entretanto os indivíduos que formavam uma única população com T5 e que foram arbitrariamente separados destes, mantiveram contato com as populações à montante.

Embora a correlação entre distância geográfica e divergência genética não tenha sido significativa, a diferenciação genética significativa encontrada entre as amostras do rio (principalmente pelos AFLPs) foi menor entre trechos mais próximos. Este padrão, somado a característica sedentária de *G. brasiliensis* (Winemiller, 1989; Kullander, 2003), sugere que a distribuição da diversidade genética entre as amostras do rio ocorre similar ao proposto pelo modelo de dispersão *Stepping-Stone* (Kimura & Weiss, 1964), modelo sugerido anteriormente para alguns peixes de água doce da América do Norte (Maltagliati, 1999; Baer, 1998; Vrijenhoek, 1998) e da região Neotropical (Moysés & Almeida-Toledo, 2002).

Rios e ribeirões se encaixam no padrão unidimensional do modelo *Stepping-Stone*, ou seja, as populações de um organismo estão distribuídas linearmente ao longo de uma faixa (Allendorf *et al.*, 2012). Neste modelo, a dispersão ocorre preferencialmente entre populações vizinhas e raramente envolve populações mais distantes; desse modo, origina-se uma correlação de frequências alélicas que diminui à medida que o número de passos (demes) entre as populações aumenta

(Kimura & Weiss, 1964). Com base na maior parte dos resultados, pode-se sugerir que todas as amostras do rio compartilhavam este modelo de dispersão, no entanto, em decorrência de um evento particular, a amostra T2 acabou quebrando este padrão de conexão, de modo que T1 ainda possui resquícios de influências do antigo padrão, mas também recebe influências de T2.

De modo distinto, a amostra T6, coletada fora da calha principal (ribeirão do Penacho), não demonstrou um padrão similar ao observado entre as amostras do rio. Independente da distância geográfica ou da presença de barreiras físicas, a amostra apresentou uma grande estruturação genética, variando de moderada (microsatélites) a muito alta (AFLP, DNAm) em relação às amostras do rio.

A conectividade entre populações ao longo de uma bacia hidrográfica pode ser afetada pela posição geográfica em que cada população se encontra (Hughes *et al.*, 2009). Segundo o modelo *Stream Hierarchy*, proposto por Meffe & Vrijenhoek (1988), devido à natureza dendrítica de rios e ribeirões, as diferenças genéticas entre populações da mesma drenagem (ex. somente na calha principal) tendem a ser menores que entre populações de drenagens diferentes (ex. calha principal x tributário). Além disso, alterações geológicas ou antrópicas (como exemplo cascatas, barramentos e diferenças nas condições químicas) podem acentuar este padrão, eliminando a conectividade tanto dentro como entre drenagens (Meffe & Vrijenhoek, 1988).

Com exceção de comparações envolvendo a amostra T2, a maior parte das comparações entre as amostras do rio apresentou uma menor diferenciação genética que a encontrada entre as amostras do rio e do ribeirão (T6). O trecho T6 fica cerca de 5,6 km a jusante do trecho T5 e não existem barreiras geográficas entre eles, mesmo assim, a diferenciação entre estas amostras foi maior que a observada entre T5 e T4, separados por um barramento e por cerca de 50 km de distância.

Um padrão similar foi observado por Carlsson *et al.* (1999) em amostras de *Salmo trutta* coletadas em uma drenagem europeia. Utilizando marcadores microsatélites eles encontraram maiores diferenciações entre as amostras da calha principal de um ribeirão e um tributário do que entre amostras na calha principal separadas por uma cascata. Na região Neotropical, Paiva *et al.* (2006) aplicaram marcadores PCR-RAPD em amostras de *Astyanax bimaculatus* da

bacia do rio Doce e observaram que, mesmo existindo cascatas entre todas as amostras, as maiores diferenças se encontravam entre amostras da calha principal e tributários.

Os resultados apresentados por T6 corroboram a relação entre o baixo fluxo gênico e o sedentarismo de *G. brasiliensis*. A análise bayesiana de fluxo gênico indicou que 86,5% da diversidade genética de T6 resultam de não migrantes, além disso, a amostra não apresenta contribuições para nenhuma das amostras do rio. Considerando a disposição geográfica dos trechos e a presença do barramento entre T4 e T5, a amostra T5 foi a única a contribuir com mais de 5% de migração para T6, sugerindo uma tendência de fluxo gênico unidirecional do rio para o ribeirão. Este indicativo é reforçado pela presença de sete alelos microssatélites privados e um haplótipo mitocondrial restrito em T6 (H3).

A estrutura genética e o padrão de fluxo gênico da amostra T6, somado ao excesso de heterozigozidade inferidos pela análise de *bottlenecks* recentes, sugerem uma maior extensão de T6 dentro do ribeirão do Penacho, ou seja, a diversidade genética de T6 é mais influenciada por outras áreas do ribeirão do que pelo rio, o que possivelmente mantêm os níveis de estrutura e diversidade genética da amostra. Embora os resultados indiquem que o ribeirão contribui muito pouco para a diversidade genética da calha principal do rio, considerando a bacia como um todo, pode-se observar que estes ambientes são verdadeiros reservatórios de diversidade, mantendo alelos e haplótipos exclusivos.

CONCLUSÕES

Com base nos resultados desta análise pode-se observar que *G. brasiliensis* apresenta uma variabilidade genética abaixo da reportada para outras espécies da ictiofauna de água doce Neotropical, o que possivelmente está relacionado a aspectos biológicos particulares da espécie (principalmente sedentarismo e cuidado parental). Um possível gargalo genético resultou no declínio da variabilidade genética de uma das amostras do rio (T2), enquanto que a amostra coletada em tributário do rio Laranjinha apresentou os maiores níveis de variabilidade, destacando a importância destes ambientes como reserva de diversidade genética. Foi também evidenciada a importância de se trabalhar com marcadores de diferentes naturezas e origens, possibilitando afirmar com maior clareza se os dados

obtidos realmente se tratam do padrão de distribuição da diversidade genética de uma espécie, e não o padrão de um gene ou um marcador.

Apesar de ser considerada uma espécie sedentária, os resultados indicam que existe fluxo gênico ao longo da bacia e que, possivelmente, esse é mantido a partir do modelo de dispersão *Stepping-Stone*. A análise da estrutura genética evidenciou a formação de três grupos entre as amostras, indicando que o padrão de distribuição da diversidade genética proposto é interrompido pela presença de barreiras naturais ou artificiais (barragem em T5 e a posição geográfica T6, fora da calha principal do rio), ou em decorrência de eventos demográficos (possível gargalo genético em T2).

A diversidade genética de *G. brasiliensis* está distribuída ao longo de toda a área amostral analisada, e a preservação de áreas restritas certamente não seria suficiente para se preservar toda a diversidade genética desta espécie. O baixo deslocamento apresentado por esta espécie faz com que ambientes mais isolados contenham particular riqueza de alelos e haplótipos que não compartilham com o restante do rio. Apesar da pequena estruturação entre alguns pontos, é importante considerá-los como unidades diferentes em futuros programas de manejo.

AGRADECIMENTOS

Somos gratos a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de estudos para D.G. Ferreira e o apoio financeiro a esta pesquisa, ao Dr Oscar Akio Shibatta (Universidade Estadual de Londrina), por sua valiosa ajuda na identificação da espécie estudada e ao IBAMA/SISBIO e IAP pela permissão para as coletas de peixes.

REFERÊNCIAS

- Abelha M.C.F., Goulart E. (2004) Oportunismo trófico de *Geophagus brasiliensis* (Quoy & Gaimard, 1824) (Osteichthyes, Cichlidae) no reservatório de Capivari, Estado do Paraná, Brasil. *Acta Scientiarum*, **26**, 37-45.
- Abreu M.M., Pereira L.H.G., Vila V.B., Foresti F. & Oliveira C. (2009) Genetic variability of two populations of *Pseudoplatystoma reticulatum* from the Upper Paraguay River Basin. *Brazilian Journal of Biology*, **69**, 681-689.

- Adamson E.A.S., Hurwood D.A. & Mather P.B. (2012) Insights into historical drainage evolution based on the phylogeography of the chevron snakehead fish (*Channa striata*) in the Mekong Basin. *Freshwater Biology*, **57**, 2211–2229.
- Agostinho A.A., Thomaz, S.M., & Gomes, L.C. (2005) Conservação da biodiversidade em águas continentais do Brasil. *Megadiversidade*, **1**, 70-78.
- Agostinho A.A., Gomes L.C., Fernandes D.R., Suzuki H.I. & Júlio Jr H.F. (2003) Migratory fishes of the upper Paraná River Basin, Brazil. In: *Migratory fishes of South America: biology, fisheries and conservation status* (Eds Carolsfeld, B. Harvey, C. Ross & A. Baer), pp. 19-98. British Columbia, World Fisheries Trust, Canada.
- Alacs E.A., Spencer P.B.S., Tores P.J. & Krauss S.L. (2011) Population genetic structure of island and mainland populations of the quokka, *Setonix brachyurus* (Macropodidae): a comparison of AFLP and microsatellite markers. *Conservation Genetics*, **12**, 297–309.
- Albert J.S. & Reis R.E. (2011) *Historical Biogeography of Neotropical Freshwater Fishes*. University of California Press, Berkeley.
- Allan J.D. & Flecker A.S. (1993) Biodiversity conservation in running waters. *Bioscience*, **43**, 32–43.
- Allendorf F.W., Luikart G.H. & Aitken S.N. (2012) *Conservation and the Genetics of Populations*. 2 ed. Wiley, Blackwell Publishing.
- Almeida F.S., Fungaro M.H.P. & Sodr e L.M.K. (2001) RAPD and isoenzyme analysis of genetic variability in three allied species of catfish (Siluriformes: Pimelodidae) from the Tibagi River. *Brazil. Journal of Zoology (London)*, **253**, 113-120.
- Almeida F.S., Sodr e L.M.K. & Contel E.P.B. (2003) Population structure analysis of *Pimelodus maculatus* (Pisces, Siluriformes) from the Tiet e and Paranapanema rivers (Brazil). *Genetics and Molecular Biology*, **26**, 301-305.
- Altschul S.F., Gish W., Miller W., Myers E.W. & Lipman D.J. (1990) Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, **215**, 403-410.
- Araújo F.G. & Santos L.N. (2001). Distribution of fish assemblages in Lajes reservoir, Rio de Janeiro, Brazil. *Brazilian Journal of Biology*, **61**, 563-576.
- Avise J.C. (2004) *Molecular markers, natural history, and evolution*. 2nd ed. Sinauer Associates. Sunderland (Massachusetts).

- Baer C.F. (1998) Population structure in a south-eastern US freshwater fish, *Heterandrianformosa*. II. Gene flow and biogeography within the St. Johns River drainage. *Heredity*, **81**, 404–411.
- Balian E.V., Lévêque C., Segers H. & Martens K. (2008) The freshwater animal diversity assessment: an overview of the results. *Hydrobiologia*, **595**, 627–637.
- Balloux F. & Lugon-Moulin N. (2002) The estimation of population differentiation with microsatellite markers. *Molecular Ecology*, **11**, 155–165.
- Bandelt H.J., Forster P. & Röhl, A. (1999) Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*, **16**, 37- 48.
- Barluenga M., Lting K.S., Salzburger W., Muschick M. & Meyer A. (2006) Sympatric speciation in Nicaraguan crater lake cichlid fish. *Nature*, **439**, 719- 723.
- Barreto F.S. & Mccartney M.A. (2007) Extraordinary AFLP fingerprint similarity despite strong assortative mating between reef fish color morphospecies. *Evolution*, **62**, 226–233.
- Barroso R.M., Hilsdorf A.W.S., Moreira H.L.M., Cabello P.H. & Traub-Cseko Y. (2005). Genetic diversity of wild and cultured populations of *Bryconopalinus* (Cuvier, 1819) (Characiforme, Characidae, Bryconiae) using microsatellites. *Aquaculture*, **247**, 51-65.
- Batista J.S. & Alves-Gomes J.A. (2006). Phylogeography of *Brachyplatystoma rousseauxii* (Siluriformes – Pimelodidae) in the Amazon Basin offers preliminary evidence for the first case of “homing” for an Amazonian migratory catfish. *Genetics and Molecular Research*, **5**, 723–740.
- Birky Jr C.W., Maruyama T. & Fuerst P. (1983) An approach to population and evolutionary genetic theory for genes in mitochondria and chloroplasts, and some results. *Genetics*, **103**, 513-527.
- Calcagnotto D. & Desalle R. (2009) Population genetic structuring in pacu (*Piaractusmesopotamicus*) across the Paraná-Paraguay basin: evidence from microsatellites. *Neotropical Ichthyology*, **7**, 607-616.
- Campbell D. & Bernatchez L. (2004) Generic scan using AFLP markers as a means to assess the role of directional selection in the divergence of sympatric Whitefish Ecotypes. *Molecular Biology and Evolution*, **21**, 945–956.
- Carlsson J., Olsen H.K., Nilsson J., Overli O. & Stabell O.B. (1999). Microsatellites reveal fine-scale genetic structure in stream-living brown trout. *Journal of Fish Biology*, **55**, 1290- 1303.

- Carpenter S.R., Stanley E.H. & Vander Zanden M.J. (2011). State of the world's freshwater ecosystems: physical, chemical, and biological changes. *Annual Review of Environment and Resources*, **36**, 75-99.
- Carvalho G.R. (1993) Evolutionary aspects of fish distribution: genetic variability and adaptation. *Journal of Fish Biology*, **43**, 53 - 73.
- Carvalho D.C., Oliveira D.A.A., Sampaio I. & Beheregaray L.B. (2009) Microsatellite markers for the Amazon peacock bass (*Cichla piquiti*). *Molecular Ecology Resources*, **9**, 239–241.
- Carvalho-Costa L.F., Hatanaka T. & Galetti Jr P.M. (2008) Evidence of lack of population substructuring in the Brazilian freshwater fish *Prochilodus costatus*. *Genetics and Molecular Biology*, **31**, 377-380.
- Castro R.M.C., Casatti L., Santos H.F., Ferreira K.M., Ribeiro A.C., Benine R.C., Dardis G.Z.P., Melo A.L.A., Abreu T.X., Bockmann F.A., Carvalho M., Gibran F.Z. & Lima F.C.T. (2003). Estrutura e composição da ictiofauna de riachos do Rio Paranapanema, sudeste e sul do Brasil. *Biota Neotropica*, **3**, <http://www.biotaneotropica.org.br/v3n1/p/abstract?article+BN01703012003>.
- Castro R.M.C., Casatti L., Santos H.F., Melo A.L.A., Martins L.S.F., Ferreira K.M., Gibran F.Z., Benine R.C., Carvalho M., Ribeiro A.C., Abreu T.X., Bockmann F.A., Dardis G.Z.P., Stopiglia R. & Langeani F. (2004). Estrutura e composição da ictiofauna de riachos da bacia do Rio Grande, no Estado de São Paulo, Sudeste do Brasil. *Biota Neotropica*, **4**, <http://www.biotaneotropica.org.br/v4n1/pt/abstract?article+BN0170402004>.
- Castro R.M.C. (1999) Evolução da ictiofauna de riachos sul-americanos: padrões gerais e possíveis causais. In *Ecologia de Peixes de Riachos* (Eds E.P. Caramaschi, R. Mazzoni & N.P.R. Peres) p.139-155. Série Oecologia Brasiliensis, Vol. 6. PPGE-UFRJ. Rio de Janeiro.
- Chong L.K., Tan S.G., Yusoff K. & Siraj S.S. (2000) Identification and Characterization of Malaysian River Catfish, *Mystus nemurus* (C&V): RAPD and AFLP Analysis. *Biochemical Genetics*, **38**, 62-76.
- Coelho, A.S.G. (2001) *Software: Dboot – Avaliação de dendrogramas baseados em estimativas de distâncias/similaridades genéticas através do procedimento de bootstrap Versão 3.0*. Universidade Federal de Goiás, Goiânia.

- Cornuet J.M. & Luikart G. (1996) Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data. *Genetics*, **144**, 2001-2014.
- Crawford N. (2010) SMOGD: software for the measurement of genetic diversity. *Molecular Ecology Resources*, **10**, 556–557.
- Cronin M.A., Spearman W.J., Wilmot R.L. & Patton J.C. (1993). Mitochondrial DNA variation in chinook (*Oncorhynchus tshawytscha*) and chum salmon (*O. keta*) detected by restriction enzyme analysis of polymerase chain reaction (PCR) products. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, **50**, 708-715.
- David L., Rajasekaran P., Fang J., Hillel J. & Lavi U. (2001) Polymorphism in ornamental and common carp strains (*Cyprinus carpio* L.) as revealed by AFLP analysis and a new set of microsatellite markers. *Molecular Genetics and Genomics*, **266**, 353 – 362.
- Dergam J.A., Paiva S.R., Schaeffer C.E., Godinho A.L. & Vieira F. (2002) Phylogeography and RAPD-PCR variation in *Hoplias malabaricus* (Bloch, 1794) (Pisces, Teleostei) in southeastern Brazil. *Genetics and Molecular Biology*, **25**, 379-387.
- DeWoody J.A. & Avise J.C. (2000) Microsatellite variation in marine, freshwater and anadromous fishes compared with other animals. *Journal of Fish Biology*, **56**, 461–473.
- Dudgeon D., Arthington A.H., Gessner M.O., Kawabata Z.I., Knowler D.J., Lévêque C., Naiman R.J., Prieur-Richard A.H., Soto D., Stiassny M.L.J. & Sullivan C.A. (2006) Freshwater biodiversity: importance, threats, status and conservation challenges. *Biological Reviews*, **81**, 163–182.
- Earl D.A. & VonHoldt B.M. (2011) Structure Harvester: a website and program for visualizing structure output and implementing the Evanno method. *Conservation Genetics Resources* DOI: 10.1007/s12686-011-9548-7. <http://taylor0.biology.ucla.edu/structureHarvester/>.
- Esteves K.E. & Aranha J.M.R. (1999) Ecologia trófica de peixes de riachos. In *Ecologia de Peixes de Riachos* (Eds E.P. Caramaschi, R. Mazzone & N.P.R. Peres), pp. 157-182. Série Oecologia Brasiliensis, vol. 6. PPGE-UFRJ. Rio de Janeiro.

- Estoup A. & Angers B. (1998) Microsatellites and minisatellites for molecular ecology: theoretical and experimental considerations, p.55- 86, 1998 In: *Advances in molecular ecology* (Carvalho G., ed.), pp. 55-86. NATO Press, Amsterdam.
- Evanno G., Regnaut S. & Goudet J. (2005) Detecting the number of clusters of individuals using the software structure: a simulation study. *Molecular Ecology*, **14**, 2611–2620.
- Excoffier L., Smouse P.E., & Quattro J.M. (1992) Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics*, **131**, 479-491.
- Excoffier L.G., Laval A. & Schneider S. (2005) Arlequin ver 3.1: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online*, **1**, 47-50.
- Ferguson A., Taggart J.B., Prodöhl P.A., Mcmeel O., Tompson C., Stone C., McGinnity P. & Hynes R. A. (1995) The application of molecular markers to the study and conservation of fish population, with special reference *Salmo*. *Journal of Fish Biology*, **47**, 103 – 126.
- Frankham R., Ballou J.D. & Briscoe D.A. (2010) *Introduction to conservation genetics*. 2nd ed. Cambridge University Press, Cambridge.
- Freeland J.R. (2005) *Molecular Ecology*. John Wiley & Sons Ltd, England.
- Fu Y.X. (1997). Statistical test of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics*, **147**, 915–925.
- Garcez R., Calcagnotto D. & Almeida-Toledo L.F. (2011) Population structure of the migratory fish *Prochilodus lineatus* (Characiformes) from Rio Grande basin (Brazil), an area fragmented by dams. *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems*, **21**, 268-275.
- Gaudeul M., Till-Bottraud I., Barjon F. & Manel S. (2004) Genetic diversity and differentiation in *Eryngium alpinum* L. (Apiaceae): comparison of AFLP and microsatellite markers. *Heredity*, **92**, 508–518.
- Geist J. (2011) Integrative freshwater ecology and biodiversity conservation. *Ecological Indicators*, **11**, 1507–1516.
- Giang L.H., Hong P.N., Tuan M.S. & Harada K. (2003) Genetic variation of *Avicennia marina* (Forsk.) Vierh. (Avicenniaceae) in Vietnam revealed by microsatellite and AFLP markers. *Genes and Genetic Systems*, **78**, 399–407.

- Gondim S.G.C.A., Resende L.V., Brondani R.P.V., Collevatti R.G., Silva-Júnior N.J., Pereira R.R. & Telles M.P.C. (2010) Development of microsatellite markers for *Hoplias malabaricus* (Erythrinidae). *Genetics and Molecular Research*, **9**, 1513-1517.
- Goudet J. (2001) *FSTAT, a Program to Estimate and Test Gene Diversities and Fixation Indices* Version 2.9.3. Available from www.unil.ch/izea/software/fstat.html
- Hall T.A. (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, **41**, 95-98.
- Hartl D.L. & Clark A.G. (2010) *Princípios de genética de populações*. Artmed, Porto Alegre.
- Hatanaka T., Silva F.H. & Galetti Jr P.M. (2006) Population substructuring in a migratory freshwater fish *Prochilodus argenteus* (Characiformes, Prochilodontidae) from the São Francisco River. *Genetica*, **126**, 153-159.
- Horai S. & Hayasaka K. (1990) Intraspecific nucleotide sequence differences in the major noncoding region of human mitochondrial DNA. *American Journal of Human Genetics*, **46**, 828-842.
- Hrbek T., Crossa M. & Farias I.P. (2007) Conservation strategies for *Arapaima gigas* (Schinz, 1822) and the Amazonian várzea ecosystem. *Brazilian Journal of Biology*, **67**, 909-917.
- Hughes J.M., Schmidt D.J. & Finn D.S. (2009) Genes in streams: using DNA to understand the movement of freshwater fauna and their riverine habitat. *BioScience*, **59**, 573-583.
- Hurt C. & Hedrick P.W. (2004) Conservation genetics in aquatic species. General approaches and case studies in fishes and springsnails of arid lands. *Aquatic Sciences*, **66**, 402-413.
- Jain S.M., Al-Khayri J.M. & Johnson D.V. (2011) *Date palm biotechnology*. Springer, Dordrecht.
- Jost L. (2008) GST and its relatives do not measure differentiation. *Molecular Ecology*, **17**, 4015-4026.
- Jost L. (2009). D vs. GST: response to Heller and Siegismund (2009) and Ryman and Leimar (2009). *Molecular Ecology*, **18**: 2088-2091.

- Kalinowski S.T. (2005) Do polymorphic locos require large sample sizes to estimate genetic distances? *Heredity*, **94**, 33–36.
- Keeney D.B., Heupel M.R., Hueter R.E. & Heist E.J. (2005) Microsatellite and mitochondrial DNA analyses of the genetic structure of blacktip shark (*Carcharhinus limbatus*) nurseries in the northwestern Atlantic, Gulf of Mexico, and Caribbean Sea. *Molecular Ecology*, **14**, 1911–1923.
- Kimura M. & Weiss G.H. (1964) Stepping stone model of population structure and the decrease of genetic correlation with distance. *Genetics*, **49**, 561–576.
- Kocher T.D., Lee W.J., Sobolewska H., Penman D. & Mcandrew B. A. (1998) Genetic Linkage Map of a Cichlid Fish, the Tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Genetics*, **148**, 1225–1232.
- Kullander S.O. (2003) Family Cichlidae (Cichlids). In: *Check list of the freshwater fishes of South and Central America* (Eds R.E. Reis, S.O. Kullander & C.J. Ferraris Jr), pp. 605–654. EDIPUCRS, Porto Alegre.
- Lamphere B.A. & Blum M.J. (2012) Genetic estimates of population structure and dispersal in a benthic stream fish. *Ecology of Fresh Water Fish*, **21**, 75–86.
- Leuzzi M.S.P., Almeida F.S., Orsi M.L. & Sodr e L.M.K. (2004) Analysis by RAPD of the genetic structure of *Astyanax altiparanae* (Pisces, Characiformes) in reservoirs on the Paranapanema River, Brazil. *Genetics and Molecular Biology*, **27**, 355–362.
- L ev eque C., Oberdorff T., Paugy D., Stiassny M.L.J. & Tedesco P.A. (2008) Global diversity of fish (Pisces) in freshwater. *Hydrobiologia*, **595**, 545–567.
- Librado P. & Rozas J. (2009) DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*, **25**, 1451–1452.
- Lima M.P., Campos T., Sousa A.C.B., Souza A.P. & Almeida-Val V.M.F. (2010) Isolation and characterization of microsatellite markers for *Cichla monoculus* (Agassiz, 1831), an important freshwater fish in the Amazon. *Conservation Genetics Resources*, **2**, 215–218.
- Liu Y.G., Chen S.L., Li B.F., Wang Z.J. & Liu Z.J. (2005) Analysis of genetic variation in selected stocks of hatchery flounder, *Paralichthys olivaceus*, using AFLP markers. *Biochemical Systematics and Ecology*, **33**, 993–1005.
- Liu Z., Karsi A., Li P., Cao D. & Dunham R. (2003) An AFLP-Based Genetic Linkage Map of Channel Catfish (*Ictalurus punctatus*) Constructed by Using an Interspecific Hybrid Resource Family. *Genetics*, **165**, 687–694.

- Liu Z.J. (2005) Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP). In: *Stock identification methods: applications in fishery science* (Eds S.X. Cadrin, K.D. Friedland & J. R. Waldman), pp. 389-411. Elsevier Academic Press, Oxford.
- Liu Z.J. (2007) *Aquaculture genome technologies*. Blackwell Publishing, Ames.
- Lopes C.M., Almeida F.S., Orsi M.L., Britto S.G.C., Sirol R.N. & Sodr e L.M.K. (2007) Fish passage ladders from Canoas Complex – Paranapanema River: evaluation of genetic structure maintenance of *Salminus brasiliensis* (Teleostei: Characiformes). *Neotropical Ichthyology*, **5**, 131-138.
- Lowe T.M. & Eddy S.R. (1997) "tRNAscan-SE: A program for improved detection of transfer RNA genes in genomic sequence". *Nucleic Acids Research*, **25**, 955 – 964.
- Lowe-McConnell R.H. (1991) Ecology of cichlids in South American and African waters, excluding the African Great Lakes. In: *Cichlid fishes behavior, ecology, and evolution* (Ed M.H.A Keenleyside), pp. 60–85. Chapman and Hall, London.
- Luiz E.A., Agostinho A.A., Gomes L.C. & Hahn N.S. (1998) Ecologia trófica de peixes em dois riachos da bacia do rio Paraná. *Revista Brasileira de Biologia*, **58**, 273-285.
- Maack R. (2002) *Geografia Física do Estado do Paraná*. 3^a ed. Imprensa Oficial, Curitiba.
- Maltagliati F. (1999) Genetic divergence in natural populations of the Mediterranean killifish *Aphanius fasciatus*. *Marine Ecology Progress Series*, **179**, 155–162.
- Mantel N. (1967) The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Research*, **27**, 209–220.
- Mariette S., Chagn  D., L zier C., Pastuszka P., Raffin A., Plomion C. & Kremer A. (2001) Genetic diversity within and among *Pinuspinaster* populations: comparison between AFLP and microsatellite markers. *Heredity*, **86**, 469–479.
- Martins C., Wasko A. P., Oliveira C. & Foresti F. (2003) Mitochondrial DNA variation in wild populations of *Leporinus elongatus* from the Paraná River basin. *Genetics and Molecular Biology*, **26**, 33-38.
- Massa-Gallucci A., Coscia I., O’Grady M., Kelly-Quinn M. & Mariani S. (2010) Patterns of genetic structuring in a brown trout (*Salmo trutta* L.) metapopulation. *Conservation Genetics*, **11**, 1689–1699.
- Matoso D.A., Martins C., Artoni R.F. & Galetti Jr P.M. (2010) Preliminary qualitative analysis on DNAmT in *Astyanax fasciatus* populations Cuvier, 1819 (Teleostei,

- Characidae) indicate population distinctiveness. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, **53**, 663 – 667.
- 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**, 395-402.
- McCusker M.R. & Bentzen P. (2010) Positive relationship between genetic diversity and abundance in fishes. *Molecular Ecology*, **19**, 4852–4862.
- Meffe G.K. & Vrigenhoek R.C. (1988) Conservation genetics in the management of desert fishes. *Conservation Biology*, **2**, 157-169.
- Meirmans P.G. & Hedrick P.W. (2011) Assessing population structure: FST and related measures. *Molecular Ecology Resources*, **11**, 5–18.
- Menezes N., Weitzman S.H., Oyakawa O., Lima F.C.T., Castro R.M.C. & Weitzman M.J. (2007) *Peixes de água doce da bacia da Mata Atlântica. Lista Preliminar de Espécies e Comentários Sobre Conservação de Peixes de Água Doce Neotropicals*. Museu de Zoologia: Universidade de São Paulo, São Paulo.
- Meyer A., Kocher T.D., Basasibwaki P. & Wilson A.C. (1990) Monophyletic origin of Lake Victoria cichlid fishes suggested by mitochondrial DNA sequences. *Nature*, **347**, 550-553.
- Mickett K., Morton C., Feng J., Li P., Simmons M., Dunham R.A., Cao D. & Liu Z.J. (2003) Assessing genetic diversity of domestic populations of channel catfish (*Ictalurus punctatus*) in Alabama using AFLP markers. *Aquaculture*, **228**, 91–105.
- Miller, M.P. (1997) Tools for population genetic analyses (TFPGA): a Windows program for the analysis of allozyme and molecular population genetic data. Ver. 1.3. Available via <http://bioweb.usu.edu/mpmbio>.
- Montoya-Burgos J.I. (2003) Historical biogeography of the catfish genus *Hypostomus* (Siluriformes: Loricariidae), with implications on the diversification of Neotropical ichthyofauna. *Molecular Ecology*, **12**, 1855–1867.
- Moysés C.B. & Almeida-Toledo L.F. (2002) Restriction fragment length polymorphisms of mitochondrial DNA among five freshwater fish species of the genus *Astyanax* (Pisces, Characidae). *Genetics and Molecular Biology*, **25**, 401-408.

- Nei M. (1975) *Molecular population genetics and evolution*. North Holland, U.K: Oxford.
- Nei M. (1978) Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics*, **89**, 583– 590.
- Nelson J.S. (2006) *Fishes of the world*. 4th ed. John Wiley and Sons, New York.
- O'connell M. & Wright J.M. (1997) Microsatellite DNA in fishes. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, **7**, 331–363.
- Paiva S.R., Dergam J.A. & Machado F. (2006) Determining management units in southeastern Brazil: the case of *Astyanax bimaculatus* (Linnaeus, 1758) (Teleostei: Ostariophysi: Characidae). *Hydrobiologia*, **560**, 393-404.
- Palstra F.P., O'Connell M.F. & Ruzzante D.E. (2007) Population structure and gene flow reversals in Atlantic salmon (*Salmo salar*) over contemporary and long-term temporal scales: effects of population size and life history. *Molecular Ecology*, **16**, 4504–4522.
- Pereira L.H.G., Foresti F. & Oliveira O. (2009) Genetic structure of the migratory catfish *Pseudoplatystoma corruscans* (Siluriformes: Pimelodidae) suggests homing behavior. *Ecology of Freshwater Fish*, **18**, 215–225.
- Peres D.P., Renesto E., Lapenta A.S. & Zawadzki C.H. (2002) Genetic variability in *Hoplias malabaricus* (Osteichthyes: Erythrinidae) in fluvial and lacustrine environments in the upper Paraná river floodplain (Paraná State, Brazil). *Biochemical Genetics*, **40**, 209-223.
- Philippsen J.S., Renesto E., Geahl A.M., Artoni R.F., Shibatta O.A. & Zawadzki C.H. (2009) Genetic variability in four samples of *Neoplecostomus yapo* (Teleostei: Loricariidae) from the Paranapanema basin, Brazil. *Neotropical Ichthyology*, **7**, 25–30.
- Piorski N.M., Sanches A., Carvalho-Costa L.F., Hatanaka T., Carrillo-Avila M., Freitas P.D. & Galetti Jr, P.M. (2008) Contribution of conservation genetics in assessing neotropical freshwater fish biodiversity. *Brazilian Journal of Biology*, **68**, 1039-1050.
- Piry S., Luikart G. & Cornuet J.M. (1999) BOTTLENECK: a computer program for detecting recent reductions in the effective population size using allele frequency data. *Journal of Heredity*, **90**, 502-503.
- Pritchard J.K., Stephens M. & Donnelly P. (2000) Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, **155**, 945–959.

- Pruett C.L. & Winker K. (2008) The effects of sample size on population genetic diversity estimates in song sparrows *Melospiza melodia*. *Journal of Avian Biology*, **39**, 252–256.
- Raymond M. & Rousset M. (1995) Genepop (version 1.2): Population genetics software for exact tests and ecumenicism. *Journal of Heredity*, **86**, 248-249.
- Reis R.E., Kullander S.O., Ferraris-Jr C.J. (2003) *Check list of the freshwater fishes of South and Central America*. EDIPUCRS, Porto Alegre.
- Ribolli J., Melo C.M.R. & Zaniboni-Filho E. (2012) Genetic characterization of the Neotropical catfish *Pimelodus maculatus* (Pimelodidae, Siluriformes) in the Upper Uruguay River. *Genetics and Molecular Biology*, **35**. Available from <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_Arttext&pid=S1415-47572012000500009&lng=en&nrm=iso>. access on 31 Jan. 2013. Epub Oct 02, 2012.
- Rice W.R. (1989) Analyzing tables of statistical tests. *Evolution*, **43**, 223-225.
- 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**, 889-895.
- Santos M.C.F., Ruffino M.L. & Farias I.F. (2007) High levels of genetic variability and panmixia of the tambaqui *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1816) in the main channel of the Amazon River. *Journal of Fish Biology*, **71**, 33–44.
- Schuelke M. (2000) An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. *Nature Biotechnology*, **18**, 223-234.
- Shibatta O.A. & Silva-Souza A.T. (2008) Fish, Ribeirão do Feijão basin, São Carlos, São Paulo, Brazil. *CheckList*, **4**, 75–78.
- Sivasundar A., Bermingham E. & Ortí G. (2001) Population structure and biogeography of migratory freshwater fishes (*Prochilodus*: Characiformes) in major South American rivers. *Molecular Ecology*, **10**, 407–417.
- Slatkin M. (1987) Gene flow and the geographic structure of Communicating editor: G. B. Golding natural populations. *Science*, **236**, 787–792.
- Slatkin M. (1995) A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies. *Genetics*, **139**, 457-462.
- Sofia S.H., Silva C.R.M., Galindo B.A., Almeida F.S., Sodré L.M.K. & Martinez C.B.R. (2006) Population genetic structure of *Astyanax scabripinis* (Teleostei, Characidae) from an urban stream. *Hydrobiologia*, **553**, 245-254.

- Sofia S.H., Galindo B.A., Paula F.M., Sodr , L.M.K. & Martinez C.B.R. (2008) Genetic diversity of *Hypostomus ancistroides* (Teleostei, Loricariidae) from an urban stream. *Genetics and Molecular Biology*, **31**, 317-323.
- Sol -Cava A.J & Cunha H.A. A genética e a conserva o da natureza. In: In: *Biologia Molecular e Evolu o* (Eds S.R Matioli & F.M.C. Fernandes), pp. 217-238. Holos, Ribeirão Preto.
- Strayer D.L. & Dudgeon D. (2010) Freshwater biodiversity conservation: recent progress and future challenges. *Journal of the North American Benthological Society*, **29**, 344–358
- Sullivan J.P., Lavoue S., Arnegard M.E. & Hopkins, C.D. (2004) AFLPs Resolve Phylogeny and Reveal Mitochondrial Introgression Within a Species Flock of African Electric Fish (Mormyroidea: Teleostei). *Evolution*, **58**, 825–841.
- Sunnucks P. (2000) Efficient genetic markers for population biology. *Trends in Ecology and Evolution*, **15**, 199-203.
- Tajima F. (1989) Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics*, **123**, 585–595.
- Teixeira T.P., Pinto B.C.T., Terra B.F., Estiliano E.O., Gracia D. & Araújo F.G. (2005) Diversidade das assembleias de peixes nas quatro unidades geográficas do rio Paraíba do Sul. *Iheringia*, **95**, 347-357.
- Telles M.P.C., Resende L.V., Brondani R.P.V., Collevatti R.G., Costa M.C. & Silva Júnior, N.J. (2010) Isolation and characterization of microsatellite markers in the armored catfish *Hypostomus gymnorhynchus* (Loricariidae). *Genetics and Molecular Research*, **9**, 1770-1774.
- Templeton A.R. (2011) *Genética de popula es e teoria microevolutiva*. Sociedade Brasileira de Genética-SBG, Ribeirão Preto.
- Terencio M.L., Schneider C.H. & Porto J.I.R. (2012) Molecular signature of the D-loop in the brown pencilfish *Nannostomus eques* (Characiformes, Lebiasinidae) reveals at least two evolutionary units in the Rio Negro basin, Brazil. *Journal of Fish Biology*, **81**, 110–124.
- Thompson J. D., Higgins D. G. & 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.

- Togawa R.C. & Brigido M.M. (2003) Phph: *Web based tool for simple electropherogram quality analysis*. 1st International Conference on *Bioinformatics and Computational Biology*, Ribeirão Preto.
- Van Oosterhout C., Hutchinson W.F., Wills D.P.M. & Shipley P.F. (2004) Micro-Checker: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes*, **4**, 535-538.
- Vazzoler A.E.M., Soares, L.S.H. & Cunningham, P. M. (1999) Ictiofauna da Costa Brasileira. In: *Estudos Ecológicos de Comunidades de Peixes Tropicais* (Ed R.C. LOWE McCONNELL) p. 424-467. EDUSP, São Paulo.
- Vieira D.B. & Shibatta O.A. (2007) Peixes como indicadores da qualidade ambiental do ribeirão Esperança, município de Londrina, Paraná, Brasil. *Biota Neotropica*, **7**, 57-65.
- Vrijenhoek R.C. (1998) Conservation genetics of freshwater fish. *Journal of Fish Biology*, **53**, 394-412.
- Wang Z., Jayasankar P., Khoo S.K., Nakamura K., Sumantadinata K., Carman O. & Okamoto, N. (2000) AFLP Fingerprinting Reveals Genetic Variability in Common Carp Stocks from Indonesia. *Asian Fisheries Science*, **13**, 139-147.
- Ward R.D. (2002) Genetics of Fish Populations. in: *Handbook of Fish Biology and Fisheries* (Eds P.J.B Hart & J. D. Reynolds), pp. 200 – 224. Fish biology, Vol. 1. Blackwell Publishing Company, Leicester.
- Weir B.S. & Cockerham C.C. (1984) Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution*, **38**, 1358-1370.
- Wilson G.A. & Rannala B. (2003) Bayesian inference of recent migration rates using multilocus genotypes. *Genetics*, **163**, 1177–1191.
- Wilson A.C., Cann R.L., Carr S.M., George M.Jr., Gyllensten U.B., Helm-Bychowski K.M., Higuchi R.G., Palumbi S.R., Prager E.M., Sage R.D. & Stoneking M. (1985) Mitochondrial DNA and two perspectives on evolutionary genetics. *Biological Journal of the Linnean Society*, **26**, 375-400.
- Winemiller K.O. (1989) Patterns of variation in life history among South American fishes in seasonal environments. *Oecologia*, **81**, 225–241.
- Wright S. (1978) *Evolution and the genetics of populations*. University of Chicago, Chicago.

- Yeh F.C., Yang R., Boyle T.J. & Xiyan J.M. (2000) Pop Gene 32. *Microsoft Window-based freeware for population genetic analysis, v.1.32*. Molecular Biology and Biotechnology Center, University of Alberta, Edmonton, Alberta.
- Young, A., Boshier, D. & Boyle T. (2000) *Forest Conservation Genetics: Principles and Practice*: CSIRO Publishing, Collingwood.
- Zane L., Bargelloni L. & Patarnello, T. (2002) Strategies for microsatellite isolation: A review. *Molecular Ecology*, **11**, 1-16.
- Zawadzki C.H., Renesto E. & Bini L.M. (1999) Genetic and morphometric analysis of three species of the genus *Hypostomus* Lacépède, 1803 (Osteichthyes: Loricariidae) from the Rio Iguazu basin (Brazil). *Revue Suisse de Zoologie*, **106**, 91-105.
- Zawadzki C.H., Renesto E., Reis R.E., Moura M.O. & Mateus R.P. (2005) Allozyme relationships in hypostomines (Teleostei: Loricariidae) from the Itaipu reservoir, Upper Rio Paraná basin, Brazil. *Genetica*, **123**, 271-283.

5 CONCLUSÕES GERAIS

- A metodologia empregada para isolar os locos microssatélites em *Geophagus brasiliensis*, utilizando bibliotecas enriquecidas, se mostrou eficiente, permitindo desenvolver 14 pares de *primers* com boa aplicabilidade em estudos populacionais da espécie e de espécies relacionadas.
- As análises populacionais revelaram que *G. brasiliensis* apresenta variabilidade genética abaixo da reportada para outras espécies da ictiofauna Neotropical.
- Os níveis de diversidade genética apresentados para a amostra do ribeirão foram maiores que o observado em todas as outras amostras da calha principal do rio Laranjinha, destacando uma possível importância que estes pequenos tributários podem representar como depósito de biodiversidade genética.
- Os três marcadores corroboraram um padrão comum de diferenciação, detectando estrutura genética significativa entre as amostras de *G. brasiliensis* na bacia do rio Laranjinha.
- A maior parte dos resultados sugere que, embora a espécie seja sedentária, algum fluxo gênico pode ser mantido entre as amostras da calha principal, possivelmente a partir do modelo de dispersão *Stepping Stone*. Contudo, em virtude de um evento demográfico, algumas das amostras não estão em concordância com este padrão. Além de eventos demográficos, os resultados demonstram interferências de fatores geológicos e antrópicos (barramento) sobre o padrão de estruturação genética da espécie.
- Os resultados apresentados neste trabalho demonstram que a diversidade genética de *G. brasiliensis* se encontra distribuída de modo heterogêneo ao longo da bacia do rio Laranjinha, e para que possam ser tomadas futuras ações de manejo e conservação que visem a preservação da maior quantidade de diversidade genética possível, todos os trechos devem ser considerados como unidades independentes, detentoras de parte da diversidade genética da espécie na bacia.

REFERÊNCIAS

- ABELHA, M.C.F.; GOULART, E. Oportunismo trófico de *Geophagus brasiliensis* (Quoy & Gaimard, 1824) (Osteichthyes, Cichlidae) no reservatório de Capivari, Estado do Paraná, Brasil. **Acta Scientiarum. Biological Sciences Maringá**, v.26, n.1, p.37-45. 2004.
- ABREU, M.M.; PEREIRA, L.H.G.; VILA, V.B.; FORESTI, F.; OLIVEIRA, C. Genetic variability of two populations of *Pseudoplatystoma reticulatum* from the Upper Paraguay River Basin. **Genetics and Molecular Biology**, v.32, p.868–873. 2009.
- AGOSTINHO, A.A.; THOMAZ, S.M.; GOMES, L.C. Conservação da biodiversidade em águas continentais do Brasil. **Megadiversidade**, v.1, p.70-78. 2005.
- AGOSTINHO, A.A.; BENEDITO-CECILIO, E. **Situação atual e perspectivas da ictiologia no Brasil**. Maringá, editora da UEM, 1992. 128p.
- AGOSTINHO, A.A.; GOMES L.C.; PELICICE, F.M. **Ecologia e manejo dos recursos pesqueiros em reservatórios do Brasil**. Maringá, EDUEM, 2007. 501p.
- ALBERT, J.S.; REIS, R.E. **Historical Biogeography of Neotropical Freshwater Fishes**. University of California Press: Berkeley, CA, USA. 2011. 388p.
- ALLAN, J.D.; FLECKER, A.S. Biodiversity conservation in running waters. **BioScience**, v.43, p.32–43. 1993.
- ALMEIDA, F.S.; SODRE, L.M.K.; CONTEL, E.P.B. Population structure analysis of *Pimelodus maculatus* (Pisces, Siluriformes) from the Tietê and Paranapanema rivers (Brazil). **Genetics and Molecular Biology**, v.26, n.3, p.301-305. 2003.
- ANDERSON, S.; BANKIER, A.T.; BARRELL, B.G.; DE BRUIJN, M.H.; COULSON, A.R.; DROUIN, J.; EPERON, I.C.; NIERLICH, D.P.; ROE, B.A.; SANGER, F.; SCHREIER, P.H.; SMITH, A.J.; STADEN, R.; YOUNG, I.G. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. **Nature**, v.290, p.457-465. 1981.
- ARAÚJO, F.G.; SANTOS, L.N. Distribution of fish assemblages in Lajes reservoir, Rio de Janeiro, Brazil. **Brazilian Journal of Biology**, v. 61, p. 563-576. 2001.
- ARAÚJO, R.R.S. **Ecologia trófica e uso do micro-habitat por *Geophagus brasiliensis* (Quoy & Gaimard, 1824) (Actinopterygii, Cichlidae) do Rio Ubatiba, Maricá, RJ**. Dissertação de mestrado, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, UERJ, Rio de Janeiro. 2008. 69p.
- ARIAS, M. C.; INFANTE-MALACHIAS, M E. RFLP: O emprego de enzimas de restrição para detecção de polimorfismos no DNA, p. 143-152. In: MATIOLI, S. R.; FERNANDES, F. M. C. **Biologia Molecular e Evolução** (Eds.). 2ª Ed. Editora Holos / Sociedade Brasileira de Genética, Ribeirão Preto. 2012.
- AVISE, J.C.; NEIGEL, J.E.; ARNOLD, J. Demographic influences on mitochondrial DNA lineage survivorship in animal populations. **Journal of Molecular Evolution**, v.20, p.99-105. 1984.

AVISE, J. C. Mitochondrial DNA and the evolutionary genetics of higher animals. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v.312, p.325-342. 1986.

AVISE, J.C. **Molecular markers, natural history, and evolution**. 2nd ed. Sunderland (Massachusetts): Sinauer Associates. 2004. 684p.

BAGLEY, M.J.; ANDERSON, S.L.; MAY, B. Choice of methodology for assessing genetic impacts of environmental stressors: polymorphism and reproducibility of RAPD and AFLP fingerprints. **Ecotoxicology**, v.10, p.239–244. 2001.

BARBIERI, E. Effect of 2,4-D herbicide (2,4-dichlorophenoxyacetic acid) on oxygen consumption and ammonium excretion of juveniles of *Geophagus brasiliensis* (Quoy & Gaimard, 1824) (Osteichthyes, Cichlidae). **Ecotoxicology**, v.18, p.55–60. 2009.

BARBOSA, A.C.D.R.; CORRÊA, T.C.; GALZERANI, F.; GALETTI JR, P.M.; HATANAKA, T. Thirteen polymorphic microsatellite locos in the Neotropical fish *Prochilodus argenteus* (Characiformes, Prochilodontidae). **Molecular Ecology Notes**, v.6, p.936- 938. 2006.

BARBOSA, A.C.D.R.; GALZERANI, F.; CORRÊA, T.C.; GALETTI JR, P.M.; HATANAKA, T. Description of novel microsatellite locos in the Neotropical fish *Prochilodus argenteus* and cross-amplification in *P. costatus* and *P. lineatus*. **Genetics and Molecular Biology**, v.31, n.1, p.357-360. 2008.

BARLUENGA, M.; LTING, K.S.; SALZBURGER; W.; MUSCHICK, M.; MEYER , A. Sympatric speciation in Nicaraguan crater lake cichlid fish. **Nature**, v.439, n.9, p.719-723. 2006.

BARRETO, F.S.; MCCARTNEY, M.A. Extraordinary AFLP fingerprint similarity despite strong assortative mating between reef fish color morphospecies. **Evolution**, v.62, p.226–233. 2007.

BARROSO, R.M., HILSDORF, A.W.S.; MOREIRA, H.L.M.; MELLO, A.M.; GUIMARÃES, E.F.; CABELLO, P.H; TRAUB-CSEKO, Y.M. Identification and characterization of microsatellites locos in *Brycon opalinus* (Cuvier, 1819) (Characiforme, Characidae, Bryconinae). **Molecular Ecology Notes**, v.3, p.297-298. 2003.

BARROSO, R.M.; HILSDORF, A.W.S.; MOREIRA, H.L.M.; CABELLO, P.H.; TRAUB-CSEKO, Y. Genetic diversity of wild and cultured populations of *Brycon opalinus* (Cuvier, 1819) (Characiforme, Characidae, Bryconinae) using microsatellites. **Aquaculture**, v.247, p.51-65. 2005.

BATISTA, J.S.; ALVES-GOMES, J.A. Phylogeography of *Brachyplatystoma rousseauxii* (Siluriformes – Pimelodidae) in the Amazon Basin offers preliminary evidence for the first case of “homing” for an Amazonian migratory catfish. **Genetics and Molecular Research**, v.5, p.723–740. 2006.

BENINCÁ, C.; RAMSDORF, W.; VICARI, T.; RIBEIRO, C.A.O.; ALMEIDA, M.I.; ASSIS H.C.S.; CESTARI, M.M. Chronic genetic damages in *Geophagus brasiliensis*

exposed to anthropic impact in estuarine lakes at Santa Catarina Coast–Southern of Brazil. **Environmental Monitoring and Assessment**, v.184, p.2045–2056. 2011.

BIGNOTO, T.S.; PRIOLI, A.J.; PRIOLI, S.M.A.P.; MANIGLIA, T.C.; BONI, T.A.; LÚCIO, L.C.; GOMES, V.N.; PRIOLI, R.A.; OLIVEIRA, A.V.; JÚLIO, JR H.F; PRIOLI, L.M. Genetic divergence between *Pseudoplatystoma corruscans* and *Pseudoplatystoma reticulatum* (Siluriformes, Pimelodidae) in the Paraná River Basin. **Brazilian Journal of Biology**, v.69, n.2, p.631-637. 2009.

BILLOTTE, N., LAGODA, P. J, RISTERUCCI, A. M. & BAURENS. F. C. Microsatellite enriched libraries: applied methodology for the development of SSR markers in tropical crops. **Fruits**, v.54, p.277–288. 1999.

BROWNW, M.; GEORGEJ, R.M.; WILSON, A.C. Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.76, p.1967-1971. 1979.

BROWN, W.M. Polymorphisni in mitochondrial DNA of humans as revealed by restriction Mechanisms of evolution in animal mitochondrial DNA. Ann. NY Acad. endonuclease analysis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.77, p.3605-3609. 1980.

BROWNW, M.; PRAGERA, E.M.; WANG, A.; WILSON A.C. Mitochondrial DNA sequences of primates: tempo and mode of evolution. **Journal of Molecular Evolution**, v.18, p.225-239. 1982.

CALCAGNOTTO, D.; DESALLE, R. Population genetic structuring in pacu (*Piaractus mesopotamicus*) across the Paraná-Paraguay basin: evidence from microsatellites. **Neotropical Ichthyology**, v.7, p.607-616. 2009.

CALCAGNOTTO, D.; RUSSELLO, M.; DESALLE, R. Isolation and characterization of microsatellite locos in *Piaractus mesopotamicus* and their applicability in other Serrasalminae fish. **Molecular Ecology Notes**, v.1, p.245-247. 2001.

CAMPBELL, D.; BERNATCHEZ, L. Generic scan using AFLP markers as a means to assess the role of directional selection in the divergence of sympatric whitefish ecotypes. **Molecular Biology and Evolution**, v.21, n.5, p.945–956. 2004.

CARPENTER, S.R.; STANLEY, E.H.; VANDER ZANDEN, M.J. State of the world's freshwater ecosystems: physical, chemical, and biological changes. **Annual Review of Environment and Resources**, v.36, n.1, p.75-99. 2011.

CARRILLO-AVILA, M.; RESENDE, E.K.; MARQUES, D.K.S.; GALETTI JR, P.M. Isolation and characterization of polymorphic microsatellites in the threatened catfish Jaú *Zungaro jahu* (Siluriformes, Pimelodidae). **Conservation Genetics**, v.10, p.1597–1599. 2009.

CARVALHO, G.R. Evolutionary aspects of fish distribution: genetic variability and adaptation. **Journal of Fish Biology**, v.43, p.53 - 73. 1993.

CARVALHO, D.C.; OLIVEIRA, D.A.A.; SAMPAIO, I.; BEHEREGARAY, L.B. Microsatellite markers for the Amazon peacock bass (*Cichla piquiti*). **Molecular Ecology Resources**, v.9, p.239–241. 2009.

CARVALHO-COSTA, L.F.; HATAKANA, T.; GALETTI-JR, P.M. Isolation and characterization of polymorphic microsatellite markers in the migratory freshwater fish *Prochilodus costatus*. **Molecular Ecology Notes**, v.6, p.818-819. 2006.

CARVALHO-COSTA, L.F.; HATANAKA, T.; GALETTI JR, P.M. Evidence of lack of population substructuring in the Brazilian freshwater fish *Prochilodus costatus*. **Genetics and Molecular Biology**, v.31, n.1, p.377-380. 2008.

CASTRO, R.M.C.; CASATTI, L.; SANTOS, H.F.; FERREIRA, K.M.; RIBEIRO, A.C.; BENINE, R.C.; DARDIS, G.Z.P.; MELO, A.L.A.; ABREU, T.X.; BOCKMANN, F.A.; CARVALHO, M.; GIBRAN, F.Z.; LIMA, F.C.T. Estrutura e composição da ictiofauna de riachos do Rio Paranapanema, sudeste e sul do Brasil. **Biota Neotropica**, v.3, n.1, 2003. <http://www.biotaneotropica.org.br/v3n1/p/abstract?article+BN0703012003>.

CASTRO, R.M.C.; CASATTI, L.; SANTOS, H.F.; MELO, A.L.A.; MARTINS, L.S.F.; FERREIRA, K. M.; GIBRAN, F.Z.; BENINE, R.C.; CARVALHO, M.; RIBEIRO, A.C.; ABREU, T.X.; BOCKMANN, F.A.; DARDIS, G.Z.P.; STOPIGLIA, R.; LANGEANI, F. Estrutura e composição da ictiofauna de riachos da bacia do Rio Grande, no Estado de São Paulo, Sudeste do Brasil. **Biota Neotropica**, v.4, n.1. 2004. <http://www.biotaneotropica.org.br/v4n1/pt/abstract?article+BN0170402004>.

CASTRO, R.M.C. Evolução da ictiofauna de riachos sul-americanos: padrões gerais e possíveis causas, p. 139-155. In CARAMASCHI, E.P.; MAZZONI, R.; PERES, N.P.R. (eds). **Ecologia de Peixes de Riachos**. Série Oecologia Brasiliensis, vol. 6. PPGE-UFRJ. Rio de Janeiro. 1999.

CEMIG, Companhia Energética de Minas Gerais Superintendência de Comunicação Empresarial. Gerência de Programas e Ações Ambientais. **Guia ilustrado de peixes do Rio São Francisco de Minas Gerais**. Empresa das Artes, Belo Horizonte. 2006. 118p.

CHAMBERS, G.K.; MACAVOY, E.S. Microsatellites: consensus and controversy. Comparative. **Biochemistry and Physiology**, v.126, p.455–476. 2000.

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

CHONG, L.K.; TAN, S.G.; YUSOFF, K.; SIRAJ, S.S. Identification and characterization of Malaysian river catfish, *Mystus nemurus* (C&V): RAPD and AFLP analysis. **Biochemical Genetics**, v.38, p.62-76. 2000.

DAVID, L.; RAJASEKARAN, P.; FANG, J.; HILLEL, J.; LAVI, U.; Polymorphism in ornamental and common carp strains (*Cyprinus carpio* L.) as revealed by AFLP analysis and a new set of microsatellite markers. **Molecular Genetics Genomics**, v.266, p.353 – 362. 2001.

DERGAM, J.A.; PAIVA, S.R.; SCHAEFFER, C.E.; GODINHO, A.L.; VIEIRA, F. Phylogeography and RAPD-PCR variation in *Hoplias malabaricus* (Bloch, 1794) (Pisces, Teleostei) in southeastern Brazil. **Genetics and Molecular Biology**, v.25, n.4, p.379-387. 2002.

DI RIENZO, A.; PETERSON, A.C.; GARZA, J.C.; VALD, S.A.M.; SLATKIN, M.; FREIMER, N.B. Mutational processes of simple-sequence repeat loci in human populations. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v.91, p.3166-3170. 1994.

DUDGEON, D.; ARTHINGTON, A.H.; GESSNER, M.O.; KAWABATA, Z.I.; KNOWLER, D.J.; LÉVÊQUE, C.; NAIMAN, R.J.; PRIEUR-RICHARD, A.H.; SOTO, D.; STIASSNY, M.L.J.; SULLIVAN, C.A. Freshwater biodiversity: importance, threats, status and conservation challenges. **Biological Reviews**, v.81, p.163–182. 2006.

DUKE ENERGY – **Geração Paranapanema. Peixes do rio Paranapanema**. Ed. Horizonte Geográfico, São Paulo. 2008. 120 p.

EIZIRIK, E. Ecologia molecular, genética da conservação e o conceito de unidades evolutivamente significativas. **Brazilian Journal of Genetics**, v.19, p.23-29. 1996.

ELLEGREN, H. Microsatellites: simple sequences with complex evolution. **Nature Reviews Genetics**, v.5, p.435-445. 2004.

ESTEVEZ, K.E.; ARANHA, J.M.R. Ecologia trófica de peixes de riachos, p.157-182. In: CARASMACHI, E.P.; MAZZONI, R.; PERES-NETO, P.R. (eds). **Ecologia de peixes de riachos**. Série Oecologia Brasiliensis, vol.6. PPGE-UFRJ. Rio de Janeiro. 1999.

FARIAS, I.P.; HRBEK, T.; BRINKMANN, H.; SAMPAIO, I.; MEYER, A. Characterization and isolation of DNA microsatellite primers for *Arapaima gigas*, an economically important but severely over-exploited fish species of the Amazon basin. **Molecular Ecology Notes**, v.3, n.1, p.128-130. 2003.

FELDBERG, E.; BERTOLLO, L.A. Nucleolar Organizing regions in Some Species of Neotropical Cichlid Fish (Pisces, Perciformes). **Caryologia**, v.38, n.3, p.319-324. 1985.

FERGUSON, A.; TAGGART, J.B.; PRODÖHL, P.A.; MCMEEL, O.; TOMPSON, C.; STONE, C.; MCGINNITY, P.; HYNES, R.A. The application of molecular markers to the study and conservation of fish population, with special reference *Salmo*. **Journal of Fish Biology**, v.47, p.103 – 126. 1995.

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3ª ed. Brasília: Embrapa-Cenargen, 1998. 220p.

FRACASSO, J.F. **Análise genética de duas populações de *Leporinus amblyrhynchus* (Garavello & Britski, 1987) coletados à Montante e a Jusante de uma Barragem no Rio Laranjinha, bacia do Rio das Cinzas – PR**. Monografia apresentado ao curso de Licenciatura Plena em Ciências Biológicas da Universidade Estadual do Norte do Paraná, 2009. 68p.

FRANKHAM, R.; BALLOU, J.D.; BRISCOE, D.A. **Introduction to Conservation genetics**. 2.ed. Cambridge, UK: Cambridge University Press. 2010. 619p.

FREELAND, J. R. **Molecular ecology**. John Wiley & Sons Ltd, England: 2005. 388p.

GARCEZ, R.; CALCAGNOTTO, D.; ALMEIDA-TOLEDO, L.F. Population structure of the migratory fish *Prochilodus lineatus* (Characiformes) from Rio Grande basin (Brazil), an area fragmented by dams. **Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems**, v.21, p.268-275. 2011.

GEIST, J. Integrative freshwater ecology and biodiversity conservation. **Ecological Indicators**, v. 11, p. 1507–1516. 2011.

GONDIM, S.G.C.A.; RESENDE, L.V.; BRONDANI, R.P.V.; COLLEVATTI, R.G.; SILVA-JÚNIOR, N.J.; PEREIRA R.R.; TELLES, M.P.C. Development of microsatellite markers for *Hoplias malabaricus* (Erythrinidae). **Genetics and Molecular Research**, v.9, n.3, p.1513-1517. 2010.

GRAÇA, W.J.; PAVANELLI, C.S. **Peixes da planície de inundação do Alto rio Paraná e áreas adjacentes**. Maringá: Eduem, 2007. 241p.

HAIG, S.M. Molecular contributions to conservation. **Ecology**, v.79, p.413-425. 1998.

HAMOY, I.G.; CIDADE, F.W.; BARBOSA, M.S.; GONÇALVES, E.C.; SANTOS, S. Isolation and characterization of tri and tetranucleotide microsatellite markers for the tambaqui (*Colossoma macropomum*, Serrasalminidae, Characiformes). **Genetics and Molecular Research**, v.3, p.33–36. 2011.

HARTL, D.L. **Princípios de genética de População**. 3ª ed. FUNPEC Editora, Ribeirão Preto, SP. 2008. 217 p.

HARTL, D.L.; CLARK, A.G. **Princípios de genética de populações**. Artmed, Porto Alegre. 2010. 659p.

HATANAKA, T.; GALETTI JR, P.M. RAPD markers indicate the occurrence of structured populations in a migratory freshwater fish species. **Genetics and Molecular Biology**, v.26, p.19- 25. 2003.

HATANAKA, T.; SILVA, F.H.; GALETTI JR, P.M. Population substructuring in a migratory freshwater fish *Prochilodus argenteus* (Characiformes, Prochilodontidae) from the São Francisco River. **Genetica**, v.126, p.153-159. 2006.

HILSDORF, A.W.; PETRERE Jr, M. Conservação de peixes da Bacia do rio Paraíba do Sul. **Ciência Hoje**, v.30, p.62-67. 2002.

HILSDORF, A.W.S.; MARQUES, D.K.S.; RESENDE, E.K. **Genética e conservação de estoques pesqueiros de cguas Continentais no Brasil: situação atual e perspectivas**. Embrapa Pantanal, Corumbá. 2006. 43p.

HORAI, S.; HAYASAKA, K. Intraspecific nucleotide sequence differences in the major noncoding region of human mitochondrial DNA. **American Journal of Human Genetics**, v.46, p.828–842. 1990.

- HRBEK, T.; FARIAS, I.P.; CROSSA, M.; SAMPAIO, I.; PORTO, J.I.R.; MEYER, A. Population genetic analysis of *Arapaima gigas*, one of the largest freshwater fishes of the Amazon basin: Implications for its conservation. **Animal Conservation**, v.8, p.297-308. 2005.
- HRBEK, T.; CROSSA, M.; FARIAS, I.P. Conservation strategies for *Arapaima gigas* (Schinz, 1822) and the Amazonian várzea ecosystem. **Brazilian Journal of Biology**, v.67, p.909–917. 2007.
- HURT, C.; HEDRICK, P.W. Conservation genetics in aquatic species. General approaches and case studies in fishes and spring snails of arid lands. **Aquatic Sciences**, v.66, p.402–413. 2004.
- KOCHER, T.D.; LEE, W.J.; SOBOLEWSKA, H.; PENMAN, D.; MCANDREW, B. A Genetic Linkage Map of a Cichlid Fish, the Tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Genetics**, v.148, p.1225–1232. 1998.
- KOSKINEN, M.T.; NILSSON, J.; VESELOV, A.J.; POTUTKIN, A.G.; RANTA, E.; PRIMMER, C.R. Microsatellite data resolve phylogeographic patterns in European grayling, *Thymallus thymallus*, Salmonidae. **Heredity**, v.88, p.391–401. 2002.
- KULLANDER, S.O. Family Cichlidae (Cichlids), pp. 605–654. In: REIS, R.E.; KULLANDER, S.O.; FERRARIS JR, C.J. (Eds.). **Check list of the freshwater fishes of South and Central America**. EDIPUCRS, Porto Alegre. 2003.
- LACERDA D.R.; ACEDO M D. P.; LEMOS FILHO J. P.; LOVATO M. B. A técnica de RAPD: uma ferramenta molecular em estudos de conservação de plantas. **Lundiana**, v.3, p.87-92. 2002.
- LANGEANI, F.; CASTRO, R.M.C.; OYAKAWA; O.T.; SHIBATTA, O. A.; PAVANELLI, C. S.; CASATTI; L. Diversidade da ictiofauna do Alto Rio Paraná: composição atual e perspectivas futuras. **Biota Neotropica**, v.7, n.3, p.181-197. 2007.
- LEUZZI, M.S.P.; ALMEIDA, F.S.; ORSI, M.L.; SODRÉ, L.M.K. Analysis by RAPD of the genetic structure of *Astyanax altiparanae* (Pisces, Characiformes) in reservoirs on the Paranapanema River, Brazil. **Genetics and Molecular Biology**, v.27, p.355-362. 2004.
- LÉVÊQUE, C.; OBERDORFF, T.; PAUGY, D.; STIASSNY, M.L.J.; TEDESCO, P.A. Global diversity of fish (Pisces) in freshwater. **Hydrobiologia**, v.595, p.545–56, 2008.
- LIMA, M. P.; CAMPOS, T.; SOUSA, A. C. B.; SOUZA, A. P.; ALMEIDA-VAL, V. M. F. Isolation and characterization of microsatellite markers for *Cichla monoculus* (Agassiz, 1831), an important freshwater fish in the Amazon. **Conservation Genet Resour**, v.2, p.215–218. 2010.
- LIU, Y.G.; CHEN, S.L.; LI, B.F.; WANG, Z.J.; LIU, Z.J. Analysis of genetic variation in selected stocks of hatchery flounder, *Paralichthys olivaceus*, using AFLP markers. **Biochemical Systematics and Ecology**, v.33, p.993-1005. 2005.

LIU, Z.; KARSI, A.; LI, P.; CAO, D.; DUNHAM, R. An AFLP-Based Genetic Linkage Map of Channel Catfish (*Ictalurus punctatus*) Constructed by Using an Interspecific Hybrid Resource Family. **Genetics**, v.165, p.687-694. 2003.

LIU, Z.J. Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP), p. 389-411. In: CADRIN, S.X.; FRIEDLAND, K. D.; WALDMAN, J. R. (Eds.) **Stock identification methods: applications in fishery science**. Elsevier Academic Press, Oxford. 2005.

LIU, Z.J. **Aquaculture genome technologies**. Blackwell Publishing, 2007. 584p.

LOESCHCKE, V.; TOMIUK, J.; JAIN, S.K. **Conservation genetics**. Birkhauser, Basel, 1994. 440p.

LOPERA-BARRERO, N.M.; VARGAS, L.; SIROL, R.N.; RIBEIRO, R.P.; POVH, J.A.; STREIT JUNIOR, D.P.; GOMES, P.C. Diversidad genética y contribución reproductiva de una progenie de *Brycon orbignyanus* en el sistema reproductivo seminatural, usando marcadores microsatélites. **Agrociência**, v.44?, p.171-181. 2010.

LOPES, C.M.; ALMEIDA, F.S.; ORSI, M.L.; BRITTO, S.G.C.; SIROL, R.N.; SODRÉ, L.M.K. Fish passage ladders from Canoas Complex – Paranapanema River: evaluation of genetic structure maintenance of *Salminus brasiliensis* (Teleostei: Characiformes). **Neotropical Ichthyology**, v.5, p.131-138. 2007.

LÓPEZ-FERNÁNDEZ, H.; WINEMILLER, K.O.; HONEYCUTT, R.L. Multiloco phylogeny and rapid radiations in Neotropical cichlid fishes (Perciformes: Cichlidae: Cichlinae). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v.55, p.1070-1086. 2010.

LOWE, A.; HARRIS, S.; ASHTON, P. **Ecological genetics: design, analysis and application**. Blackwell Publishing. 2004. 326p.

LOWE-MCCONNELL, R.H. Ecology of cichlids in South American and African waters, excluding the African Great Lakes, pp. 60–85. In: KEENLEYSIDE, M.H.A. (ed.). **Cichlid fishes behavior, ecology, and evolution**. Chapman and Hall. London. 1991.

LUCCHINI, V. AFLP: A useful tool for biodiversity conservation and management. **Comptes Rendus Biologies**, v.326, p.43–48. 2003.

LUIZ, E.A.; AGOSTINHO, A.A.; GOMES, L.C.; HAHN, N.S. Ecologia trófica de peixes em dois riachos da bacia do rio Paraná. **Revista Brasileira de Biologia**, v.58, p.273-285. 1998.

MAACK, R. **Geografia Física do Estado do Paraná**. 3ª ed. Curitiba: Imprensa Oficial, 2002. 440p.

MARTINS, C.; WASKO, A.P.; OLIVEIRA, C.; FORESTI, F. Mitochondrial DNA variation in wild populations of *Leporinus elongatus* from the Paraná River basin. **Genetics and Molecular Biology**, v.26, n.1, p.33-38. 2003.

MATIOLI, S.R.; PASSOS-BUENO, M.R. Métodos baseados em PCR para análise de polimorfismos de ácidos nucleicos, p. 217-238. In: Matioli, S. R.; FERNANDES, F.M.C. (Ed). **Biologia molecular e evolução**. Holos, Ribeirão Preto. 2012.

MATOSO, D.A.; MARTINS, C.; ARTONI, R.F.; GALETTI JR, P.M. Preliminary qualitative analysis on DNAmT in *Astyanax fasciatus* populations Cuvier, 1819 (Teleostei; Characidae) indicate population distinctiveness. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.53, n.3, p.663 – 667. 2010.

MATSUMOTO, C.K.; HILSDORF, A.W.S. 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**, v.7, p.395-402. 2009.

MAZZONI, R.; RIOS, R. Environmentally related life history variations in *Geophagus brasiliensis*. **Journal of Fish Biology**, v.61, p.1606–1618. 2002.

MENEZES, N.; WEITZMAN, S.H.; OYAKAWA, O.; LIMA, F.C.T.; CASTRO, R.M.C.; WEITZMAN, M.J. **Peixes de água doce da bacia da Mata Atlântica. Lista Preliminar de Espécies e Comentários Sobre Conservação de Peixes de Água Doce Neotropicais**. Museu de Zoologia, Universidade de São Paulo. São Paulo. 2007. 408p.

MICKETT, K.; MORTON, C.; FENG, J.; LI, P.; SIMMONS, M.; DUNHAM, R.A.; CAO, D.; LIU, Z.J. Assessing genetic diversity of domestic populations of channel catfish (*Ictalurus punctatus*) in Alabama using AFLP markers. **Aquaculture**, v.228, p.91–105. 2003.

MOESER, A.A.; BERMINGHAM, E. Isolation and characterization of eight microsatellite locos for the Neotropical freshwater catfish *Pimelodella chagresi* (Teleostei: Pimelodidae). **Molecular Ecology Notes**, v.5, p.363–365. 2005.

MONTOYA-BURGOS, J.I. Historical biogeography of the catfish genus *Hypostomus* (Siluriformes: Loricariidae), with implications on the diversification of Neotropical ichthyofauna. **Molecular Ecology**, v.12, p.1855–1867. 2003.

MOREIRA, A.A.; HILSDORF, A.W.S.; SILVA, J.V.; SOUZA, V.R. Genetic variability of two Nile Tilapia strains by microsatellites markers. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.42, p.521-526. 2007.

MORELLI, K.A.; REVALDAVES, E.; OLIVEIRA, C.; FORESTI, F. Isolation and characterization of eight microsatellite locos in *Leporinus macrocephalus* (Characiformes: Anostomidae) and cross-species amplification. **Molecular Ecology Notes**, v.7, p.32–34. 2007.

MOYSÉS, C.B.; MOCKFORD, S.; ALMEIDA-TOLEDO, L.F.; WRIGHT, J.M. Nine polymorphic microsatellite locos in the Neotropical electric eel *Eigenmannia* (Teleostei, Gymnotiformes). **Molecular Ecology Notes**, v.5, p.7-9. 2005.

NASCIMENTO, R.H.C.; VIEIRA, C.E.D.; COSTA, A.D.A.; SILVA, W.F.; FERREIRA, D.G.; CARVALHO, S.; GALINDO, B. A. **Análise Genética de duas populações de *Steindachnerina insculpta* (Fernández-Yépez, 1948)(Characiformes,**

Curimatidae) coletados à montante e a jusante de uma barragem no rio Laranjinha, bacia do rio das Cinzas, PR. In: Anais do X Encontro Paranaense de Genética. Do nano ao macro, 2010.

NELSON, J.S. **Fishes of the world**. 4th ed. John Wiley and Sons, New York. 2006. 601p.

NOGUEIRA, M.G. **Composição, abundância e distribuição, espaço-temporal das populações planctônicas e das variáveis físico-químicas na Represa de Jurumirim**. Tese de Doutorado, EESC, USP, São Carlos, 1996. 439p.

O'CONNELL, M.; WRIGHT, J.M. Microsatellite DNA in fishes. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, v.7, p.331–363. 1997.

OLIVEIRA, E.J.; PÁDUA, J.G.; ZUCCHI, M.I.; VENCOVSKY, R.; VIEIRA, M.L.C. Origin, evolution and genome distribution of microsatellite. **Genetics and Molecular Biology**, v.29, p.294-307. 2006.

PAIVA, A.L.B.; KALAPOTHAKIS, E. Isolation and characterization of microsatellite locos in *Pimelodus maculatus* (Siluriformes: Pimelodidae). **Molecular Ecology Resources**. v.8, p.1078–1080. 2008.

PAMPONET, V.C.C.; CARNEIRO, P.L.S.; AFFONSO, P.R.A.M.; MIRANDA, V.S.; JUNIOR, J.C.S.; OLIVEIRA, C.G.; GAIOTTO, F.A. A multi-approach analysis of the genetics diversity in population of *Astyanax* aff. *bimaculatus* Linnaeus, 1758 (Teleostei: Characidae) from Northeastern Brazil. **Neotropical Ichthyology**, v.6, n.4, p.621-630. 2008.

PANARARI-ANTUNES, R.S.; PRIOLI, A.J.; PRIOLI, S.M.A.P.; JÚLIO, H.F.JR.; AGOSTINHO, C.S.; PRIOLI, L.M. Molecular variability in *Brycon* cf. *pesu* Müller and Troschel, 1845 (Characiformes:Characidae) from the Araguaia-Tocantins basin. **Genetics and Molecular Research**, v.7, p.95–106. 2008.

PAZZA, R.; KAVALCO, K.F.; PRIOLI, S.M.A.P.; PRIOLI, A.J.; BERTOLLO, L.A.C. Chromosome polymorphism in *Astyanax fasciatus* (Teleostei, Characidae), Part 3: Analysis of the RAPD and ISSR molecular markers. **Biochemical Systematics and Ecology**, v.35, p.843-851. 2007.

PEREIRA, L.H.G.; FORESTI, F.; OLIVEIRA, O. Genetic structure of the migratory catfish *Pseudoplatystoma corruscans* (Siluriformes: Pimelodidae) suggests homing behavior. **Ecology of Freshwater Fish**, v.18, p.215–225. 2009.

PEREZ, M.D.; VASCONCELOS, M.S.; RENESTO, E. Genetic variability in *Astyanax altiparanae* Garutti & Britski, 2000 (Teleostei, Characidae) from the Upper Paraná River basin, Brazil. **Genetics and Molecular Biology**, v.28, n.4, p.717-724. 2005.

PEREZ-SWEENEY, B.M.; RODRIGUES, F.P.; MELNICK, D.J. Metodologias Moleculares Utilizadas em genética da conservação, p. 343 – 380. In: CULLEN JR, L.; RUNDAN, R.; PADUA, C.V (Eds.). **Métodos de estudos em biologia da conservação e manejo da vida silvestre**. Editora EFPR, Curitiba. 2004.

PHILIPPSEN, J.S.; RENESTO, E.; GE AHL, A.M.; ARTONI, R.F.; SHIBATTA, O.A.; ZAWADZKI, C.H. Genetic variability in four samples of *Neoplecostomus yapo* (Teleostei: Loricariidae) from the Paranapanema basin, Brazil. **Neotropical Ichthyology**, v.7, p.25–30. 2009.

PIE, M.R.; BAGGIO, R.A.; BOEGER, W.A.; PATELLA, L.A.; OSTRENSKY, A.; VITULE, J.R.S.; ABILHOA, V. Molecular data reveal a diverse *Astyanax* species complex in the upper Iguaçu River. **Journal of Fish Biology**, v.75, p.2357–2362. 2009.

PIORSKI, N.M.; SANCHES, A.; CARVALHO-COSTA, L.F.; HATANAKA, T.; CARRILLO-AVILA, M.; FREITAS, P.D.; GALETTI JR, P.M. Contribution of conservation genetics in assessing neotropical freshwater fish biodiversity. **Brazilian Journal of Biology**, v.68, p.1039-1050, 2008.

PIRES, L.B.; CAETANO, L.G.; DIAS, A.L. Cytogenetic characterization of *Geophagus brasiliensis* and two species of *Gymnogeophagus* (Cichlidae: Geophaginae) from Guaíba lake, RS, Brazil. **Folia Biologica**, v.58, p.29-34. 2010.

PIRES, L.B.; CAETANO, L.G.; DIAS, A.L. Karyotype similarities among two populations of *Geophagus brasiliensis*(perciformes, cichlidae) from the Tibagi river basin/PR/Brazil. **Caryologia**, v.61, p.135-138. 2008.

POVH, J.A.; RIBEIRO, R.P.; LOPERA-BARRERO, N.M.; JACOMETO, C.B.; VARGAS, L.; GOMES, P.G.; LOPES, T. S. Microsatellite analysis of pacu broodstocks used in the stocking program of Paranapanema River, **Brazil Scientia Agricola.**, v.68, n.3, p.308-313. 2011.

PRIOLI, S.M.A.P.; PRIOLI, A.J.; JÚLIO JR, H.F.; PAVANELLI, C.S.; OLIVEIRA, A.V.; CARRER, H.; CARRARO, D.M.; PRIOLI, L.M. Identification of *Astyanax altiparanae* (Teleostei, Characidae) in the Iguaçu River, Brazil, based on mitochondrial DNA and RAPD markers. **Genetics and Molecular Biology**, v.25, p.421-430. 2002.

RAMELLA, M.S.; KROTH, M.A.; MEURER, S.; NUÑER, A.P.O.; ZANIBONI FILHO, E.; ARISI, A.C.M. Genetic variability in four fish species (*Pimelodus maculatus*, *Prochilodus lineatus*, *Salminus brasiliensis* and *Steindachneridion scripta*) from Uruguay. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.49, n.4, p.589 – 598. 2006.

RAMOS, F.P. **Análise Genética de Duas Populações de *Pimelodus heraldoi* (AZPELICUETA, 2001) Coletados à Montante e a Jusante de Uma Barragem no Rio Laranjinha, Bacia do Rio das Cinzas, PR.** Monografia apresentado ao curso de Licenciatura Plena em Ciências Biológicas da Universidade Estadual do Norte do Paraná, 2009. 67p.

REFSETH, U.H; FANGAN, B.M.; JAKOBSEN, K.S. Hybridization capture of microsatellites directly from genomic DNA. **Electrophoresis**, v.18, p.1519-1523, 1997.

REIS, R.E., KULLANDER, S.O.; FERRARIS-JR, C.J. **Check list of the freshwater fishes of South and Central America.** EDIPUCRS, Porto Alegre, 2003. 742p.

REVALDAVES, E.; PEREIRA, L.H.G.; FORESTI, F.; OLIVEIRA, C. Isolation and characterization of microsatellite locos in *Pseudoplatystoma corruscans* (Siluriformes: Pimelodidae) and cross-species amplification. **Molecular Ecology Notes**, v.5, n.3, p.463–465. 2005.

RODRIGUEZ-RODRIGUEZ, M.P.; LOPERA-BARRERO, N.M.; RIBEIRO, R.P.; POVH, J.A.; VARGAS, L.; SIROL, R.N.; JACOMETO, C.B. Diversidad genética de piracanjuba usada en programas de repoblación con marcadores microsatélites. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.45, p.56-63. 2010.

SANCHES A.; GALETTI JR, P.M. Microsatellites locos isolated in the freshwater fish *Brycon hilarii*. **Molecular Ecology Notes**, v.6, p.1045-1046. 2006.

RODRIGUES, FABIOLA C.; FARIAS, I.P.; BATISTA, J.S.; ALVES-GOMES, J. Isolation and characterization of microsatellites locos for “piramutaba” (*Brachyplatystoma vaillantii*, Siluriformes: Pimelodidae), one of the commercially most important migratory catfishes in the Amazon Basin. **Conservation Genetics Resource**, v.1, p.365–368. 2009.

RUEDA, E.C.; AMAVET, P.; BRANCOLINI, F.; SOMMER, J.; ORTÍ, G. Isolation and characterization of eight polymorphic microsatellite markers for the migratory characiform fish, *Salminus brasiliensis*. **Journal of Fish Biology**, v.79, p.1370–1375. 2011.

SANTOS, A.F.G.N.; SANTOS, L.N.; ARAÚJO, F.G. Water level influences on body condition of *Geophagus brasiliensis* (Perciformes, Cichlidae) in a Brazilian oligotrophic reservoir. **Neotropical Ichthyology**, v.2, p.151–156. 2004.

SAULO-MACHADO, A.C.; FORMIGA, K.M.; ORTIZ, M.F.; SOUSA, A.C.B.; ALVES-GOMES, J.A.; BATISTA, J.S. Polymorphic microsatellite DNA markers for the Amazonian catfish *Pseudoplatystoma punctifer* (Siluriformes: Pimelodidae). **Genetics and Molecular Research**, v.3, p.307–310. 2011.

SAVELKOUL, P.H.; AARTS, H.J.; HAAS, J.D.; DIJKSHOORN, L.; DUIM, B; OTSEN M.; RADEMAKER, J.L.; SCHOULS, L.; LENSTRA, J.A. Amplified-fragment length polymorphism analysis: the state of an art. **Journal of Clinical Microbiology**, v.37, p.3083-309. 1999.

SCHLÖTTERER, C.; PEMBERTON, J. The use of microsatellites for genetic analysis of natural populations a critical review, p.71–86. In: DESALLE R; SCHIERWATER, B. (Ed.). **Molecular approaches to ecology and evolution**. Birkhäuser, Basel. 1998.

SEKINE, E.S.; PRIOLI, A. J.; PRIOLI, S. M. A.P.; JÚLIO JR, H.F. Genetic differentiation among populations of *Pseudoplatystoma corruscans* (Agassiz, 1829) (Osteichthyes, Pimelodidae) isolated by the Guaíra Falls in the Paraná River. **Acta Scientiarum Maringá**, v.24, n.2, p.507-512. 2002.

SHIBATTA, O.A.; SILVA-SOUZA, A.T. Fish, Ribeirão do Feijão basin, São Carlos, São Paulo, Brazil. **Check List**, v.4, p.75–78. 2008.

SHIBATTA, O.A.; CHEIDA, C.C. Composição em tamanho dos peixes (Actinopterygii, Teleostei) de ribeirões da bacia do rio Tibagi, Paraná, Brasil. **Revista Brasileira de Zoologia**, v.20, n.3, p.469–473. 2003.

SILVA, A, P.A.; DERGAM, J.A. Região de Heterocromatina Constitutiva em *Geophagus brasiliensis* (Quoy e Gaimard,1824)(Perdiformes: Cichlidae) do Sistema Lacustre do Médio Rio Doce (MG). **Evolução e Conservação da Biodiversidade**, v.2,n.1, p.16-21. 2011.

SILVA, J.V.; HILSDORF, A.W.S. Isolation and characterization of polymorphic microsatellite locos from *Salminus hilarii* (Characiformes: Characidae). **Genetics and Molecular Research**, v.3, p.437–439. 2011.

SILVA, W.F. **Análise genética de *Leporinus octofasciatus* (Steindachner, 1915) (Osteichthyes, Anostomidae) coletados à montante e à jusante de uma barragem no Rio Laranjinha, bacia do Rio das Cinzas – PR**. Monografia apresentado ao curso de Licenciatura Plena em Ciências Biológicas da Universidade Estadual do Norte do Paraná, 2010. 75 p.

SILVANO, R.A.M.; OYAKAWA, O.T.; AMARAL, B.D.; BEGOSSI, A. **Peixes do alto Rio Juruá (Amazonas, Brasil)**. Editora da Universidade de São Paulo, Brasil. 2001. 298 p.

SIVASUNDAR, A.; BERMINGHAM, E.; ORTÍ, G. Population structure and biogeography of migratory freshwater fishes (Prochilodus: Characiformes) in major South American rivers. **Molecular Ecology**, v.10, p.407–417. 2001.

SMITH, W.L.; CHAKRABARTY, P.; SPARKS, J.S. Phylogeny, taxonomy, and evolution of Neotropical cichlids (Teleostei: Cichlidae: Cichlinae). **Cladistics**, v.24, p.625–641. 2008.

SOFIA, S.H.; SILVA, C.R.M.; GALINDO, B.A.; ALMEIDA, F.S.; SODRÉ, L.M.K.; MARTINEZ, C.B.R. Population genetic structure of *Astyanax scabripinis* (Teleostei, Characidae) from an urban stream. **Hydrobiologia**, v.553, p. 245-254. 2006.

SOFIA, S.H.; GALINDO, B.A.; PAULA, F.M.; SODRÉ, L.M.K.; MARTINEZ C.B.R. Genetic diversity of *Hypostomus ancistroides* (Teleostei, Loricariidae) from an urban stream. **Genetics and Molecular Biology**, v.31, p.317-323. 2008.

SOLÉ-CAVA, A.J.; CUNHA, H.A. A genética e a conservação da natureza, pp. 217-238. In: Matioli, S. R.; FERNANDES, F.M.C. (Eds.). **Biologia Molecular e Evolução**. Ribeirão Preto: Holos. 2012.

SOULÉ, M.E. What is conservation biology? **BioScience**, v.35, p.727–734. 1985.

SOUZA, C.A.; HASHIMOTO, D.T.; PEREIRA, L.H.G.; OLIVEIRA, C.; FORESTI, F.; PORTO-FORESTI, F. Development and characterization of microsatellite locos in *Phractocephalus hemiliopterus* (Siluriformes: Pimelodidae) and their cross-species amplification in six related species. *Conservation Genetics Resources*, v.4, p.499-501. 2012.

STRECKER, U. Polymorphic microsatellites isolated from the cave fish *Astyanax fasciatus*. **Molecular Ecology Notes**, v.3, p.150-151. 2003.

SULLIVAN, J.P.; LAVOUE, S.; ARNEGARD, M.E.; HOPKINS, C. D. AFLPs Resolve Phylogeny and Reveal Mitochondrial Introgression Within a Species Flock of African Electric Fish (Mormyroidea: Teleostei). **Evolution**, v. 58, n.4, p.825–841. 2004.

SUNNUCKS, P. Efficient genetic markers for population biology. **Trends in Ecology and Evolution**, v.15, p.199-203. 2000.

TABERLET, P. The use of mitochondrial DNA control region sequencing in conservation genetics, p. 125–1142. in Smith, T.B.; Wayne R.K. (Eds.) **Molecular genetic approaches in conservation**. Oxford Univ. Press, New York. 1996.

TEIXEIRA, T.P.; PINTO, B.C.T.; TERRA, B.F.; ESTILIANO, E.O.; GRACIA, D.; ARAÚJO, F.G. Diversidade das assembléias de peixes nas quatro unidades geográficas do rio Paraíba do Sul. **Iheringia**, v.95, n.4, p.347-357. 2005.

TELLES, M.P.C.; RESENDE, L.V.; BRONDANI, R.P.V.; COLLEVATTI, R.G.; COSTA, M.C.; SILVA JÚNIOR, N.J. Isolation and characterization of microsatellite markers in the armored catfish *Hypostomus gymnorhynchus* (Loricariidae). **Genetics and Molecular Research**, v.9, n.3, p.1770-1774. 2010.

TEMPLETON, AR.; ROBERTSON, R.J.; BRISSON, J.; STRASBURG, J. Disrupting evolutionary processes: the effect of habitat fragmentation on collared lizards in the Missouri Ozarks. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.98, n.10, p.5426-5432. 2001.

TERENCIO, M.L.; SCHNEIDER, C.H.; PORTO, J.I.R. Molecular signature of the D-loop in the brown pencilfish *Nannostomus eques* (Characiformes, Lebiasinidae) reveals at least two evolutionary units in the Rio Negro basin, Brazil. **Journal of Fish Biology**, v.81, p.110–124. 2012.

VAZZOLER, A, E, M; SOARES, L, S, H; CUNNINGHAM, P, M. Ictiofauna da Costa Brasileira In: LOWE McCONNELL, R.C (ed.). **Estudos Ecológicos de Comunidades de Peixes Tropicais**. São Paulo: EDUSP. 1999.

VIANNA, N. C. E NOGUEIRA, M. G. Ichthyoplankton and limnological factors in the Cinzas River – an alternative spawning site for fishes in the middle Paranapanema River basin, Brazil. **Acta Limnologica Brasiliensia**, v.20, n.2, p.139-151. 2008.

VICARI, M.R.; ARTONI, R.F.; MOREIRA-FILHO, O.; BERTOLLO, L.A.C. Basic and molecular cytogenetics in freshwater Cichlidae (Osteichthyes, Perciformes). Karyotypic conservatism and divergence. **Caryologia**, v.59, n.3, p.260-266. 2006.

VIEIRA, D.B.; SHIBATTA, O.A. Peixes como indicadores da qualidade ambiental do ribeirão Esperança, município de Londrina, Paraná, Brasil. **Biota Neotropica**, v.7, n1, p.57-65. 2007.

VRIJENHOEK, R.C. Conservation genetics of freshwater fish. **Journal of Fish Biology**, v.53, p.394-412. 1998.

WANG, Z.; JAYASANKAR, P.; KHOO, S.K.; NAKAMURA, K.; SUMANTADINATA, K.; CARMAN, O.; OKAMOTO, N. AFLP Fingerprinting Reveals Genetic Variability in Common Carp Stocks from Indonesia. **Asian Fisheries Science**, v.13, p.139-147. 2000.

WASCO, A.P.; GALETTI JR, P.M. RAPD analysis in the Neotropical fish *Brycon lundii*: genetic diversity and its implications for the conservation of the species. **Hydrobiologia**, v.474, p.131–137. 2002.

WEINZETTL, M.; JURBERG, P. Biological Control of *Biomphalaria tenagophila* (Molusca, Planorbidae), a Schistosomiasis Vector, Using the Fish *Geophagus brasiliensis* (Pices Cichlidae) in The Laboratory Or In a Seminatural Environment. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.85, n.1, p.35-38., 1990.

WILHELM FILHO, D.; TORRES, M. A.; TRIBESS, T.B.; PEDROSA, R.C.; SOARES, C. H. L. Influence of season and pollution on the antioxidant defenses of the cichlid fish acará (*Geophagus brasiliensis*). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.34, n.6. 2001.

WILSON, A.C.; CANN, R.L.; CARR, S.M.; GEORGE, M.JR.; GYLLENSTEN, U.B.; HELM-BYCHOWSKI, K.M.; HIGUCHI, R.G.; PALUMBI, S.R.; PRAGER, E.M.; SAGE, R.D.; STONEKING, M. Mitochondrial DNA and two perspectives on evolutionary genetics. **Biological Journal of the Linnean Society**, v.26, p.375-400. 1985.

WIMBERGER, P.H. Plasticity of fish body shape. The effects of diet, development, family and age in two species of *Geophagus* (Pisces: Cichlidae). **Biological Journal of the Linnean Society**, v.45, p.197-218. 1992.

YAZBECK, G.M.; KALAPOTHAKIS, E. Isolation and characterization of microsatellite DNA in the piracema fish *Prochilodus lineatus* (Characiformes). **Genetics and Molecular Research**, v.6, n.4, p.1026-1034. 2007.

ZAGANINI, R.L.; HASHIMOTO, D.T.; PEREIRA, L.H.G.; OLIVEIRA, C.; MENDONÇA, F.F.; FORESTI, F.; PORTO-FORESTI, F. Isolation and characterization of microsatellite locos in the Neotropical fish *Astyanax altiparanae* (Teleostei: Characiformes) and cross-species amplification. **Journal of Genetics**, v.91, p.24-27. 2012.

ZANE, L.; BARGELLONI, L.; PATARNELLO, T. Strategies for microsatellite isolation: A review. **Molecular Ecology**, v.11, p.1-16. 2002.