

---

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP**

**INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU**

**ROSÂNGELA LOPES ZAGANINI**

**Análise da estrutura genética de  
*Astyanax altiparanae* (Pisces: Characidae)  
na Bacia do Alto rio Paraná**

**DOUTORADO**

**Botucatu  
-2013-**

---

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP**

**INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU**

**ROSÂNGELA LOPES ZAGANINI**

**Análise da estrutura genética de  
*Astyanax altiparanae* (Pisces: Characidae)  
na Bacia do Alto rio Paraná**

Tese apresentada ao Instituto de Biociências, Botucatu, Universidade Estadual Paulista, UNESP, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas. Área de concentração: Zoologia.

**Orientador: Dr. Fábio Porto Foresti**  
**Coorientador: Dr. Paulino Martínez Portela**

Botucatu  
- 2013-

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.  
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP  
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE - CRB 8/5651

Zaganini, Rosângela Lopes.

Análise da estrutura genética de *Astyanax altiparanae* (Pisces: Characidae) na  
bacia do Alto rio Paraná / Rosângela Lopes Zaganini. - Botucatu, 2013

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de  
Botucatu

Orientador: Fábio Porto Foresti

Coorientador: Paulino Martínez Portela

Capes: 20204000

1. *Astyanax* (Peixe) - Genética. 2. Genética de populações. 3. Diversidade  
genética. 4. Marcadores biológicos.

Palavras-chave: *Astyanax*; Genética de populações; Marcador molecular;  
Microssatélites.

Laboratório de  
**Genética de Peixes**  
Unesp Bauru



*"Para ganhar a luta de salvar as espécies e os ambientes, é necessário estabelecer uma  
ligação emocional com a Natureza...*

*Devemos encontrar espaço para a Natureza em nossos corações".*

*Stephen Jay Gould*



*"A persistência é o caminho do êxito"*

*Charlie Chaplin*

*Dedico esta tese aos meus pais*

*José Carlos e Creusa*

## AGRADECIMENTOS

*Gostaria de registrar meu agradecimento a todos que de alguma maneira contribuíram para a realização deste trabalho, em especial:*

*À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo auxílio e ao Programa Institucional de Bolsas de Doutorado Sanduíche no Exterior (PDSE) vinculado a CAPES, pela bolsa concedida (Processo BEX: 1814/12-5).*

*À Faculdade de Ciências e aos docentes e servidores do Departamento de Ciências Biológicas da UNESP de Bauru. Em especial ao professor Renato Pirani Ghilardi, pela atenção e contribuição com o desenvolvimento da parte geológica na discussão.*

*Ao Professor Doutor e orientador Fábio Porto Foresti, pela oportunidade concedida, pela amizade, pela orientação e por estar sempre preocupado com o bem estar de seus alunos. E obrigada pela experiência e competência que foram essenciais para a minha formação acadêmica.*

*Ao Instituto de Biociências da Unesp de Botucatu, ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas - AC. Zoologia e à Seção de Pós-Graduação pelo apoio. E à Biblioteca Central da UNESP de Botucatu, pela confecção da ficha catalográfica.*

*Ao Departamento de Morfologia da UNESP de Botucatu e aos amigos do Laboratório de Biologia e Genética de peixes pelo auxílio durante o desenvolvimento do trabalho. Em especial, ao amigo Luiz Henrique Garcia Pereira, pela dedicação e auxílio fundamentais em todo o processo, e pelas horas dispensadas na explicação de metodologias, análises e no esclarecimentos de dúvidas.*

*Aos Professores Doutores Claudio de Oliveira e Fausto Foresti do Laboratório de Biologia e Genética de peixes de Botucatu, pela disponibilização do laboratório e pelo fornecimento de amostras. E ao Laboratório de Ecologia de peixes do prof. Edmir Daniel Carvalho que contribuiu com as coletas.*

*Ao professor Edson Seizo Mori da Faculdade de Ciências Agronômicas de Botucatu, pelo auxílio nas análises iniciais.*

*Ao Centro de Pesquisa e Gestão dos Recursos Pesqueiros Continentais/Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade, CEPIS/ICMBio, pelo fornecimento de parte das amostras.*

*Ao laboratório Acuigen da Facultad de Veterinaria de La Universidad de Santiago de Compostela, Lugo, Espanha, pelo espaço cedido e pela oportunidade.*

*À toda equipe Acuigen que me recebeu de braços abertos. Sonia e Mónica por terem sido tão eficientes e de uma competência sem tamanho com relação às questões burocráticas do estágio. Sou eternamente grata pelo apoio em tudo que eu precisei e principalmente pela amizade! Susana, Lucía, Vanessa, Peke, María Portela, Adrián e Jorge, os agradeço por toda experiência e instruções nas técnicas moleculares, pelo carinho, pela companhia, pelos ótimos momentos e por terem me acolhido nesses 4 meses. Agradeço ainda, a todos que fazem parte deste laboratório, Ania, Rucco, Andreas, Ana, Miguel, Carlos, Belén, Carmen e Laura, que me fizeram acreditar que há pessoas que ajudam sem esperar nada em troca. Todas essas pessoas que conheci em tão pouco tempo, ficarão eternamente na minha memória e no meu coração!*

*À Raquel, parte da equipe Acuigen, uma pessoa muito especial a qual tenho enorme respeito e admiração e com quem tive a oportunidade de aprender sobre metodologias e análises tornando possível o desenvolvimento deste trabalho. Obrigada pela paciência e pela valiosa contribuição, pelos momentos de descontração, pela amizade e toda dedicação.*

*Ao Professor Doutor Paulino Martínez Portela da Facultad de Veterinaria de La Universidad de Santiago de Compostela, Lugo, Espanha, um exemplo de bondade, competência e profissionalismo. Agradeço pela oportunidade oferecida para a realização de parte do meu doutorado, e também pelos ensinamentos, pela amizade e por me receber tão bem em seu laboratório. Sabendo das dificuldades de estar em uma outra cultura,*

*outro país, fez com que eu me sentisse em casa e sempre amparada. Foram 4 meses da minha vida que nunca imaginei me sentir tão bem, e o tenho, assim como sua família, e todos do Acuigen como a minha família na Espanha.*

*Às pessoas que me acolheram em Lugo, Xoana, pela amizade e pelos momentos divertidos. Ao Pepe que me amparou durante os 4 meses, obrigada por ser tão atencioso e me proporcionar uma estadia agradável. E aos amigos que lá fiz, que apesar de pouco tempo, serão inesquecíveis, Maresa, Damira, Bego e Bruno, obrigada pelos momentos de descontração!*

*Aos amigos Laboratório de Genética de Peixes (LaGenPe), Aline, Bruna, Diego, Fernanda, Maíce, Manolo, Sandro e Tatiana, pelo companheirismo e pelos bons momentos, pelas risadas e também pelo apoio nos momentos de dificuldade. E às que não estão mais no LaGenPe Camila, Larissa e Sarah pelo auxílio fundamental na etapa anterior à minha viagem, e aos momentos divertidos que me proporcionaram. E à Daniela, uma pessoa dedicada, companheira e divertida, que esteve por não muito tempo no laboratório, mas tempo suficiente para que construíssemos uma amizade sincera.*

*À amiga Andrea, por me ouvir sempre e pelo apoio fundamental em todos os momentos, bons e difíceis. Obrigada pela amizade sincera, pelo apoio e pela companhia mais do que divertida.*

*Ao amigo Diogo, pelos ensinamentos, pelos conselhos sempre valiosos, pela atenção e dedicação em todas as etapas do desenvolvimento deste trabalho.*

*À grande amiga Sabrina pela amizade, pelos conselhos, pelas horas de conversas agradáveis e por dividir comigo as minhas aflições e também as minhas alegrias! E também às minhas amigas Andreli e Isabel, amigas de graduação e que moram no meu coração, com quem posso contar sempre.*

*Aos meus amigos de longa data e que fazem parte da minha história, Danilo, Gui, Vitor, Daniel e suas respectivas namoradas, pelos momentos de descontração nos fins de semana.*

*Às minhas amigas Claudia Danielli, Lu e Carol, que mesmo não nos encontrando frequentemente, sei que posso sempre contar com a amizade de vocês. E obrigada Carol pela disponibilidade oferecida e formatação de alguns gráficos.*

*Aos meus familiares, que tornaram possível minhas coletas no rio Paranapanema, que deixaram seus afazeres para colaborar com esta etapa fundamental da pesquisa (primos Adriano e Sarita, tio Alcides e tio Brás - in memorian).*

*Ao meu querido avô paterno Ulisses Zaganini (in memorian), que foi meu maior exemplo de respeito e amor a natureza, e avô materno José Teodoro Lopes (in memorian) que tinha um enorme amor à vida e tenho certeza que no dia de hoje se orgulha do resultado do meu esforço e da minha dedicação.*

*A minha tia Ana, que mesmo de longe acompanhou minha trajetória, sempre com palavras de incentivo e carinho.*

*Ao meu namorado Juliano por me ajudar a revisar o trabalho e o auxílio na formatação. Obrigada meu amor por todos esses anos de compreensão, amor e carinho, por ser tão paciente, por me fazer rir e ser meu companheiro nos momentos bons e ruins.*

*À minha irmã e amiga Cíntia e meu cunhado Marcelo, pelo apoio, carinho, compreensão e atenção. Obrigada por me proporcionarem momentos bons e agradáveis, e por me darem o melhor presente da minha vida, minha sobrinha e afilhada Júlia, que é meu incentivo e minha alegria.*

*Aos meu pais, José Carlos e Creusa, que além de priorizar e incentivar meus estudos, sempre estiveram presentes. Obrigada pelo exemplo de esforço e dedicação, pelo apoio e pelo amor incondicional. Sem vocês esse trabalho não seria possível e mesmo que a*

*palavra obrigada signifique tanto, não expressa por inteiro o quão grata sou por tudo que fazem por mim!*

*Finalmente, agradeço a Deus por iluminar meu caminho e pela família que tenho: meu apoio, minha alegria e minha força!!*

## RESUMO

*Astyanax altiparanae*, é uma espécie de pequeno porte e de grande interesse econômico. É considerada uma ótima opção para a piscicultura brasileira por suas características biológicas favoráveis ao cultivo e produção. É amplamente distribuída na bacia do Alto rio Paraná, tanto em número de indivíduos, como também em biomassa. Além de comercialmente interessante, *A. altiparanae* é um excelente modelo para estudos ecológicos, genéticos e evolutivos. Este trabalho teve como objetivos isolar e caracterizar marcadores moleculares microssatélites para *A. altiparanae*; testar a transferibilidade dos marcadores desenvolvidos em espécies relacionadas; quantificar a variabilidade genética dentro e entre as populações; verificar a possível estruturação genética das populações e averiguar se a estruturação ou a falta dela pode estar relacionada com atividades antrópicas. O isolamento e a caracterização resultaram em 11 locos polimórficos, que foram testados em dez espécies da mesma família. Apenas para as espécies do mesmo gênero, a transferibilidade foi eficaz. Em etapa posterior, foram selecionados oito locos microssatélites para analisar 419 indivíduos de 13 localidades das principais bacias do Alto rio Paraná. As populações de *A. altiparanae* apresentaram uma elevada variabilidade genética, e as bacias que apresentaram maior diversidade genética foram a do Tietê, seguida do Paranapanema, Ivinhema e Grande, esta última com a menor diversidade genética encontrada. No geral, não foi detectada estruturação genética, e a distribuição das populações foi relacionada com a atividade antrópica que por vários anos vem misturando os estoques, por razões de repovoamento após a construção de hidrelétricas e por liberação indiscriminada de indivíduos em locais distantes de sua origem durante a pesca esportiva, largamente praticada nos rios da bacia do Alto Paraná. Apenas as populações P3, P4, e G2 apresentaram diferenciação genética moderada, provavelmente pelo fato de essas três localidades apresentarem um elevado grau de isolamento geográfico, mostrando-se mais estruturadas em relação as demais localidades. As informações sobre a variabilidade genética encontradas neste estudo poderão contribuir de maneira significativa na elaboração de planos de manejo e conservação de *A. altiparanae*, além de fornecer embasamento científico à produção desta espécie em pisciculturas, e de maneira geral à aquicultura brasileira.

## ABSTRACT

*Astyanax altiparanae*, is a small species and of large economic interest. It is considered a great option for Brazilian fish-farming by its biological characteristics favorable to the cultivation and production. It is widely distributed in the the Upper Paraná River basin, both in number of individuals, as well as biomass. In addition to commercially interesting *A. altiparanae* is an excellent model for ecological, genetic and evolutionary studies. This study aimed to isolate and characterize microsatellite markers for *A. altiparanae*, test the transferability of the markers developed in related species, to quantify the genetic variability within and among populations; verify the possible genetic structure of populations and determine whether the structure or the lack of it may be related to anthropic activities. The isolation and characterization resulted in 11 polymorphic loci, which were tested in 10 species of the same family. Just for the species of the same genus, transferability was effective. In a next step, we selected eight microsatellite loci in the analysis of 419 individuals from 13 localities of the Upper Paraná River main basin. The populations of *A. altiparanae* showed a high genetic variability in the Upper Paraná River basin, and the basin with the highest genetic diversity were Tietê, then the Paranapanema, Ivinhema, and Grande, the latter one with lower genetic diversity. Overall, it was not detected genetic structure and distribution of populations was related to human activity that for several years has been blending stocks for reasons of restocking after the construction of dams and indiscriminate release of individuals in far places from their origin during sport fishing, widely practiced in the rivers of the Upper Paraná basin. Only populations P3, P4, and G2 showed moderate genetic differentiation, probably because these three locations have a high degree of geographic isolation, being more structured compared with other locations. Information on the genetic variability found in this study may contribute significantly in the development of management plans and conservation of *A. altiparanae*, and provide scientific basis for the production of this species in fish farms, and in general for the Brazilian aquaculture.

# SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b>	<b>1</b>
1.1 Considerações sobre a bacia do Alto rio Paraná	1
1.2 A espécie <i>Astyanax altiparanae</i>	6
1.3 Estrutura genética das populações	11
1.4 Marcador molecular Microsatélite	14
1.5 Justificativa	18
1.6 Objetivos	20
<b>2 MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>21</b>
2.1 Local de coleta das amostras	21
2.2 Coleta das amostras	24
2.3 Extração de DNA e isolamento dos Microsatélites	24
2.4 Amplificação dos locos microsatélites e genotipagem automática em Analisador de DNA	28
2.5 Teste de transferibilidade	30
2.6 Análises estatísticas	32
<b>3 RESULTADOS</b>	<b>36</b>
3.1 Isolamento e caracterização dos locos microsatélites	36
3.2 Análise intrapopulacional	36
3.2 Análise interpopulacional	42
<b>4 DISCUSSÃO</b>	<b>51</b>
4.1 Análise intrapopulacional	51
4.1 Análise interpopulacional	55
<b>5 CONCLUSÃO</b>	<b>67</b>
<b>6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>69</b>
<b>7 APÊNDICE</b>	<b>85</b>

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Considerações sobre a bacia do Alto rio Paraná

A região do Alto Paraná é uma ampla bacia intracratônica com registro de rochas sedimentares e vulcânicas que evoluiu sobre a Plataforma Sul-Americana, e sua formação teve início à cerca de 400 milhões de anos no Período Devoniano, terminando no Cretáceo, sendo hoje uma parte da face sul do Escudo Brasileiro. (Ab' Saber, 1997; Zalán *et al.*, 1990). Compreende 10,5% do território brasileiro, incluindo o norte do Estado do Paraná, sul do Mato Grosso do Sul, a maioria do Estado de São Paulo (a oeste da Serra do Mar), sul de Minas Gerais, sul de Goiás e uma área pequena do Paraguai oriental, adjacente ao Estado do Mato Grosso do Sul (Agostinho e Júlio-Jr., 1999). A bacia do Alto rio Paraná pertence à região ictiofaunística do Paraná (Gèry, 1969) e inclui o sistema dos rios da Prata-Uruguai-Paraná-Paraguai e representa o segundo maior sistema de drenagem na América do Sul, com 3,2 milhões de km<sup>2</sup> (Lowe-McConnell, 1999).

Dentro deste sistema, o rio Paraná, é o principal curso d'água da bacia, recebe esse nome após a conjunção dos rios Grande e Paranaíba, corre em orientação geral sudeste até atingir os Saltos de Sete Quedas (hoje inundado pelo Reservatório de Itaipu) percorre, desde sua nascente (rio Paranaíba, Serra Mata da Corda), cerca de 1.900 km em território brasileiro, cruzando diversos estados, e segue para o sul passando a fazer fronteira entre Brasil e Paraguai numa extensão de 190 quilômetros até a foz do rio Iguaçu, a partir de onde passa a ser limite entre Argentina e Paraguai (Ab' Saber, 1977).

A região do Alto rio Paraná corresponde à porção da bacia do rio Paraná situada a montante de Sete Quedas, e comporta as áreas de maior densidade populacional no país, além de ser a mais industrializada e com grande atividade agrícola. É a mais intensamente explorada pelos aproveitamentos energéticos, fornecendo cerca de 70% da energia elétrica produzida no país, além de deter a maior capacidade instalada nacional (63,76%) (Agostinho *et al.*, 2007).

Nos levantamentos realizados nesta bacia, foram registrados 146 grandes represamentos, 70% dos quais destinados à geração hidrelétrica. É interessante destacar que muitos apresentam área superior a 100 km<sup>2</sup>. A área total alagada nessa bacia é de aproximadamente 16.700 km<sup>2</sup>, contribuindo com quase a metade da água represada no país (Agostinho *et al.*, 2007).

Nessa bacia, os principais rios como o Paranaíba, Grande, Tietê, Paranapanema e Paraná tiveram seus cursos transformados em cascatas de reservatórios, reduzindo drasticamente os trechos lóticos, bem como nos rios e ribeirões tributários dessas sub-bacias, onde esses empreendimentos também são comuns (Agostinho *et al.*, 2007).

Vários autores discutem que a construção de represas no curso dos rios é uma das maiores fontes de interferência humana nos regimes hídricos naturais (Agostinho *et al.*, 1992; Fearnside, 1999; Agostinho *et al.*, 2007). Atualmente os reservatórios artificiais, em especial aqueles destinados à geração de hidroeletricidade, presentes em todas as grandes bacias brasileiras, caracterizam de forma marcante a paisagem local. Essas obras de engenharia provocam grandes impactos de toda ordem (econômica, social e ambiental) nas bacias em que são instaladas. O crescimento vertiginoso destas obras e seus impactos promovem alterações nas características físicas, químicas e biológicas desses

sistemas naturais aquáticos e vêm despertando interesse e preocupação da comunidade científica por atividades de manejo, preservação e mitigação ambiental (Agostinho, 1992; Agostinho *et al.*, 2007).

As alterações promovidas pelos represamentos durante a formação e as oscilações decorrentes dos procedimentos operacionais na barragem nos períodos subsequentes desestabilizam as comunidades presentes, diminuindo a população de algumas e extinguindo outras, o que cria oportunidade para que novas espécies se estabeleçam (Agostinho *et al.*, 1999). Assim, a ictiofauna presente em reservatórios é o resultado da seleção inicial promovida pelos impactos do represamento sobre a ictiofauna original, mais as espécies que foram introduzidas e conseguiram se estabelecer (Agostinho *et al.*, 2007).

Há evidências de que, pelo menos para alguns grupos de peixes, o Alto rio Paraná represente uma área de endemismo, devido à presença dos Saltos de Sete Quedas, que isolaram por muito tempo a maioria da ictiofauna do Alto rio Paraná da fauna remanescente dos sistemas dos rios La Plata e Uruguai-Paraná-Paraguai (Britski e Langeani, 1988; Menezes, 1988; Vari, 1988; Weitzman *et al.*, 1988; Langeani, 1990; Castro e Casatti, 1997).

A bacia hidrográfica do Alto Paraná abriga cerca de 310 espécies de peixes, distribuídas em 11 ordens e 38 famílias. A maior riqueza ictiofaunística é registrada em Siluriformes e Characiformes, que respondem por cerca de 80% das espécies e compõem os grupos dominantes na maior parte dos ambientes lóticos do Alto Paraná (Agostinho *et al.*, 2007). Britski (1992) afirma que os Otophysi (Characiformes, Gymnotiformes e Siluriformes) são os responsáveis por mais de 90% das espécies, porém, esses valores vêm sendo alterados em consequência de um grande número de Cyprinodontiformes descritos

recentemente, bem como de ciclídeos (Cichlidae, Perciformes), mais abundantes em ambientes de águas mais calmas (Lowe-McConnell, 1999).

Nesses ambientes lênticos, representados no Alto Paraná, principalmente pelos reservatórios artificiais, tem havido um aumento considerável de espécies alóctones ou exóticas (Lowe-McConnell, 1999) decorrente de programas de repovoamento que vêm sendo executados desde a década de 1970. A introdução de espécies de peixes está presente não só na bacia do Alto rio Paraná como em diversas bacias hidrográficas brasileiras como medida de manejo recomendada em reservatórios em que a depleção dos estoques, como decorrência da alteração qualitativa e quantitativa dos habitats e da sobrepesca é um fato recorrente. Portanto, o repovoamento de peixes em reservatórios foi uma das estratégias de manejo mais adotadas pelas concessionárias hidrelétricas e entidades responsáveis pelo manejo de reservatórios no Brasil. Somente a partir da década de 1990, os repovoamentos foram substituídos por espécies nativas devido a uma maior conscientização acerca dos riscos ambientais das introduções de espécies exóticas (Agostinho *et al.*, 2007).

Mesmo assim, a prática de introdução de espécie ocorreu por muito tempo e espécies foram introduzidas, em especial a corvina (*Plagioscion squamosissimus*), o tucunaré (*Cichla* spp.), e a tilápia (*Oreochromis niloticus* e *Tilapia rendalli*) e conseguiram tamanho sucesso na colonização dos reservatórios que hoje compõem grande parte dos desembarques pesqueiros do Sudeste e Nordeste (Agostinho *et al.*, 2007). É relevante o fato de que as duas primeiras espécies, as mais bem sucedidas na ocupação dos reservatórios da bacia do rio Paraná, não constem da série histórica de dados do repovoamento elaborada pelas concessionárias dessa bacia. A introdução da corvina, espécie

originária da bacia do rio Parnaíba, Piauí (Machado, 1977) é atribuída ao rompimento de tanques de cultivo mantidos por concessionárias hidrelétricas em um tributário do rio Paraná (rio Pardo, sub-bacia do rio Grande), fazendo com que a espécie se dispersasse e se estabelecesse em toda a bacia (Agostinho *et al.*, 2007), e o tucunaré, originário da bacia Amazônica, bacia do Orinoco e rios da Guiana, foi introduzido em quase todas as demais bacias hidrográficas do Brasil, com a finalidade de controle de espécies com alta prolificidade, como a tilápia (Santos *et al.*, 2006), e resultado de solturas clandestinas de associações de pescadores esportivos (Agostinho *et al.*, 2007).

A relevante preocupação a respeito dessas introduções decorrem do fato de que, em âmbito global, a introdução de espécies é considerada a segunda maior causa promotora da perda de biodiversidade (Courtenay e Williams, 1992). As espécies acima citadas, corvina e tucunaré, são piscívoras, apresentam enorme potencial em desestruturar a fauna nativa e parecem ter promovido grande pressão de predação sobre as espécies de pequeno porte (Santos *et al.*, 1994), gerando uma crescente preocupação no que se refere à conservação de espécies nativas frente aos impactos que vêm ocorrendo em seus ambientes e que podem levá-las a extinção (Awise, 2000).

Neste aspecto, o conhecimento da composição genética e estruturação das populações envolvendo análises moleculares, têm aplicação direta na biologia da conservação, uma vez que descrevem a biodiversidade com base na diversidade genética, fornecendo informações fundamentais para o manejo das espécies. Assim, embora não definam propriamente as estratégias de conservação, constituem-se no ponto inicial para as decisões conservacionistas (Awise, 2000).

## 1.2 A espécie *Astyanax altiparanae*

*Astyanax*, gênero pertencente à família Characidae, compreende aproximadamente cem espécies de peixes que ocorrem na América do Sul e Central e são amplamente distribuídas nas bacias hidrográficas brasileiras. Este gênero foi previamente atribuído à subfamília Tetragonopterinae (Gèry, 1977). Porém, as mais recentes classificações estão reunindo as espécies dessa subfamília em um grupo provisoriamente denominado “genera incertae sedis” por não exibirem evidências consistentes de monofiletismo (Lima *et al.*, 2003).

Morfologicamente, as espécies pertencentes ao gênero *Astyanax* caracterizam-se por apresentarem tamanho reduzido, nadadeira adiposa geralmente presente; linha lateral completa, pouco curva na frente; pré-maxilar não protrátil; dentes pré-maxilares cuspidados dispostos em duas séries, a interna com 5 dentes; altura do corpo cerca de três vezes ou menos o comprimento padrão, e escamas de tamanho normal, cobrindo apenas a base dos raios da nadadeira caudal (Britski *et al.*, 1988). Possuem fecundação externa e ausência de cuidado parental (Vazzoller e Menezes, 1992).

Diferentes revisões sistemáticas e filogenéticas realizadas no gênero *Astyanax* resultaram no estabelecimento de filogenias mais apropriadas para o grupo, concluindo-se que a denominação *Astyanax bimaculatus*, que apresenta distribuição ampla, podendo ser capturada desde a Bacia do Prata até o Panamá, não correspondia a uma espécie somente, mas um complexo de espécies. Assim, a mais recente revisão taxonômica das bacias do Paraná, São Francisco e Amazônica resultou na reestruturação da nomenclatura das espécies do gênero *Astyanax* (Garutti, 1995). Na bacia do Alto rio Paraná, a nova denominação para o

lambari-do-rabo-amarelo, ou tambiuí, passou a ser *Astyanax altiparanae* (Garutti e Britski, 2000).

*Astyanax altiparanae* é uma espécie de pequeno porte, que atinge de 10 a 15 cm de comprimento, podendo chegar a 60 gramas de peso. Possui crescimento rápido, chegando a maturidade sexual com cerca de quatro meses de idade (Porto-Foresti *et al.*, 2010). Apresenta hábito alimentar onívoro, nectônica, nadadora rápida, pouco dependente de esconderijos nos microhabitats bentônicos (Casatti, 2003), possui o que deve torná-la capaz de adaptar-se às ofertas alimentares diferenciais tanto do ponto de vista geográfico quanto sazonal (Castro *et al.*, 2004), apresenta desovas parceladas durante todo o ano em pequenos corpos d'água como riachos, e desova total em grandes corpos d'água (Garutti, 1989), não apresenta cuidado parental (Agostinho e Júlio Jr, 1999), e os ovos são flutuantes (Godoy, 1975), fazendo com que a espécie seja, portanto, relativamente independente do substrato para reprodução. É considerada uma espécie que, dentre as espécies de peixes de água doce que apresentam pequeno porte, possui capacidade natatória relativamente alta, sendo capaz de realizar migrações, e é amplamente distribuída na bacia do Alto rio Paraná, tanto em número de indivíduos, como também em biomassa (Castro *et al.*, 2003; 2004; 2005). Esse conjunto de características pode estar relacionado com a ocorrência desta espécie em diferentes ambientes da bacia do Alto rio Paraná (Bennemann *et al.*, 2005).

Até recentemente, os lambaris eram considerados por muitos produtores como elementos indesejáveis nos viveiros por invadirem e colonizarem rapidamente o ambiente de criação dos peixes nobres (Paiva, 1997). Nos tanques de criação, competem por espaço e alimento com as espécies cultivadas. O

aproveitamento destes pequenos peixes se resumia, então, à alegria dos funcionários nos dias de despesca, quando a sobra da captura formada pelos pequenos peixes geralmente descartada, eram aproveitadas por eles. Este conceito foi mudando a partir de observações mais acuradas durante o manejo dos tanques de cultivo. Casos de associação de lambaris com tilápias não revertidas resultaram no controle da população destas, uma vez que os lambaris predavam os ovos, as larvas e pós-larvas das tilápias. Por outro lado, a ocorrência natural dos lambaris nos viveiros também passou a ser aproveitada por alguns produtores, com a sua comercialização na forma eviscerada e sem escamas, para bares e lanchonetes, e como isca-viva (Porto-Foresti *et al.*, 2005).

Porntanto é notável o grande interesse econômico da espécie, sendo considerada uma ótima opção para a piscicultura brasileira, tanto por suas características biológicas favoráveis ao cultivo e produção, como pela utilização diversificada, quer para produção de conservas, de massa proteica para fabricação de rações ou pelo interesse crescente como isca viva na pesca esportiva, entre outros (Porto-Foresti *et al.*, 2010).

Além de comercialmente interessante, *Astyanax altiparnae* é um excelente modelo para estudos ecológicos, genéticos e evolutivos, pelas características que apresenta como gerador de prole numerosa, gerações curtas e de fácil reprodução (Langecker *et al.*, 1991; Jeffery, 2001). Vem sendo utilizado em estudos sobre a avaliação do potencial mutagênico e tóxico dos defensivos agrícolas utilizados nas culturas brasileiras (Goldoni e Silva, 2012; Disner *et al.*, 2011); na avaliação dos efeitos da poluição em reservatórios utilizando as brânquias como biomarcadores (Nogueira *et al.*, 2009); avaliação das

concentração de anestésicos mais adequada e segura para o manejo de peixes (Gimbo *et al.*, 2008); entre outros.

Para que se torne possível o desenvolvimento de pesquisas desta linha, o conhecimento da biologia de *A. altiparanae* é fundamental, como estudos de ocorrência (Casatti *et al.*, 2001; Dias *et al.*, 2005; Graça e Pavanelli, 2002); caracterização morfológica (Domingues *et al.*, 2007); aspectos ecológicos (Orsi *et al.*, 2004; Bennemann *et al.*, 2005; Dias *et al.*, 2005); organização genômica (Fernandes e Martins-Santos, 2006); análises citogenéticas (Pacheco *et al.*, 2001; Hashimoto *et al.*, 2008; Neto *et al.*, 2009) e filogenéticas (Javonillo, 2010; Mirande, 2009).

Adicionalmente aos diversos aspectos da biologia de *A. altiparanae* já conhecidos, o conhecimento da composição genética, e de como ela está organizada (estruturada) em suas populações, é essencial para as ações de manejo e conservação, e *A. altiparanae* tem se mostrado uma espécie ideal para estudos de genética aplicada. Leuzzi e colaboradores (2004) analisaram a estrutura genética de populações do Baixo, Médio e Alto rio Paranapanema, visando a conservação e manejo desses estoques utilizando o marcador molecular RAPD (polimorfismo de DNA amplificado ao acaso). Todos os parâmetros utilizados indicaram que a população do Baixo Paranapanema é geneticamente diferente das demais localidades (Médio e Alto Paranapanema). O polimorfismo do tamanho do fragmento de restrição (RFLP) do DNA mitocondrial também foi empregado para caracterizar espécies e populações de *Astyanax* do Alto rio Paraná e da Bacia do rio São Francisco, a análise apresentou polimorfismo considerável dentro e entre as populações (Moyses e Almeida-Toledo, 2002). Galindo *et al.* (2005), utilizando como marcador RAPD, estudaram

a estrutura genética de populações de *A. altiparanae* provenientes de dois ribeirões urbanos da cidade de Londrina, PR e, através de cálculos de similaridade genética, os indivíduos analisados formaram dois grupos distintos, um com indivíduos coletados em um dos ribeirões, e outro com a maioria dos indivíduos coletados no outro ribeirão, o que parece refletir, segundo os autores, a expressiva variabilidade genética encontrada para esta espécie. Prioli *et al.* (2002) identificaram e avaliaram a relação genética entre duas populações de *A. altiparanae* da bacia do Alto Paraná com uma população identificada como *A. bimaculatus* no rio Iguaçu, utilizando como marcador sequências de DNA mitocondrial e RAPD, e encontraram uma alta diversidade genética dentro de cada população, bem como baixa distância genética, alto fluxo gênico e alta similaridade do DNA mitocondrial entre as três populações. Os resultados demonstraram ainda que a população identificada como *A. bimaculatus* no rio Iguaçu, deveria na verdade ser definida como *A. altiparanae*. Além disso, foi possível inferir que esta população não é endêmica da bacia do rio Iguaçu sendo provável sua introdução recente nesta bacia, mantendo a identidade genética da população ancestral.

Os exemplos citados acima demonstram uma preocupação em se estudar a estrutura populacional de *Astyanax altiparanae*, e de espécies do gênero *Astyanax* da bacia do Alto rio Paraná, devido à grande importância biológica destas espécies para esse ecossistema, e a grande capacidade de ajuste a condições ambientais diferenciadas. Porém, a maioria dos estudos envolvendo *Astyanax* estão relacionados a ferramentas como RFLP, DNA mitocondrial e RAPD, no entanto, apesar da confiabilidade de todas essas técnicas, elas apresentam algumas limitações, o RAPD por exemplo, possui baixa

reprodutibilidade dos resultados obtidos. Estudos envolvendo esta técnica vem sendo substituídos por estudos utilizando marcadores moleculares microsatélites, mais recentes, que permitem discriminar indivíduos com máxima precisão, por serem mais refinados e pelo seu alto poder de transferabilidade (Ferreira e Grattapaglia, 1998).

### **1.3 Estrutura genética das populações**

As pesquisas em genética de populações de peixes têm contribuído para elucidação de várias questões relativas à estruturação de populações selvagens ou cultivadas de diversas espécies, da sua origem e suas características peculiares, tais como sucesso reprodutivo, taxas de divergências genéticas entre populações, migração, tamanhos populacionais, seleção natural e eventos históricos (Sunnucks, 2000).

É fundamental conservar os recursos genéticos de peixes para garantir e manter a diversidade genética intra e interespecífica, identificando maneiras de conservação e incentivando o estabelecimento de programas de manejo e monitoramento (Zamparete, 1996). Além disso, o incremento da investigação sobre a genética de peixes pode gerar informações de grande importância em programas de melhoramento genético das espécies de interesse zootécnico, promovendo o desenvolvimento da aquicultura (Toledo-Filho *et al.*, 1996).

O estudo da genética de populações consiste em compreender a composição genética de uma população e as forças que determinam e alteram esta composição, como por exemplo, os processos evolutivos que moldam a estrutura genética e os processos responsáveis pelo surgimento de divergência

genética entre populações. Em qualquer espécie, uma grande parte da variação genética dentro e entre populações surge da existência de vários alelos em locos gênicos diferentes. Uma mensuração fundamental na genética de populações é a frequência com a qual os alelos são encontrados em qualquer loco gênico de interesse. A frequência de um determinado alelo em uma população pode ser alterada por mutação recorrente, seleção, migração ou por efeitos aleatórios de amostragem (Griffiths *et al.*, 2002).

A literatura é vasta no que se refere aos estudos voltados à genética de populações, abordando tanto questões de estrutura genética quanto questões filogeográficas. Benites (2008) analisaram a estrutura genética populacional do Pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*) espécie de grande interesse econômico da Bacia do Alto Paraguai e Paraná utilizando marcadores microsatélites. Os resultados revelaram que há uma estrutura genética significativa nas onze populações analisadas. Opostamente, a diversidade genética de populações de pacu (*Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887) da bacia do Alto Paraguai caracterizadas utilizando marcadores microsatélites, revelou que praticamente não houve diferenciação genética entre as nove populações de pacu estudadas, apresentando uma estruturação muito tênue e revelando certa homogeneidade genética (Suganuma, 2008).

Com relação à *Astyanax altiparanae*, Graça e Pavanelli (2002) compararam espécimes da bacia do Alto rio Paraná e da bacia do rio Iguaçu através de características morfológicas e concluíram que elas pertenciam à mesma espécie, sendo, portanto, sua distribuição geográfica bastante ampla. Embora não haja dúvidas sobre a fidedignidade dos resultados obtidos em análises deste tipo, quando se pretende analisar mais profundamente aspectos da estrutura

populacional e da filogeografia das espécies, os estudos genéticos enfocam um maior conhecimento das populações naturais e são de fundamental importância, principalmente no sentido de fornecer subsídios para os programas de manejo, piscicultura e conservação biológica deste grupo de peixes.

Diversas razões podem ser apontadas para demonstrar a necessidade de se preservar a variabilidade genética de populações naturais, entre elas, a perda da variabilidade pode aumentar a probabilidade de extinção através de um declínio na fecundidade e viabilidade; populações com baixos níveis de variação genética, sobre as quais a seleção natural pode operar, podem ter oportunidades reduzidas para futuras adaptações frente a mudanças evolutivas; a preservação da variabilidade genética pode ter papel chave na identificação das unidades evolutivas significativas para a conservação (Rubin *et al.*, 2001); riscos da extinção de espécies, em consequência das alterações antrópicas dos recursos hídricos naturais, como por exemplo a construção de reservatórios para geração de energia hidrelétrica (Agostinho *et al.*, 2007).

É possível observar portanto, que quando se adiciona informação genética ao estudo da conservação de espécies, o cenário se torna ainda mais interessante, pois podemos encontrar linhagens evolutivas (algumas correspondentes a novas espécies) que dificilmente seriam descritas baseados em outros tipos de dados. Em outras palavras, a diversidade genética nem sempre acompanha a diversidade morfológica. Daí a importância de, sempre que possível, usar várias informações independentes para estudar a diversidade nas suas diversas formas e níveis. Somente com essa integração poderemos compreender como e quando essa diversidade surgiu e se manteve (Miyaki, 2009).

#### 1.4 Marcador molecular Microssatélite

O desenvolvimento da tecnologia da reação de polimerase em cadeia (*PCR – Polymerase Chain Reaction*), causou uma revolução na biologia como ferramenta poderosa para estudos moleculares, envolvendo grande número de indivíduos de qualquer organismo e permitindo a detecção de polimorfismos genéticos ao nível de DNA (Ferreira e Grattapaglia, 1998).

Um grande número de marcadores moleculares têm sido utilizados na identificação de populações de peixes, na verificação de relações filogenéticas entre espécies, na verificação da segregação reprodutiva entre populações isoladas (Bernatchez *et al.*, 1998), na avaliação do fluxo gênico (Ferreira e Grattapaglia 1998), na variabilidade (Strecker *et al.*, 2003; Barroso *et al.*, 2005), na estrutura genética em populações naturais (Hatanaka e Galetti, 2003; Spruell *et al.*, 2003) e ainda no manejo de estoques utilizados na técnica de repovoamento (Sanz *et al.*, 2006).

Os marcadores moleculares frequentemente utilizados em conservação genética incluem DNA *fingerprinting*, análise do polimorfismo no comprimento de fragmentos de restrição (RFLP), sequenciamento de genes nucleares e mitocondriais e genotipagem de diferentes locos nucleares, como microssatélites e polimorfismo no comprimento de fragmentos amplificados (AFLPs) (Aitken *et al.*, 2004), fragmentos de DNA amplificados ao acaso (RAPD) e, mais recentemente, os polimorfismos de nucleotídeos únicos (SNPs) (Piorski *et al.*, 2008).

Os microssatélites são um dos marcadores moleculares mais utilizados atualmente em estudos de genética de peixes. Também conhecidos como sequências simples repetidas (SSRs - *Single Sequence Repeats*) ou repetições

curtas em *tandem* (STRs - *Short Tandem Repeats*), representam um tipo único de sequências genômicas de DNA não codificante repetidas em *tandem*, as quais são distribuídas abundantemente pelo genoma eucariótico em função da história da evolução do genoma e dos efeitos da pressão de seleção, e demonstram altos níveis de polimorfismo alélico (Oliveira *et al.*, 2006). São marcadores codominantes, nos quais as sequências repetidas são de tamanho relativamente pequeno (sequências curtas de um a seis pb), que podem ser amplificadas facilmente pela reação da polimerase em cadeia (PCR) (Ferreira e Grattapaglia, 1998). Devido ao alto nível de polimorfismo, herança mendeliana e o fato de aparentemente seguirem um modelo evolucionário simples, os microssatélites têm sido amplamente utilizados na avaliação da diversidade genética (Strecker *et al.*, 2003; Barroso *et al.*, 2005) e na detecção de estruturação populacional em diferentes espécies de peixes (Hatanaka *et al.*, 2006).

As estimativas da taxa de mutação de microssatélites em *E. coli* em sistemas *in vivo* são elevadas ( $10^{-2}$ ), quando comparadas à taxa de mutação de ponto que ocorre na ordem de  $10^{-9}$  e  $10^{-10}$  (Hancock, 2000). Vários mecanismos têm sido sugeridos para explicar a alta taxa de mutação dos microssatélites gerando a variação no número de repetições em *tandem*: erros durante a recombinação, eventos de *crossing-over* desiguais e deslizamento da DNA polimerase durante a replicação ou reparo, entre outros (Oliveira *et al.*, 2006).

Quando sequências únicas que flanqueiam um dado microssatélite são conhecidas, *primers* complementares podem ser sintetizados e utilizados como iniciadores loco-específicos em reações de PCR. A detecção de sequências SSR, via PCR, é feita por meio da técnica de eletroforese utilizando gel de poliacrilamida, um gel adequado para a separação de segmentos que diferem por poucos pares

de bases, e mais recentemente pela técnica de pirosequenciamento descrita por Margulies *et al.* (2005). Os produtos de amplificação de diferentes indivíduos, visualizados após a eletroforese geralmente diferem em tamanho, em função de serem frequentes na população diferenças no número de unidades de repetições no loco microssatélite. Cada unidade de microssatélite assim detectada é um loco polialélico e, em um indivíduo diplóide, a amplificação de um loco resultará em uma ou duas bandas, respectivamente, dependendo se este é um homocigoto ou heterocigoto (Fungaro e Vieira, 2001).

Análises moleculares utilizando marcadores microssatélites já foram desenvolvidos para inúmeras espécies de interesse comercial, como o pacu (*Piaractus mesopotamicus*) do Pantanal motogrossense (Calcagnotto *et al.*, 2001); pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*) do rio Taquari, Mato Grosso do Sul (Revaldaves *et al.*, 2005); dourado (*Salminus brasiliensis*) da bacia do rio Paraná (Rueda *et al.*, 2011); jaú (*Zungaro jahu*) da bacia do Paraná/Paraguai (Carillo-Avila *et al.*, 2009); *Astyanax altiparanae* (Zaganini *et al.*, 2012), pirarara (*Phractocephalus hemiliopterus*) da bacia amazônica (Souza *et al.*, 2012) entre outros. Estes estudos são desenvolvidos não só para peixes neotropicais, mas também em espécies marinhas como o tubarão azul (Mendonça *et al.*, 2012), e outros grupos animais como répteis (Zucoloto *et al.*, 2006), aves (Bowie *et al.*, 2012), mamíferos (Moreno *et al.*, 2006) e vegetais (Pereira *et al.*, 2011; Mori *et al.*, 2012).

Observa-se que esse tipo de marcador molecular tem sido usado extensivamente em estudos populacionais e evolutivos, pois revelam diferentes tipos de informação e são eficazes não somente na detecção de diferenciação, mas também na detecção de diferentes processos em uma perspectiva ecológica e evolutiva (Wright e Bentzen, 1995). Seu uso tem revelado diferenças significativas

mesmo entre populações separadas por pequenas distâncias geográficas (Koskien *et al.*, 2002). É importante ressaltar que uma considerável dificuldade no uso de microssatélites é a necessidade de isolar e caracterizar estes marcadores no caso de não estarem disponíveis para a espécie em questão. Mesmo assim, uma vez disponibilizados, um grande número de indivíduos pode ser genotipado rapidamente para alelos codominantes. Diversos estudos têm demonstrado que a transferabilidade ou a amplificação cruzada (quando os *primers* são desenhados para uma determinada espécie e usados em outra) é bastante eficiente entre espécies do mesmo gênero e até mesmo de gêneros diferentes da mesma família (Oliveira *et al.*, 2006). Estudos realizados dentro do gênero *Brycon*, encontraram cerca de 89% de sucesso na transferabilidade de locos microssatélites em cinco espécies relacionadas (Sanches e Galetti 2006). Bem como Barroso *et al.* (2003) que obtiveram 100% de sucesso de amplificação de sete locos microssatélites em quatro espécies de *Brycon* relacionadas. Revaldaves *et al.* (2005) encontraram um alto nível de amplificação entre espécies de *Pimelodidae*, porém, apenas alguns *primers* mostraram resultados positivos quando testados em outras famílias.

A utilização de marcadores desenvolvidos para uma determinada espécie em espécies relacionadas têm sucesso não apenas em estudos com peixes, mas também em outros grupos animais e também em estudos de melhoramento genético vegetal. Carvalho (2007) verificou a transferabilidade de locos de microssatélites de arroz para genótipos de trigo com diferentes níveis de resistência a uma doença causada por fungo (fusariose) e verificou a existência de polimorfismo entre os genótipos contrastantes que pudessem ser associados à característica de resistência. Houve transferabilidade de 76,4% desses locos de microssatélites, no qual 23,8% foram polimórficos. Marques (2009) desenvolveu

dez marcadores microssatélites para uma espécie de camarão, *Litopenaeus vannamei*, que também se mostraram eficientes em cinco outras espécies nativas da costa brasileira em testes de transferabilidade de locos. Em uma revisão, Barbará *et al.* (2007) revelou que para peixes, no caso de testes entre espécies do mesmo gênero, a transferabilidade pode chegar à cerca de 70%, decaindo porém, para 60% em gêneros dentro de uma mesma família, levando-os a concluir que o sucesso de transferabilidade de locos microssatélites entre espécies parece estar diretamente ligado às relações filogenéticas entre os grupos testados.

### 1.5 Justificativa

As bacias de drenagem de água doce são, por definição, em algum ponto do tempo desconectadas, sendo assim esperado que as populações que habitam essas bacias sejam geneticamente estruturadas. No entanto, as paisagens e os cursos dos rios mudam através do tempo, e as drenagens adjacentes podem ser conectadas repetidamente por capturas de cabeceiras ou fusão de desembocaduras, enquanto outras drenagens podem permanecer isoladas. Um efeito dessas conexões e dissociações através do tempo pode resultar em estruturação das populações de peixes que habitam esses sistemas de água doce (Awise, 2000).

Segundo Castro (1999), as espécies de pequeno porte multiplicam-se e diferenciam-se, gerando a fração maior da diversidade ictiofaunística continental sul-americana. Com isso, este autor propõe uma hipótese de que a capacidade de deslocamento relativamente baixa e limitada das espécies de pequeno porte, que restringe as suas distribuições geográficas, pode facilitar a separação

geográfica de populações, e desta forma favorecer o surgimento de novas espécies devido ao isolamento geográfico. Desta maneira, o uso das informações genéticas na inferência demográfica forma a base sólida para o teste de hipóteses e enriquece os estudos genéticos, evolutivos e ecológicos (Knowles, 2009).

O conhecimento da estrutura populacional de uma espécie de peixe em particular é fundamental para o estabelecimento de Unidades Evolutivas Significativas, pode conservar a integridade genética e deve ser usada por ecologistas no futuro. Assim, os marcadores moleculares são extremamente úteis para o desenvolvimento de planos de manejo mais adequados para as populações naturais de peixes neotropicais (Piorski *et al.*, 2008).

Levando-se em consideração a escassez de estudos sobre a estrutura populacional de *A. altiparanae* na bacia do Alto rio Paraná, baseados em análises de marcadores moleculares microssatélites, a presente proposta visa elucidar aspectos da estrutura genética populacional desta importante espécie (Garutti e Britski, 2000) muito valorizada comercialmente por apresentar grandes vantagens econômicas para o cultivo (Meneses, 2006) e cuja importância ecológica deve ser considerada, por se tratar de uma espécie nativa cujos estoques podem ser reduzidos a partir da introdução de espécies predadoras, como por exemplo, a corvina e o tucunaré, introduzidos em diversos reservatórios do Alto Paraná (Pelicice, 2007; CESP, 1996; Latini e Petrere Jr, 2004) interferindo nos processos de manutenção e sobrevivência das mesmas (Lowe-Macconnell, 1999). Os resultados obtidos serão úteis em futuros estudos de manejo e conservação de espécies.

## 1.6 Objetivos

Este trabalho teve como principal objetivo isolar e caracterizar marcadores microssatélites para *Astyanax altiparanae* e através da análise dos marcadores desenvolvidos, verificar a organização populacional da espécie nos principais rios da bacia do Alto Paraná. E os objetivos específicos foram:

- Testar a transferibilidade dos marcadores desenvolvidos em espécies relacionadas;

- Analisar amostras de populações de *A. altiparanae* capturadas nos principais rios da bacia do Alto Paraná, quantificando a variabilidade genética dentro e entre as populações, através dos índices de diversidade;

- Comparar, através dos índices de diversidade estimados, as populações da bacia do Alto rio Paraná, com a finalidade de verificar uma possível estruturação genética;

- Averiguar se a distribuição da diversidade genética pode estar relacionada com atividades antrópicas como a construção de reservatórios artificiais do Alto rio Paraná;

A obtenção desses dados sobre estrutura populacional de *A. altiparanae* será importante para o desenvolvimento de programas de manejo e conservação da espécie na bacia do Alto rio Paraná.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Local de coleta das amostras

O sistema do Alto rio Paraná no estado de São Paulo abrange os maiores rios do estado (rio Grande, rio Tietê, rio Paranapanema, rio Aguapeí, rio do Peixe, rio Mogi-Guaçu, rio Sapucaí, rio Pardo, rio São José dos Dourados e rio Piracicaba) e uma grande diversidade de peixes (Castro e Menezes, 1998).

Além das espécies de médio e grande porte, existem também as espécies de peixes de pequeno porte que habitam, principalmente, os riachos e cabeceiras associados aos grandes rios da bacia do Alto rio Paraná (Castro e Menezes, 1998; Castro *et al.*, 2003, 2004, e 2005). Entre elas, *Astyanax altiparanae* (Figura 1) considerada como endêmica desta bacia onde possui ampla distribuição geográfica, ocorrendo desde a calha de grandes rios até as cabeceiras de riachos (Garutti e Britski, 2000).

No presente estudo, foram coletadas amostras de *A. altiparanae* (Figura 1) em diferentes pontos das principais bacias do Alto rio Paraná: **Ivinhema**, **Paranapanema**, **Tietê** e **Grande**. O mapa ilustrativo com os pontos de coleta está representado na Figura 2.



Figura 1. Representante da espécie em estudo, *Astyanax altiparanae*.

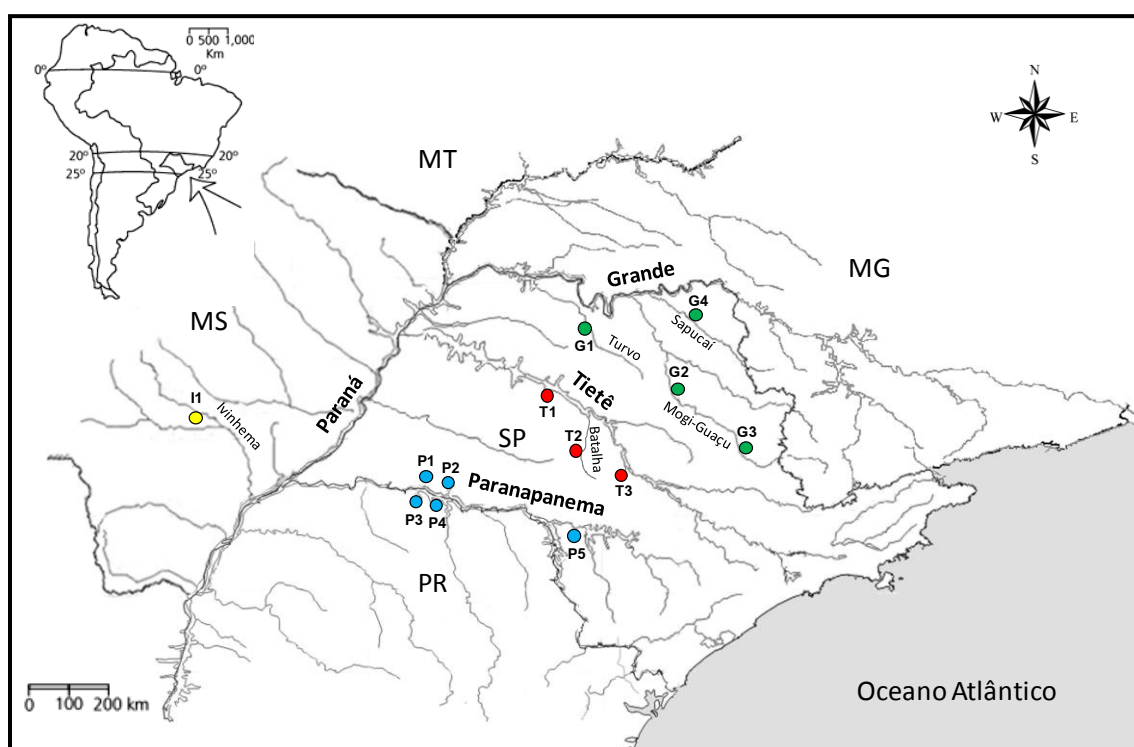


Figura 2. Mapa representativo da bacia do Alto rio Paraná com a localização dos pontos de coleta. Localidades: **I1**: bacia do rio Ivinhema; **P1** a **P5**: bacia do rio Paranapanema, **T1** a **T3**: bacia do rio Tietê e **G1** a **G4**: bacia do rio Grande.

A bacia do Ivinhema tem uma área de 38.200 km<sup>2</sup>, localizada no Estado de Mato Grosso do Sul. Seu principal rio, de mesmo nome, constitui um dos afluentes mais importantes do Alto rio Paraná em sua margem direita. Suas nascentes encontram-se junto à Serra de Maracaju, que corresponde ao divisor

de águas das bacias hidrográficas do rio Paraná e Paraguai. É formado pela confluência dos rios Brilhante, Vacaria e Dourados. Considerando a nascente do rio Dourados, o rio Ivinhema apresenta uma extensão de 595km e possui uma declividade média de  $1,5 \times 10^{-4}$ m/km e característica lítica, com padrão meândrico.

A bacia do Paranapanema, e seu principal rio, que leva o mesmo nome, é outro importante afluente da margem esquerda do rio Paraná. A partir de sua nascente, na vertente ocidental da Serra de Paranapiacaba, o Paranapanema percorre uma extensão de cerca de 660 km, com orientação geral a noroeste. Ao longo dessa extensão apresenta um desnível de 542 m, e aflui ao rio Paraná na divisa entre os municípios de Rosana (SP) e Marilena (PR). Sua área de drenagem abrange uma superfície em torno de 109.600 km<sup>2</sup> (Sampaio, 1944), estabelecendo a divisa natural entre os Estados de São Paulo e Paraná ao longo de 329,9 km, desde a foz do rio Itararé até sua confluência com o rio Paraná (Maack, 1981).

O rio Tietê nasce a 840 m de altitude, na cadeia montanhosa da Serra do Mar, a 25 km da cidade de Salesópolis (SP). Atravessa o estado de São Paulo, na direção de leste a oeste e deságua no rio Paraná, no município de Itapura (divisa entre São Paulo e Mato Grosso). Possui 1.100 km de extensão, é um rio muito sinuoso, com uma longa série de corredeiras e cachoeiras, e recebe um grande número de afluentes. Em seu trajeto, banha 62 municípios paulistas na qual encontram-se instaladas diversas usinas hidrelétricas.

A bacia do Grande possui cerca de 145.000 km<sup>2</sup> de área de drenagem, e está localizada entre os Estados de Minas Gerais e São Paulo. O Rio Grande nasce na Serra da Mantiqueira (MG) a uma altitude aproximada de 1.980 m. A

partir das cabeceiras seu curso tem o sentido Sudoeste - Nordeste, onde passa a escoar no sentido Sul - Norte. A partir daí seu curso tem sentido para Noroeste, sendo mantido até a divisa do município de Rifaina (SP) e Sacramento (MG), onde passa a correr no sentido Leste - Oeste até desaguar no rio Paraná. Em sua extensão estão localizadas aproximadamente 13 hidrelétricas (Santos e Formagio, 2000).

## **2.2 Coleta das amostras**

Foram coletados cerca de 500 exemplares da espécie *A. altiparanae* nos rios componentes da bacia hidrográfica do Alto Paraná, sendo aproximadamente 30 indivíduos em cada ponto de coleta. As coletas foram realizadas no período compreendido entre os anos de 2010 e 2012, e os apetrechos de pesca utilizados foram: peneira de malha fina, armadilhas do tipo covão e vara de pescar. Uma amostra da nadadeira foi retirada com o animal fresco e imediatamente preservado em etanol 95%. Exemplares representantes da espécie e das populações coletadas foram fixados e depositados na coleção do LaGenPe (Laboratório de Genética de Peixes), alocado na Universidade Estadual Paulista, campus Bauru e na coleção credenciada do Laboratório de Biologia e Genética de Peixes, alocado na Universidade Estadual Paulista, campus Botucatu.

## **2.3 Extração de DNA e isolamento dos Microssatélites**

A extração de DNA foi realizada utilizando o protocolo do kit comercial *Wizard Genomic DNA Purification Kit* (Promega), com algumas modificações de

acordo com o tecido utilizado. O protocolo descrito abaixo foi empregado para extração de DNA de tecidos sólidos como fígado e nadadeira. A integridade e a quantidade das amostras de DNA foram analisadas através de eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio e visualizadas em transiluminador de luz ultravioleta. Para quantificação do DNA foram utilizadas comparações diretas com um marcador padrão de peso molecular e concentração conhecidos *Low DNA Mass Ladder* 100pb (Invitrogen). As amostras de DNA obtidas estão armazenadas no LaGenPe (Laboratório de Genética de Peixes) do Departamento de Ciências Biológicas de Bauru - UNESP, formando um banco de tecidos para as análises genético-moleculares.

### 2.3.1 Protocolo de Extração de DNA

- 1 Numerar duas séries de tubos de microcentrífuga (1,5 ml);
- 2 Retirar uma pequena quantidade de tecido, adicionar nos tubos de microcentrífuga e colocar na estufa por aproximadamente 10 minutos;
- 3 Adicionar 600 µl de “Cell Lysis Solution”;
- 4 Adicionar 5 µl de “Proteinase K” e vortexar;
- 5 Levar ao banho-maria a 60°C por aproximadamente 2 horas; Esperar voltar a temperatura ambiente e continuar os procedimentos;
- 6 Adicionar 3 µl de “RNAse” e colocar no banho-maria a 37°C por 30 minutos. Esperar voltar a temperatura ambiente e continuar os procedimentos;
- 7 Adicionar 200 µl de “Protein Precipitation Solution” e misturar rapidamente no vórtex;

- 8 Levar ao gelo por 5 minutos;
- 9 Centrifugar por 4 minutos a 13.000 rpm;
- 10 Remover o sobrenadante com cuidado e transferi-lo para outro tubo com 600 µl de isopropanol a temperatura ambiente;
- 11 Inverter os tubos gentilmente até que os filamentos de DNA tornem-se visíveis;
- 12 Centrifugar por 4 minutos a 13.000 rpm e remover o sobrenadante invertendo o tubo cuidadosamente;
- 13 Adicionar 600 µl de etanol 70% (com a ponteira voltada para parede do tubo para não soltar o pellet do fundo do tubo). Não é necessário homogeneizar a amostra;
- 14 Centrifugar por 4 minutos a 13.000 rpm;
- 15 Deixar secar em temperatura ambiente ou na estufa a 37°C, por 1 hora;
- 16 Adicionar 75 µl de “DNA Rehydration Solution” por 1 hora a 65°C ou 24 horas a 4°C.

Após a extração e purificação do DNA das amostras coletadas, foi construída uma biblioteca enriquecida em microssatélites segundo Billote *et al.* (1999), Para isso, foi feita uma digestão enzimática do DNA genômico com a enzima *RsaI*; posteriormente foram ligados adaptadores nas extremidades dos fragmentos de restrição e realizada uma pré-amplificação via PCR, utilizando *Rsa21* como *primer*, com o seguinte programa: ciclo inicial de 95°C por 4 minutos, seguido de 20 ciclos de 94°C 30 segundos, 60°C por 1 minuto e 72°C por 1 minuto e uma extensão final a 72°C por 8 minutos.

Após a pré-amplificação os produtos obtidos foram purificados com o Kit *Quiaquick PCR purification* (QIAGEN). Posteriormente foi realizada uma seleção de fragmentos contendo microssatélites através das *beads* e purificação do DNA. O produto resultante da seleção de fragmentos foi amplificado para gerar fragmentos de fita dupla em maior quantidade e essa amplificação foi realizada utilizando o *primer* Rsa21 em um programa a 95°C por 1 minuto, seguida de 25 ciclos de 94°C por 40 segundos, 60°C por 1 minuto e 72°C por 2 minutos, seguida de uma extensão final de 72°C por 5 minutos.

Após a amplificação, os fragmentos foram clonados com vetor pGEM-T (Promega) e transformadas em *E. coli* XL1-Blue. Após a transformação, os clones obtidos serão estocados e mantidos em freezer -70°C. Os clones positivos foram isolados do DNA plasmidial e posteriormente foi realizada uma PCR de sequenciamento utilizando Big Dye com ciclos de 96°C por 2 minutos, seguido de 26 ciclos de 96°C por 45 segundos, 50°C por 30 segundos e 60°C por 4 minutos.

Após o sequenciamento foram analisadas as sequências obtidas no programa Chromas, a fim de buscar regiões microssatélites. Depois da identificação dos microssatélites de interesse, foram desenhados os *primers* utilizando o programa *Primer3*. Testes para otimização do PCR de *primers* microssatélites obtidos foram realizados através de alterações nas concentrações de DNA, *primers*, dNTP, e também modificando a temperatura de anelamento e o tempo de execução de cada passo da reação de PCR, além das quantidades de produto de PCR a serem aplicadas no gel. Após a otimização das reações, foram realizados testes para detectar microssatélites polimórficos. Para isso, os produtos de PCR foram visualizados em gel de poliacrilamida 6%. A coloração foi feita utilizando-se Nitrato de Prata e os géis foram fotografados e analisados

utilizando o programa Kodak Digital Science. Os alelos foram determinados através da comparação de tamanho com o *ladder* 10pb (Invitrogen) utilizando-se o programa *Kodak Digital Science*.

Uma biblioteca genômica enriquecida em microssatélites [(AC)<sub>n</sub> e (AG)<sub>n</sub>] foi construída possibilitando a aquisição de noventa e seis clones positivos, dos quais quarenta e oito foram sequenciados. Os resultados do sequenciamento possibilitaram identificar 37 clones (77,08%) que continham sequências repetitivas do tipo microssatélites. No entanto, em apenas 24 locos foram possíveis desenhar *primers* para isolamento e amplificação destas regiões. Estes 24 locos microssatélites foram testados e 11 apresentaram-se polimórficos (Artigo anexado no Apêndice 1).

#### **2.4 Amplificação dos locos microssatélites e Genotipagem automática em Analisador de DNA**

A etapa seguinte foi a aplicação dos marcadores desenvolvidos, com objetivo de verificar a composição da estrutura genética das populações de *A. altiparanae*. Esta etapa foi realizada durante o período de Doutorado-Sanduíche no Laboratório de Genética da Faculdade de Veterinária da Universidade de Santiago de Compostela, Lugo, Espanha.

A amplificação dos locos polimórficos de microssatélite procederam-se a partir das amostras de DNA genômico já extraídos conforme protocolo descrito na sessão anterior. As amostras foram devidamente quantificadas em Nanodrop (ND-1000).

Foram realizados testes de otimização para as reações de amplificação utilizando oligonucleotídeos marcados com fluorescência para posterior sequenciamento. Inicialmente, procedeu-se amplificando as regiões microssatélites através de uma reação singleplex de volume final 15 µl contendo as seguintes concentrações: 1X Taq Buffer; MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM; 100 µM dNTP; 1 µM de cada *primer* (*Forward* e *Reverse*); ~30 ng of DNA e 0,5 U Taq Polimerase (Applied Biosystems). Após a verificação da eficácia dos oligonucleotídeos marcados, foram feitos testes de otimização para as reações multiplex na qual foram encontradas duas combinações ideais contendo em cada uma delas fluorescências diferentes (**Multiplex A**: Asty4-FAM, Asty15-VIC, Asty16-PET e Asty23-NED e **Multiplex B**: Asty 12-PET, Asty13-VIC, Asty21-NED, Asty26-FAM e Asty27-FAM).

A reação de multiplex de volume final 10 µl continha as seguintes concentrações: 2 µM de mix de *primers*, marcados com fluorescência (FAM, VIC, PET e NED - Applied Biosystems); 1X Multiplex MasterMix (QIAGEN) e ~30 ng de DNA. Os produtos gerados pela PCR tanto das reações singleplex quanto das reações multiplex foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1%, utilizando 100 pb DNA *Ladder* e SYBR Safe<sup>TM</sup> (Applied Biosystems) e visualizados em transiluminador de luz branca para averiguação da amplificação. Todas as amplificações foram feitas em Termociclador Veriti<sup>TM</sup> (Applied Biosystems) e os programas utilizados estão descritos na Tabela 1.

**Tabela 1.** Condições da PCR para as reações de **Multiplex A** (Asty4, Asty15, Asty16 e Asty23) e **Multiplex B** (Asty12, Asty13, Asty21, Asty26 e Asty27) com as respectivas temperaturas de anelamentos ideais para cada conjunto em destaque.

Ciclos	Singleplex	Multiplex A	Multiplex B
1	10 min a 95°C	15 min a 95°C	15 min a 95°C
2	45 s a 94°C	30 s a 94 °C	30 s a 94°C
3	50 s a 52°C	1 min 30 s a <b>55°C</b>	1 min 30 s a <b>58°C</b>
4	50 s a 72°C	1 min a 72°C	1 min a 72°C
5	34 x (ciclo 2 a 4)	25 x (ciclo 2 a 4)	25 x (ciclo 2 a 4)
6	10 min a 72°C	30 min a 60°C	30 min a 60°C

Posteriormente, os fragmentos amplificados foram genotipados utilizando Analisador de DNA ABI 3730 (Applied Biosystems), e a visualização dos resultados foi feita através do programa GeneMapper 3.7 Software (Applied Biosystems). O tamanho dos alelos foi obtido por comparação com o marcador interno GeneScan TM-500Liz<sup>®</sup> na matriz de análise de sequenciador G5 Matrix Standard Set DS-33 [6FAMTM, VICTM, NEDTM, PETTM, LIZ<sup>®</sup>]. Os resultados foram organizados em planilhas de dados do Excel e submetidas à análise em programas computacionais.

## 2.5 Teste de transferabilidade

Foram realizados testes de amplificação cruzada em dez espécies relacionadas (*Astyanax paranae*, *Astyanax bockemanni*, *Astyanax fasciatus*, *Astyanax jacuhiensis*, *Astyanax abramis*, *Astyanax shubarti*, *Astyanax ribeirae*, *Salminus maxillosus*, *Brycon amazonicus* e *Brycon hilarii*). Foram utilizados cinco exemplares de cada uma das espécies, cedidos pelo Laboratório de Biologia e Genética de Peixes da Unesp de Botucatu. O DNA genômico foi extraído utilizando kit de purificação comercial *Wizard Genomic DNA* (Promega), seguindo

o protocolo anteriormente mencionado. A integridade e a quantidade das amostras de DNA foram analisadas através de eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio e visualizadas em transiluminador, sob luz ultravioleta. A reação utilizada na amplificação dos locos das espécies relacionadas, bem como a temperatura de anelamento (TA) ideal para cada espécie está descrita no artigo já publicado (Apêndice 1). Com relação à padronização da técnica do PCR, foram realizados ensaios variando-se as quantidades de alguns reagentes da reação, temperatura de anelamento dos *primers* e tempos nos ciclos de amplificação no termociclador, na tentativa de otimizar a técnica.

Após a amplificação, 5µl do produto de PCR foram aplicados em gel de poliacrilamida 6% adicionados de 2µl de tampão de carregamento (*Blue Juice*) e 5µl de marcador de peso molecular *Ladder* 10pb (Invitrogen). As corridas foram realizadas em cuba de eletroforese usando tampão TBE 1X. Após a corrida, foi feita a coloração do gel utilizando-se Nitrato de Prata, conforme descrito abaixo:

#### 2.5.1 Solução Fixadora:

- 15 ml de etanol absoluto
- 1 ml de ácido acético
- 0,3 g de nitrato de prata
- Dissolver em 150 ml de água destilada

### 2.5.2 Solução Reveladora:

- 10 ml de hidróxido de sódio 30%
- 2 ml de formaldeído
- Completar com água destilada para 150 ml

### 2.5.3 Procedimento de Coloração:

- Mergulhar o gel na solução fixadora, agitar levemente e deixar por 15 minutos;
- Descartar solução fixadora e lavar o gel brevemente com água destilada;
- Verter a solução reveladora no recipiente com o gel e agitar suavemente até que as bandas apareçam.

Os géis foram fotografados em transiluminador de luz branca. Os alelos foram determinados através da comparação de tamanho com o *Ladder* 10pb (Invitrogen) utilizando-se o programa *Kodak Digital Science*.

## 2.6 Análises estatísticas

A análise da estrutura genética de *Astyanax altiparanae* foi realizada dentro de cada população e entre as populações.

### 2.6.1 Análise intrapopulacional

Foram calculados o número de alelos por loco ( $N_a$ ), a heterozigosidade observada e esperada ( $H_o$ ,  $H_e$ ) através do programa Pop100gene (disponível em <http://www.montpellier.inra.fr/URLB/pop100gene/pop100gene.html>), o desvio do equilíbrio de Hardy-Weinberg ( $EHW$ ), através do programa GENEPOP 4.0 (Rousset, 2008), coeficiente de endogamia ( $F_{IS}$ ) e a riqueza alélica ( $A_r$ ) através do FSTAT 2.9.3 (Goudet, 2001). As frequências de alelos nulos para os locos que apresentaram desvio do equilíbrio de Hardy-Weinberg foram calculadas através do método de Brookfield (1996) utilizando-se o programa MICRO-CHECKER 2.2.1 (van Oosterhout *et al.*, 2004).

### 2.6.2 Análise interpopulacional

Para investigar a ocorrência de estruturação genética entre as populações de *A. altiparanae*, foi utilizado o índice  $F_{ST}$  (Weir e Cockerham, 1984), assumindo o modelo de alelos infinitos (IAM). Esta medida foi calculada para todos os *loci* e para todos os pares de populações implementados no programa ARLEQUIN 3.11 (Excoffier *et al.*, 2005). Suas significâncias foram testadas por 1000 permutações. Valores de referência foram utilizados para comparar os resultados obtidos, valores entre 0,00 a 0,05 indica baixa diferenciação; 0,05 a 0,15 moderada diferenciação; 0,15 a 0,25 alta diferenciação e  $> 0,25$ , elevada diferenciação genética (Wright, 1978).

O programa STRUCTURE 2.3.1 (Pritchard *et al.*, 2000) foi utilizado para verificar a estrutura populacional. Este programa usa inferência Bayesiana para, a partir dos genótipos multilocos dos indivíduos, estimar o número de populações

que melhor explica os dados, ao mesmo tempo em que os indivíduos são atribuídos às populações. O critério para agrupamento em populações é o de minimizar os desequilíbrios de Hardy-Weinberg e de ligação dentro delas. Assim as populações são definidas pelos dados, sem qualquer inferência *a priori*. Para a determinação do número de populações ( $K$ ) existentes, utilizou-se o modelo de ancestralidade misturada (*Admixture*), com os alelos correlacionados, que permite a resolução máxima na separação das populações considerando os modelos de  $K$  variando entre 1 e 14, com 20 réplicas cada. Os testes foram realizados por meio da cadeia de Markov-Monte Carlo (MCMC), com períodos de *burn-in* de 5.000 e 50.000 réplicas, inicialmente para todas as populações como um todo. Após, o valor de  $K$  mais provável foi estimado o de acordo com o método proposto por Evanno *et al.* (2005).

A correlação entre a distância genética ( $F_{ST}/(1 - F_{ST})$ ) e a distância geográfica (Km) foi feita através do teste de Mantel (1967), para verificar a possível existência de padrão de isolamento por distância (IBD, Wright, 1943). Esta análise foi implementada no programa IBDWS (Bohonak, 2002) e sua significância foi testada com 1000 permutações. As distâncias geográficas em quilômetros foram estimadas via leito do rio, calculada pelo software Google Earth.

A análise de variância molecular (AMOVA) implementada no programa ARLEQUIN 3.11 (Excoffier *et al.*, 2005) foi utilizada para verificar a existência de grupos e a divisão da variância entre e dentro das populações e sua significância testada com 1.000 permutações. Essa análise contribui para quantificar o grau de variabilidade genética encontrada. A variabilidade genética pode estar organizada de três maneiras diferentes: i) variabilidade genética não estruturada entre

populações (uma só população); ii) mesmo nível de variabilidade genética, mas organizada entre populações e iii) mesma magnitude de variabilidade genética, mas organizada dentro e entre as populações.

Foi realizada a análise de escalonamento multidimensional (MDS) utilizando a distância genética  $D_A$  (Nei *et al.*, 1983) e confeccionado um gráfico que representa de forma bidimensional a dispersão das localidades em um espaço multidimensional. Esta análise foi feita pelo programa IBM® SPSS Statistics versão 20 (IBM® Corp. Released, 2011). Adicionalmente a distância genética  $D_A$  foi utilizada na construção de um dendrograma para verificar as relações entre as populações, através do programa POPTREE 1.32 (Yeh *et al.*, 1997), utilizando o método *Neighbor-Joining*.

### 3 RESULTADOS

#### 3.1 Isolamento e caracterização dos locos microssatélites

Os resultados da etapa de isolamento, caracterização e transferabilidade dos locos microssatélites estão descritos no artigo "Isolation and characterization of microsatellite loci in the Neotropical fish *Astyanax altiparanae* (Teleostei: Characiformes) and cross-species amplification", publicado na revista *Journal of Genetics* (Apêndice 1). Do total de locos polimórficos isolados e caracterizados, foram selecionados os mais adequados segundo critérios do Laboratório de Genética da Faculdade de Veterinária da Universidade de Santiago de Compostela, Lugo, Espanha, como eficácia dos oligonucleotídeos marcados com fluorescência, forma e intensidade dos picos de sequenciamento gerados pelo Analisador de DNA.

#### 3.2 Análise intrapopulacional

Foram analisados 419 indivíduos de 13 localidades distribuídas em rios de 4 bacias hidrográficas do Alto Paraná. Do total de indivíduos genotipados, com base em oito locos microssatélites, as bacias hidrográficas que apresentaram maior diversidade genética foram a do rio Tietê, seguida da bacia do rio Paranapanema, bacia do rio Ivinhema e bacia do rio Grande, esta última com a menor diversidade genética encontrada (Tabela 2).

**Tabela 2.** Variabilidade genética nas localidades. Número de indivíduos analisados ( $N$ ); número de alelos ( $N_a$ ); riqueza alélica ( $A_r$ ); heterozigosidade observada ( $H_o$ ); heterozigosidade esperada ( $H_E$ ); coeficiente de endogamia ( $F_{is}$ ) e teste global de Fisher para o equilíbrio de Hardy-Weinberg. NS, não significativo; \*  $P < 0,05$ .

Bacia	Rio	Localidade	N	$N_a$	$A_r$	$H_o$	$H_E$	$F_{is}$	Teste global de Fisher
Ivinhema	Parapanema	Papagaio	43	20,250	11,938	0,801	0,877	0,087	*
		P1	43	20,125	12,808	0,797	0,889	0,105	*
		P2	27	16,625	12,196	0,765	0,883	0,136	*
		P3	32	13,125	8,985	0,742	0,808	0,083	*
		P4	27	11,375	9,191	0,775	0,845	0,085	*
		P5	30	17,500	11,658	0,752	0,871	0,138	*
	<b>Média</b>		<b>15,750</b>	<b>10,967</b>	<b>0,766</b>	<b>0,859</b>	<b>0,109</b>		
Tietê	Sucuri	T1	54	22,125	12,157	0,763	0,872	0,126	*
		T2	31	14,875	10,481	0,743	0,852	0,130	*
		T3	22	13,125	10,783	0,782	0,871	0,105	*
		<b>Média</b>		<b>16,708</b>	<b>11,140</b>	<b>0,763</b>	<b>0,865</b>	<b>0,120</b>	
Grande	Turvo	G1	16	10,875	10,233	0,642	0,844	0,246	*
		G2	16	6,375	5,972	0,618	0,690	0,107	NS
		G3	34	17,250	11,285	0,754	0,860	0,125	*
		G4	44	19,875	11,321	0,745	0,839	0,112	*
		<b>Média</b>		<b>13,594</b>	<b>9,703</b>	<b>0,690</b>	<b>0,808</b>	<b>0,148</b>	

Na bacia hidrográfica do rio Ivinhema foi analisada apenas uma localidade, I1, que apresentou valores de 20,250 para o número de alelos por loco, riqueza alélica de 11,938 e 0,877 de diversidade gênica.

Na bacia hidrográfica do rio Paranapanema, foram analisadas 5 localidades, e a que apresentou maior variabilidade foi P1, cujo número de alelos por loco foi 20,125, a riqueza alélica foi de 12,808, e a diversidade gênica foi de 0,889, sendo estes dois últimos índices os mais altos encontrados considerando todas as bacias analisadas. A localidade P4 apresentou o menor número de alelos por loco (11,375) e P3 a menor riqueza alélica (8,985) e diversidade gênica (0,808).

Na bacia hidrográfica do rio Tietê foram analisadas 3 localidades, e T1 foi a que apresentou maior variabilidade, com número de alelos por loco de 22,125, ressaltando que este foi o maior valor encontrado para este índice em todas as bacias analisadas, a riqueza alélica desta localidade foi de 12,157 e a diversidade gênica também teve um valor elevado, 0,872. Os menores valores foram encontrados em T2, riqueza alélica de 10,481 e diversidade gênica de 0,852. E a localidade T3 apresentou o menor valor de número de alelos por loco (13,125).

A bacia com a menor diversidade foi a do rio Grande. Nesta bacia, a localidade G4 apresentou os maiores valores de alelos por loco (19,875) e de riqueza alélica (11,321) e em G3 foi observada a maior diversidade gênica (0,86). A localidade G2 foi a que apresentou os menores valores de número de alelos por loco (6,375), riqueza alélica (5,972) e diversidade gênica (0,690) (Tabela 2).

Assumindo-se o equilíbrio de Hardy-Weinberg, foi revelado um desvio significativo para a maioria das localidades analisadas. Apenas para a localidade G2 este valor não foi significativo. A análise feita pelo Micro-Checker revelou a presença de alelos nulos para a maioria das localidades que apresentaram desequilíbrio de Hardy-Weinberg sugerindo déficit de heterozigotos. Nas localidades P2, T1 e G1, não houve registro de alelos nulos, porém os valores do coeficiente de endogamia  $F_{IS}$  foram positivos, assim como nas demais localidades, sugerindo da mesma maneira o déficit de heterozigotos (Tabela 2).

Com relação aos 8 locos analisados, Asty15 apresentou os maiores valores de diversidade genética, com média de número de alelos por loco 27,462, riqueza alélica 19,256, diversidade gênica de 0,946 e apenas uma localidade em desequilíbrio de Hardy-Weinberg (G1). E Asty12 foi o loco que apresentou os menores valores, média do número de alelos por loco 7,154, riqueza alélica 6,082, diversidade gênica 0,662 e a mesma localidade (G1) em desequilíbrio de Hardy-Weinberg. O loco que apresentou mais localidades em desequilíbrio foi Asty21, que apenas a localidade G2 apresentou-se em equilíbrio, porém o valor do coeficiente de endogamia  $F_{IS}$  foi positivo para todas as localidades. Opostamente, Asty4 e Asty27 apresentaram todas as localidades em equilíbrio de Hardy-Weinberg (Tabela 3).

**Tabela 3.** Variabilidade genética por loco. Número de indivíduos analisados ( $N$ ); número de alelos ( $N_a$ ); riqueza alélica ( $A_r$ ); heterozigosidade observada ( $H_o$ ); heterozigosidade esperada ( $H_e$ ); coeficiente de endogamia ( $F_{is}$ ) e teste do equilíbrio de Hardy-Weinberg ( $HWE$ ); \*  $P < 0,05$  após correção de Bonferroni.

	I1	P1	P2	P3	P4	P5	T1	T2	T3	G1	G2	G3	G4	Média
<b>Asty4</b>														
N	43	43	27	32	27	30	54	31	22	15	16	34	44	
$N_a$	20	20	21	13	11	23	21	19	14	12	7	21	25	17,462
$A_r$	12,292	12,450	14,541	9,433	9,209	14,839	10,853	12,984	11,546	11,276	6,781	12,783	12,847	12,888
$H_o$	0,977	0,938	0,963	0,86	0,963	0,9	0,87	0,871	0,864	0,8	0,75	0,912	0,955	0,894
$H_e$	0,9	0,907	0,938	0,876	0,883	0,941	0,878	0,927	0,891	0,851	0,829	0,902	0,911	0,895
$F_{is}$	-0,086	-0,034	-0,027	0,017	-0,093	0,045	0,009	0,061	0,032	0,061	0,098	-0,011	-0,048	-0,007
HWE	0,613	0,121	0,135	0,492	0,247	0,204	0,587	0,178	0,039	0,043	0,432	0,116	0,565	
<b>Asty12</b>														
N	43	43	27	32	27	30	54	31	22	16	16	34	44	
$N_a$	9	9	10	5	9	8	9	5	5	5	2	7	10	7,154
$A_r$	6,097	6,339	7,373	4,214	6,836	6,130	6,032	4,360	4,908	4,909	2,000	5,544	5,883	6,082
$H_o$	0,605	0,719	0,778	0,581	0,741	0,767	0,63	0,677	0,818	0,375	0,375	0,853	0,682	0,662
$H_e$	0,689	0,705	0,739	0,563	0,695	0,715	0,689	0,672	0,722	0,581	0,508	0,687	0,639	0,662
$F_{is}$	0,124	-0,020	-0,053	-0,032	-0,068	-0,074	0,086	-0,009	-0,137	0,362	0,268	-0,245	-0,067	-0,009
HWE	0,042	0,104	0,279	0,948	0,740	0,245	0,076	0,949	0,651	0,009*	0,348	0,681	0,839	
<b>Asty15</b>														
N	42	43	27	32	27	30	53	30	21	16	16	34	44	
$N_a$	41	40	21	21	16	29	41	23	21	20	11	34	39	27,462
$A_r$	18,875	20,810	15,179	13,552	12,842	17,400	18,709	14,573	16,130	18,006	9,784	18,242	19,537	19,256
$H_o$	0,952	0,969	0,852	0,93	0,963	0,9	0,943	0,867	0,905	1,000	0,813	0,912	0,955	0,920
$H_e$	0,969	0,98	0,952	0,938	0,929	0,96	0,97	0,924	0,955	0,974	0,804	0,962	0,975	0,946
$F_{is}$	0,017	0,011	0,107	0,009	-0,037	0,064	0,027	0,063	0,054	-0,028	-0,010	0,053	0,022	0,029
HWE	0,483	1,000	0,137	0,762	0,730	0,133	0,646	0,057	0,484	0,017*	0,569	0,311	0,537	
<b>Asty16</b>														
N	41	43	24	32	27	30	52	30	21	13	14	33	37	
$N_a$	21	17	15	16	12	16	28	14	17	7	8	11	16	15,231
$A_r$	11,742	11,015	11,401	9,532	9,767	11,245	13,546	9,662	13,553	7,000	7,640	7,854	9,902	12,251
$H_o$	0,683	0,563	0,519	0,744	0,75	0,533	0,635	0,6	0,762	0,385	0,357	0,424	0,378	0,564
$H_e$	0,869	0,877	0,894	0,818	0,878	0,858	0,905	0,847	0,937	0,84	0,622	0,778	0,831	0,843
$F_{is}$	0,216	0,362	0,425	0,091	0,148	0,382	0,301	0,295	0,191	0,552	0,435	0,459	0,548	0,320
HWE	0,000*	0,000*	0,000*	0,354	0,034	0,000*	0,000*	0,002*	0,055	0,000*	0,008*	0,000*	0,000*	
<b>Asty21</b>														
N	38	41	20	30	24	28	45	29	22	16	16	32	42	

	I1	P1	P2	P3	P4	P5	T1	T2	T3	G1	G2	G3	G4	Média
$N_a$	17	17	17	11	10	12	18	13	8	12	4	16	16	13,154
$A_r$	11,341	12,764	12,819	7,885	8,247	8,212	11,246	9,809	7,290	11,125	3,813	11,105	8,885	12,411
$H_o$	0,474	0,6	0,417	0,537	0,3	0,286	0,511	0,414	0,409	0,438	0,625	0,344	0,476	0,448
$H_E$	0,886	0,914	0,883	0,835	0,773	0,81	0,863	0,831	0,798	0,901	0,659	0,853	0,707	0,824
$F_{IS}$	0,469	0,347	0,533	0,360	0,618	0,651	0,410	0,507	0,493	0,523	0,054	0,601	0,329	0,456
$HWE$	0,000*	0,000*	0,000*	0,000*	0,000*	0,000*	0,000*	0,000*	0,000*	0,000*	0,164	0,000*	0,000*	
<b>Asty23</b>														
$N$	43	41	27	32	27	30	53	31	22	15	15	34	43	
$N_a$	12	11	9	9	9	11	15	9	11	7	5	11	11	10,000
$A_r$	8,452	8,512	6,772	6,783	7,598	8,161	9,554	7,077	8,669	6,825	4,733	7,925	7,945	8,839
$H_o$	0,86	0,719	0,667	0,512	0,778	0,833	0,755	0,774	0,682	0,333	0,4	0,853	0,744	0,685
$H_E$	0,843	0,837	0,765	0,699	0,85	0,831	0,806	0,804	0,837	0,798	0,57	0,833	0,807	0,791
$F_{IS}$	-0,021	0,144	0,131	0,269	0,087	-0,003	0,065	0,037	0,189	0,591	0,306	-0,025	0,079	0,104
$HWE$	0,407	0,085	0,197	0,019	0,172	0,890	0,353	0,482	0,021	0,000*	0,130	0,199	0,265	
<b>Asty26</b>														
$N$	42	43	27	31	27	30	54	31	22	16	16	34	44	
$N_a$	27	24	23	17	12	22	24	20	15	15	7	24	24	19,538
$A_r$	15,531	15,824	16,605	12,445	9,715	13,920	13,972	14,489	12,623	14,135	6,403	15,804	13,987	15,396
$H_o$	0,976	0,903	0,963	0,86	0,852	0,867	0,87	0,839	0,955	0,938	0,688	0,912	0,909	0,887
$H_E$	0,95	0,955	0,962	0,912	0,865	0,926	0,933	0,945	0,93	0,948	0,694	0,954	0,931	0,916
$F_{IS}$	-0,028	0,055	-0,001	0,057	0,016	0,065	0,068	0,114	-0,027	0,011	0,009	0,045	0,023	0,036
$HWE$	0,243	0,178	0,906	0,255	0,020	0,127	0,049	0,003*	0,941	0,000*	0,700	0,667	0,337	
<b>Asty27</b>														
$N$	42	43	27	32	27	30	54	31	22	15	16	34	44	
$N_a$	15	23	17	13	12	19	21	16	14	9	7	14	18	15,231
$A_r$	11,170	14,747	12,877	8,035	9,314	13,355	13,342	10,896	11,548	8,584	6,624	11,024	11,581	12,927
$H_o$	0,881	0,969	0,963	0,907	0,852	0,933	0,889	0,903	0,864	0,867	0,938	0,824	0,864	0,896
$H_E$	0,905	0,938	0,932	0,822	0,888	0,928	0,932	0,87	0,901	0,857	0,831	0,913	0,906	0,894
$F_{IS}$	0,027	-0,033	-0,034	-0,105	0,042	-0,006	0,047	-0,039	0,042	-0,011	-0,134	0,099	0,048	0,004
$HWE$	0,744	0,767	0,799	0,957	0,040	0,155	0,033	0,749	0,430	0,188	0,501	0,103	0,620	

Alelos exclusivos foram encontrados em todas as localidades e para todos os locos, como visto na Tabela 4. Os resultados para este índice foram proporcionais aos valores obtidos de número de alelos por loco, sendo que a localidade com maior número de alelos por loco (T1) foi a que apresentou maior número de alelos exclusivos (17), e G2 cujo número de alelos por loco foi o mais baixo de todas as localidades analisadas, apresentou apenas 1 alelo exclusivo.

**Tabela 4.** Alelos exclusivos por loco considerando todas as localidades.

	I1	P1	P2	P3	P4	P5	T1	T2	T3	G1	G2	G3	G4
<b>Asty4</b>	2	-	-	1	-	2	2	1	-	-	-	2	1
<b>Asty12</b>	1	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
<b>Asty15</b>	6	3	1	2	1	3	4	1	-	2	-	1	6
<b>Asty16</b>	2	3	1	3	4	2	5	1	4	-	1	-	1
<b>Asty21</b>	1	-	1	-	4	-	1	-	-	-	-	1	1
<b>Asty23</b>	-	-	1	-	-	-	3	-	-	-	-	-	-
<b>Asty26</b>	1	1	1	1	-	1	1	-	-	2	-	1	1
<b>Asty27</b>	1	1	1	-	-	2	1	-	2	-	-	1	-
<b>Total</b>	<b>14</b>	<b>8</b>	<b>7</b>	<b>7</b>	<b>9</b>	<b>10</b>	<b>17</b>	<b>3</b>	<b>6</b>	<b>4</b>	<b>1</b>	<b>6</b>	<b>11</b>

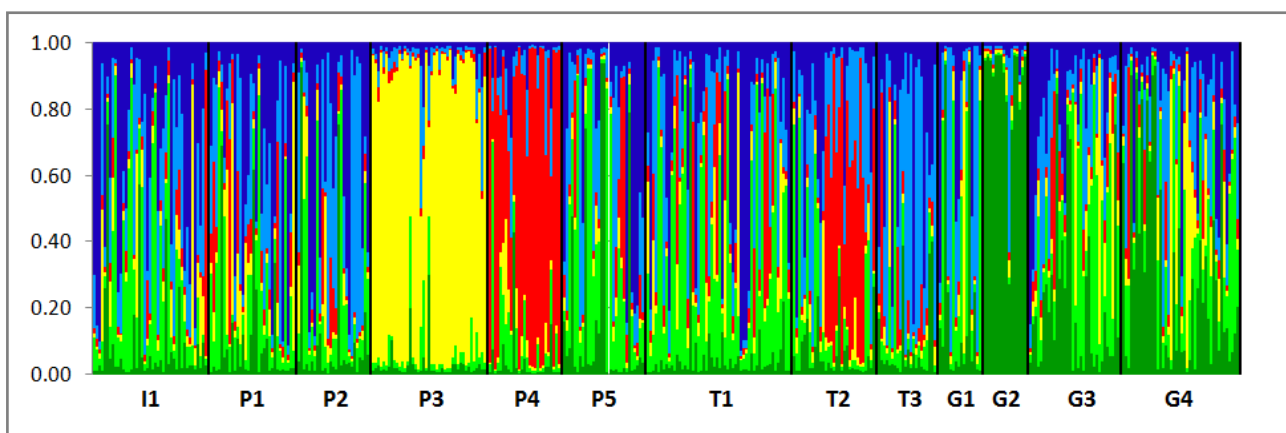
### 3.3 Análise interpopulacional

A diferenciação genética entre os pares de populações de *A. altiparanae*, estimada pelo índice  $F_{ST}$ , em sua maioria foi baixa. O menor valor encontrado foi para o par I1 x P1 (0,00148, valor estatisticamente não significativo) e maior diferenciação foi observada entre P4 x G2 (0,11358, valor estatisticamente significativo). Apenas os valores obtidos na comparação de G2 com todas as demais, e entre P3 x P4, apresentaram diferenciação genética moderada, como mostrado na Tabela 5.

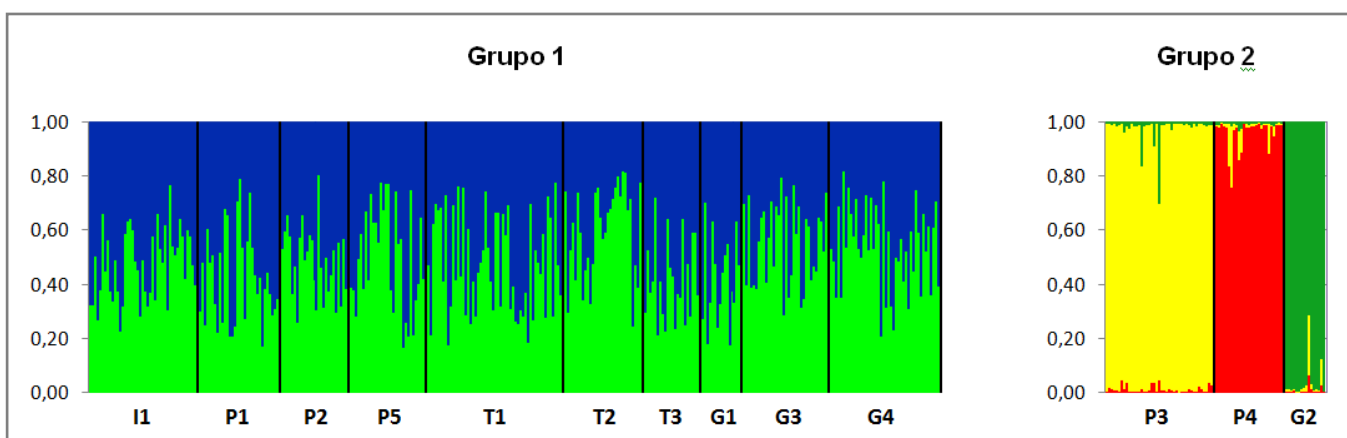
**Tabela 5.** Matriz do coeficiente de diferenciação genética e  $F_{ST}$  (Weir e Cockerham, 1984) par a par das localidades. \*P<0,05.

	I1	P1	P2	P3	P4	P5	T1	T2	T3	G1	G2	G3
I1	-											
P1	0,00148	-										
P2	0,00303	0,00335	-									
P3	0,02579*	0,01913*	0,02893*	-								
P4	0,02834*	0,02790*	0,03200*	0,05869*	-							
P5	0,00443	0,00506	0,00172	0,02724*	0,03142*	-						
T1	0,00590*	0,00459*	0,00793*	0,02428*	0,02755*	0,00612*	-					
T2	0,00945*	0,00738*	0,01094*	0,03494*	0,03146*	0,01105*	0,01432*	-				
T3	0,01305*	0,01091*	0,01880*	0,04540*	0,03307*	0,01866*	0,02154*	0,02244*	-			
G1	0,02400*	0,02884*	0,02960*	0,04786*	0,03389*	0,02194*	0,02475*	0,03656*	0,03014*	-		
G2	0,08792*	0,08424*	0,08941*	0,08426*	0,11358*	0,09519*	0,08880*	0,09463*	0,10935*	0,11003*	-	
G3	0,00409*	0,00477*	0,01039*	0,02946*	0,03002*	0,00674*	0,01026*	0,01114*	0,02129*	0,02002*	0,07853*	-
G4	0,00872*	0,01481*	0,01411*	0,03094*	0,03303*	0,01034*	0,01739*	0,01837*	0,02672*	0,01717*	0,07693*	0,00495*

A análise Bayesiana gerada pelo programa STRUCTURE foi realizada para avaliar os níveis de relação entre as localidades e a distinção do número de *clusters* ( $K$ ), que representam cada uma das populações. Para encontrar o valor de  $K$  ideal foi utilizado o método de Evanno *et al.* (2005). Estes autores delinearam uma metodologia para a determinação do  $K$  mais provável que utiliza o delta  $K$  ( $\Delta K$ ) dos valores de  $\ln P(D)$  gerados pelo programa STRUCTURE. Através desse método obteve-se  $K=6$  como sendo o número de populações encontradas (Figura 3). Nesta análise foi observado que três localidades aparecem claramente distintas das demais, P3, P4 e G2, confirmando os valores de moderada estruturação genética da análise pelo índice  $F_{ST}$  pareado. Portanto, uma nova análise foi feita com as três localidades separadamente, gerando dois novos gráficos, **grupo 1** composto pelas dez localidades que não apresentaram distinção clara entre elas (P1, P2, P5, T1, T2, T3, G1, G3 e G4) (Figura 4) e **grupo 2** composto pelas três localidades com clara separação (P3, P4 e G2) (Figura 4). Utilizando o mesmo método de determinação do valor de  $K$ , no grupo 1 obteve-se  $K=2$ , porém não houve divisão das populações quanto à localidade ou à bacia hidrográfica a qual pertencem, ilustrado pela ausência de divisão vertical das cores. E no grupo 2, o valor encontrado foi  $K=3$ , e notou-se uma clara divisão entre as três localidades representadas pela divisão vertical das cores.



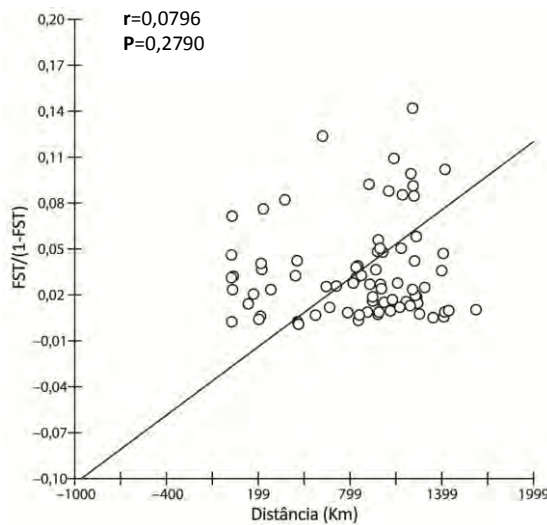
**Figura 3.** Estrutura “bar plot” das localidades, estimada pela análise bayesiana através do programa STRUCTURE. Cada uma das cores indica um *cluster* baseado em semelhanças genotípicas.  $K=6$ .



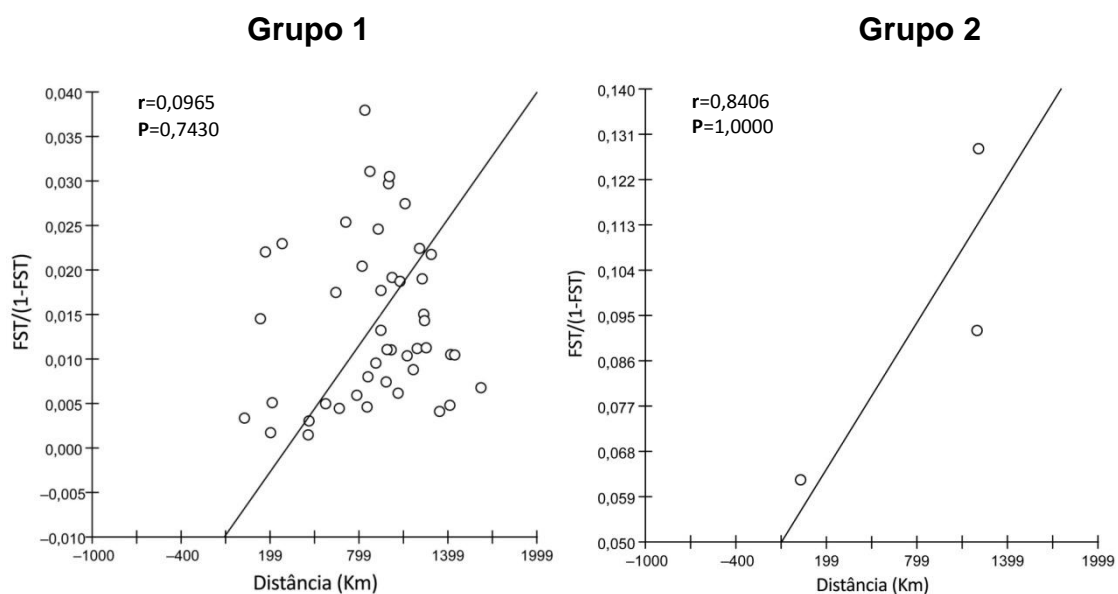
**Figura 4.** Estrutura “bar plot” das localidades dos **grupos 1 e 2**, estimadas pela análise bayesiana através do programa STRUCTURE. Cada uma das cores indica um *cluster* baseado em semelhanças genotípicas.  $K=2$ , grupo 1;  $K=3$ , grupo 2.

A correlação entre a distância genética e a distância geográfica foi testada através da análise do isolamento por distância (IBD), verificado pelo teste de Mantel. O coeficiente de correlação obtido entre a distância genética [ $F_{ST}/(1-F_{ST})$ ] e geográfica (medida em quilômetros) não foi significativo ( $r=0,0796$ ;  $P=0,2790$ ) (Figura 5). A análise feita com o grupo 1 apresentou um valor mais elevado do coeficiente de correlação ( $r=0,0965$ ;  $P=0,7430$ ) porém não significativo, o mesmo

ocorreu no grupo 2, cujo valor foi mais elevado que o apresentado nas duas análises anteriores ( $r=0,8406$ ;  $P=1,0000$ ), mas também sem significância estatística. Estes resultados indicam que não há correlação entre distância genética e distância geográfica entre as localidades analisadas, mesmo quando de analisa os grupos separadamente (Figura 6).



**Figura 5.** Isolamento por distância (IBD) das localidades. Os pontos representam os pares de valores de distância genética [ $F_{ST}/(1-F_{ST})$ ] e geográfica (Km) entre as localidades.



**Figura 6.** Isolamento por distância (IBD) das localidades do **grupo 1** e **2**. Os pontos representam os pares de valores de distância genética [ $F_{ST}/(1-F_{ST})$ ] e geográfica (Km) entre as populações.

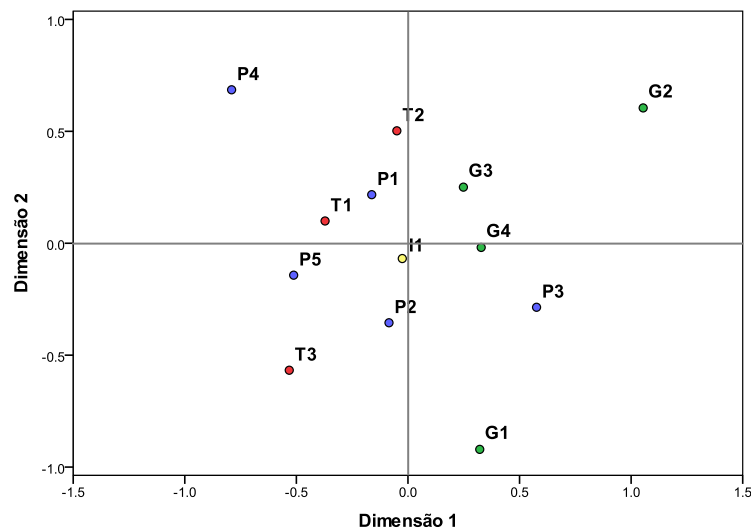
A análise hierárquica de variância molecular (AMOVA) utilizando o índice  $F_{ST}$  mostrou que a maior parte da variação genética das populações de *A. altiparanae* se encontra dentro das localidades. O mesmo foi observado para os grupos 1 e 2 de forma crescente, como mostrado na tabela abaixo (Tabela 6). Observou-se um aumento na porcentagem de variação entre bacias no grupo 1 (0,06%) e no grupo 2 (3,55%) em relação à todas as localidades juntas, que apresentou valor negativo (-0,30%). Nas três análises, os valores de diferenciação genética ( $F_{ST}$ ) dentro das localidades foram estatisticamente significativo.

**Tabela 6.** Análise de Variância Molecular (AMOVA) das localidades. \* $P < 0,05$ .

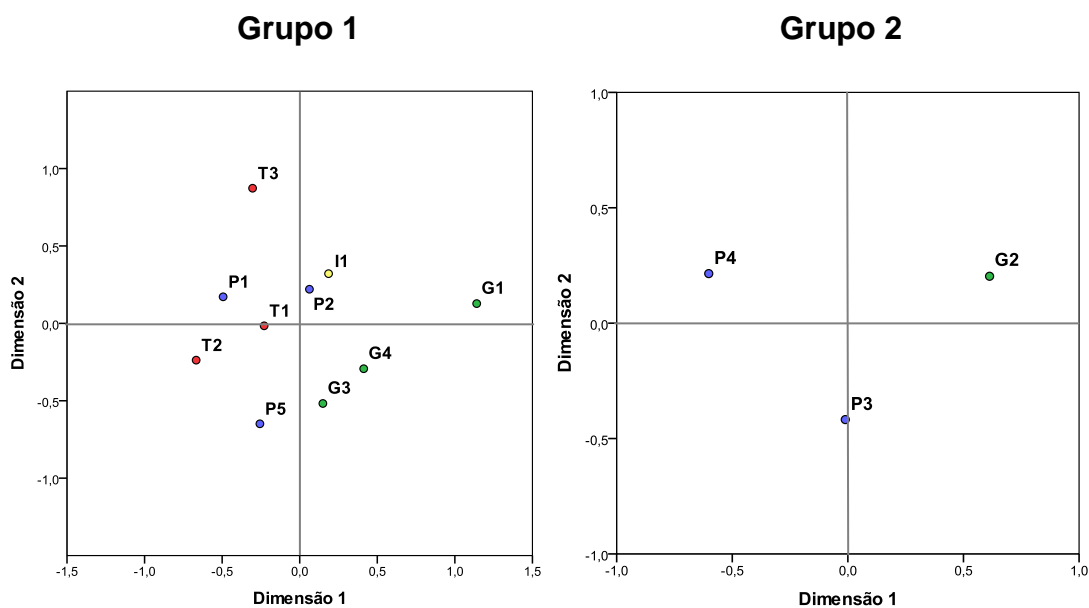
	Fonte de Variação	Componentes da Variância	% de Variação	Índice de Fixação	
Todas as localidades	Entre Bacias	-0,00779 Va	-0,30	-0,00299	$F_{CT}$
	Dentro das Bacias	0,06880 Vb	2,65	0,02638*	$F_{SC}$
	Dentro das Localidades	2,53914 Vc	97,65	0,02346*	$F_{ST}$
	Total	2,60015			
Grupo 1	Entre Bacias	0,00169 Va	0,06	0,00065	$F_{CT}$
	Dentro das Bacias	0,02935 Vb	1,12	0,01125*	$F_{SC}$
	Dentro das Localidades	2,58095 Vc	98,81	0,01189*	$F_{ST}$
	Total	2,61169			
Grupo 2	Entre Bacias	0,09305 Va	3,55	0,03547	$F_{CT}$
	Dentro das Bacias	0,15331 Vb	5,84	0,06059*	$F_{SC}$
	Dentro das Localidades	2,37648 Vc	90,61	0,09392*	$F_{ST}$
	Total	2,62320			

A análise de escalonamento multidimensional (MDS) da matriz de distância  $D_A$  foi utilizada para ilustrar a relação entre as localidades em duas dimensões. Foi

observado que as três localidades da bacia do rio Grande permaneceram em dois quadrantes, as demais localidades ficaram distribuídas em 3 quadrantes (Figura 7). A análise por grupo, mostrou o mesmo padrão de distribuição espacial no grupo 1, e no grupo 2, as localidades estão separadas em dois agrupamentos, bacia do Paranapanema (P3 e P4) e bacia do rio Grande (G2) (Figura 8).

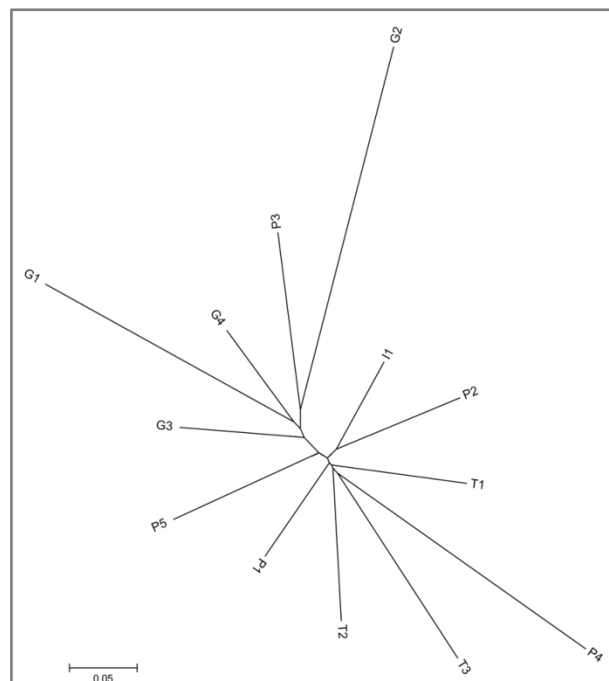


**Figura 7.** Análise de escalonamento multidimensional (MDS) a partir da matriz de distância  $D_A$  das localidades.

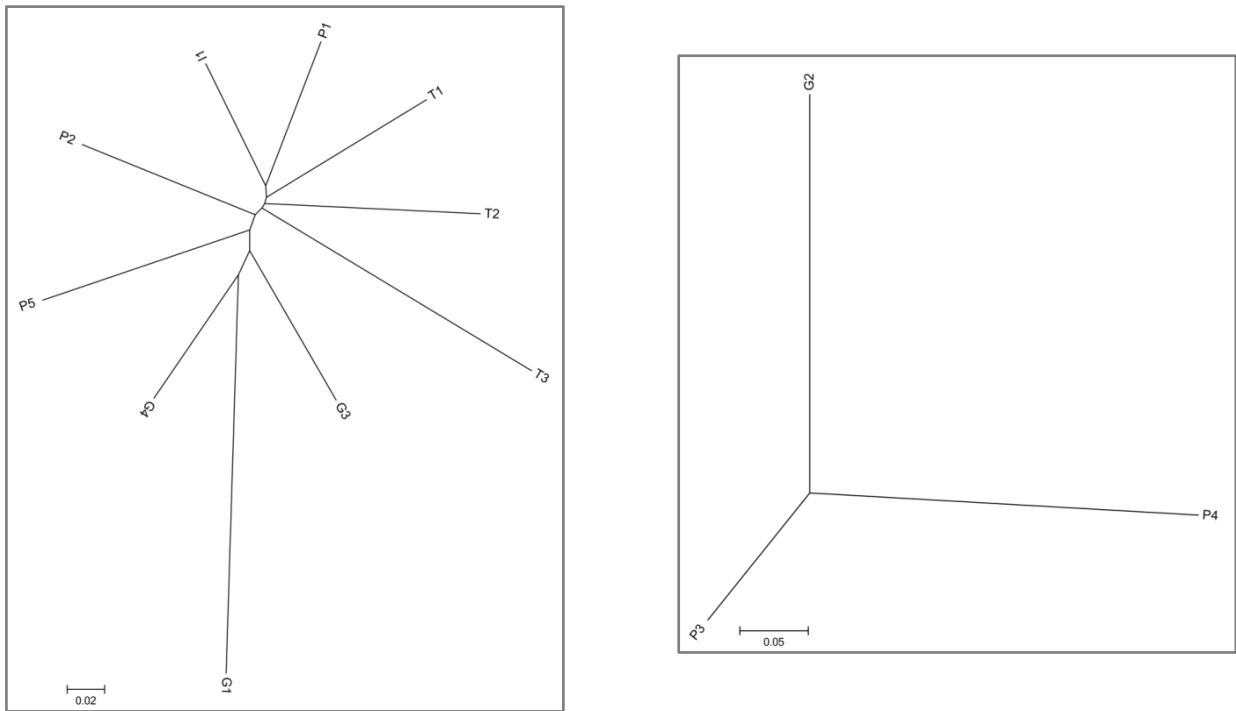


**Figura 8.** Análise de escalonamento multidimensional (MDS) a partir da matriz de distância  $D_A$  das localidades dos grupos 1 e 2.

A distância genética  $D_A$  também foi utilizada para a construção de dendrogramas, os quais foram agrupados pelo método *Neighbor-Joining*. Os resultados desta análise estão em concordância com os resultados obtido pelo método análise multidimensional (MDS). Ambas evidenciaram a baixa estruturação de forma geral, e uma moderada estruturação das localidades do rio Grande. A análise das localidades como um todo não apresentou um padrão de agrupamento (Figura 9). E nos grupos 1 e 2 houve separação das localidades por bacia hidrográfica, apesar de algumas delas permanecerem juntas, como observado no dendrograma do grupo 1 (Figura 10), na qual verificou-se 2 agrupamentos, um deles reunindo as localidades da bacia do rio Ivinhema, Paranapanema e Tietê, e outro, reunindo as localidades da bacia do rio Grande. No dendrograma do grupo 2, as localidades da bacia do rio Paranapanema (P3 e P4) ficaram agrupadas e separadas da localidade mais distante geograficamente, G2 da bacia do rio Grande, da mesma maneira como observado na análise MDS.



**Figura 9.** Dendrograma agrupando todas as localidades. Método *Neighbor-Joining* (NJ) utilizando a distância  $D_A$ .



**Figura 10.** Dendrograma das localidades dos **grupos 1 e 2**. Método *Neighbor-Joining (NJ)* utilizando a distância  $D_A$ .

## 4 DISCUSSÃO

### 4.1 Análise intrapopulacional

A análise das regiões microssatélites nas populações de *Astyanax altiparanae* da bacia do Alto rio Paraná mostraram alta variabilidade genética. Populações naturais normalmente têm níveis altos de variação genética, e essa variação é introduzida continuamente nas populações por diversos fatores como por exemplo a mutação e o cruzamento ao acaso. Além disso, vários cenários foram propostos para explicar a manutenção de uma alta diversidade dentro de populações, incluindo grande tamanho populacional, heterogeneidade ambiental e características intrínsecas à história de vida da espécie que favorecem o rápido crescimento populacional (Nei, 1987).

Os valores de diversidade gênica encontrados para *Astyanax altiparanae* no presente estudo ( $H_E=0,690$  a  $H_E=0,889$ ) foram maiores comparados a outros estudos feitos com espécies de *Astyanax*. Peres *et al.* (2005) analisaram 2 populações de *A. altiparanae* da bacia do Alto rio Paraná utilizando aloenzimas e obtiveram valores de  $H_E=0,151$  a  $H_E=0,093$ . A análise da taxonomia bioquímica de espécies não identificadas de *Astyanax* do reservatório de Segredo, rio Iguaçu, PR, mostraram uma baixa heterozigosidade esperada ( $H_E=0,097$  em *Astyanax* A;  $H_E=0,082$  em *Astyanax* B e  $H_E=0,061$  em *Astyanax* C) (Renesto *et al.*, 1997). Porém, valores de heterozigosidade esperada elevados foram registrados para outras espécies relacionadas, como por exemplo em populações de *Brycon insignis* analisadas com marcadores microssatélites que apresentaram uma heterozigosidade variando de  $H_E=0,770$  a  $H_E=0,880$  em rios da região Sudeste brasileira (Matsumoto e Hilsdorf, 2009). A população de *Brycon orbignyamus* do

rio Paraná também apresentou elevado polimorfismo genético através da análise de RAPD e DNA mitocondrial (Panarari-Antunes *et al.*, 2011). É possível que variações quanto aos índices analisados, como a diversidade gênica ( $H_E$ ) por exemplo, ocorram dependendo da metodologia utilizada. Os microssatélites demonstram alto grau de polimorfismo quando comparados a outros marcadores moleculares (Ferreira e Grattapaglia, 1998; Oliveira *et al.*, 2006), uma das razões é a alta taxa de mutação que este tipo de marcador apresenta (Strecker e Bernatchez, 2003).

A riqueza alélica também foi considerada elevada, o valor médio encontrado no presente estudo ( $A_r=10,693$ ) é alto comparado a outras espécies relacionadas da bacia do Alto Paraná,  $A_r=7,56$  para *Brycon insignis* (Matsumoto e Hilsdorf, 2009) e  $A_r=8,00$  para *Brycon hilarii* (Sanches e Galetti, 2012). Os valores de riqueza alélica fornecem um dado adicional que confirma o elevado polimorfismo das populações de *A. altiparanae*. É um critério alternativo de medida de diversidade genética, e alguns autores têm considerado que este é um parâmetro chave em programas de conservação (e.g. Petit *et al.*, 1998; Notter, 1999; Baker, 2001; Simianer, 2005; Foulley e Ollivier, 2006).

A elevada variabilidade genética encontrada nas populações de *A. altiparanae* no presente estudo estão relacionadas a diversos fatores, e não pode ser explicada por apenas um deles de forma isolada, e sim por uma longa história evolutiva de interação espécie/ambiente. Os primeiros characiformes surgiram no final do período Cretáceo juntamente com a ictiofauna sul-americana, há 65 milhões de anos (Castro *et al.*, 1999). No Brasil, os registros de characiformes fósseis datam do Mioceno-Oligoceno (35 a 23 milhões de anos) (Lima *et al.*, 1985). A composição da paleoictiofauna da bacia do Paraná e suas relações

históricas com as formas recentes permitem supor relações passadas, entre as drenagens costeiras, o rio Paraíba do Sul e o Alto rio Tietê (Malabarba, 1998). A bacia hidrográfica do Alto Paraná depositada sobre a bacia sedimentar do Paraná (Milani e Ramos, 1998) passou por processos de intenso intemperismo com deposição de sedimento e formação dos diversos canais da rede hidrográfica (Sallun *et al.*, 2007). Essas alterações ocorreram desde o período Cretáceo terminando no Quaternário com o soerguimento da Serra do Mar que alterou os cursos dos rios, formando a complexa rede hidrográfica que vemos hoje (Almeida e Carneiro, 1998). Portanto, em 65 milhões de anos, um grande número de alterações geográficas e ecológicas ocorreu nos corpos d'água sul-americanos, gerando numerosos eventos de vicariância. Estes, associados a especiação alopatrica, possivelmente geraram a fração maior da diversidade taxonômica ictiofaunística continental sul-americana (Castro *et al.*, 1999).

Apesar dos altos índices de diversidade encontrados, foi observado um desequilíbrio na quantidade de heterozigotos observados em relação ao esperado sob equilíbrio de Hardy-Weinberg na maioria das localidades analisadas, demonstrado pelo teste global de Fisher. A população G2 apresentou o menor número de alelos e valor não significativo para o teste, ou seja, estava em equilíbrio. Segundo alguns autores, o número de alelos pode estar relacionado ao equilíbrio Hardy-Weinberg, o alto número de alelos por loco podem induzir o desvio do equilíbrio nas populações (Hoarau *et al.*, 2002; Pereira *et al.*, 2009). Todas as outras populações analisadas apresentaram elevado número de alelos por loco e desvio do equilíbrio de Hardy-Weinberg. Além disso, a endogamia, estimada pelo coeficiente  $F_{IS}$ , apresentou valores positivos em todas as populações analisadas, e este índice que representa a redução da

heterozigossidade devido a inexistência de cruzamentos aleatórios, também pode ter sido outra possível causa do desequilíbrio. Outros fatores que podem alterar o equilíbrio são os artefatos técnicos como ocorrência de alelos nulos e *stuttering bands*, este último não detectado no presente estudo através da análise pelo programa MICRO-CHECKER, entre outros, como o efeito Wahlund e a seleção de alelos específicos (Hoarau *et al.*, 2002; Pereira *et al.*, 2009).

Analisando os oito locos utilizados no presente estudo, foram observados desvios significativos do equilíbrio de Hardy-Weinberg ( $P < 0,05$ ) em alguns locos em todas as populações analisadas. O desvio do equilíbrio de Hardy-Weinberg é, entretanto, comum em microssatélites (Alam e Islam, 2005; Carreras-Carbonell *et al.*, 2006; Chevolut *et al.*, 2006). Os alelos nulos estiveram presentes na maioria dos locos que apresentaram desvio do equilíbrio, portanto, o déficit de heterozigotos em decorrência da presença de nulos pode ter sido a causa dos desvios. A ocorrência de alelos nulos também é um problema comum nos estudos de microssatélites, e pode ser explicado pela baixa eficiência da hibridação de *primers* usados para amplificar o loco, devido a pontos de mutação em um ou mais sítios desses *primers* (Callen *et al.*, 1993; Dakin e Avise, 2004). Este evento pode ter ocorrido com os locos Asty16 e Asty21 na qual foi detectada a presença de alelos nulos em quase todas as populações. Para o loco Asty16, apenas a população P4 não apresentou alelos nulos. E para o loco Asty21 apenas a população G2 não apresentou alelos nulos. Para estes dois locos em todas as 13 localidades os valores do coeficiente de endogamia ( $F_{IS}$ ) foram positivos. Estes fatores podem, portanto, justificar a causa do desequilíbrio de Hardy-Weinberg na maioria das populações para os locos Asty16 e Asty21. Ainda sobre o desequilíbrio, analisando o loco Asty26, duas populações encontraram-se fora do

equilíbrio, porém sem a presença de alelos nulos, T2 e G1. Para estas localidades os valores do coeficiente de endogamia ( $F_{IS}$ ) foram positivos, chegando à conclusão de que a causa para o desequilíbrio nestas populações, analisando o loco *Asty26*, pode ser a endogamia.

A quantidade de alelos exclusivos em cada uma das populações no geral foi proporcional ao número de alelos por loco e conseqüentemente ao número de indivíduos amostrados na população. A maior amostragem foi conseguida em T1, nessa localidade foram obtidos 54 indivíduos, na qual apresentou 17 alelos exclusivos. Em G1 e G2, onde foram amostrados apenas 16 indivíduos em cada localidade, o número de alelos exclusivos foi menor.

#### 4.2. Análise interpopulacional

A estruturação genética avaliada entre os pares de populações de *Astyanax altiparanae*, através do índice  $F_{ST}$ , uma conveniente medida de diferenciação genética amplamente utilizada (Lopes *et al.*, 2007), no geral foi considerada baixa. Apenas a estruturação genética encontrada no par P3 x P4 e entre G2 com todas as demais, foi considerada moderada. Este resultado é corroborado por estudos envolvendo *Astyanax*, Bradic *et al.* (2012) analisando populações cavernícolas de *Astyanax* cujo baixo índice de  $F_{ST}$  sugeriu altos níveis de intercâmbio alélico verificado pela análise de marcadores microssatélites. Estudos envolvendo outros marcadores, como RAPD e DNA mitocondrial também revelaram uma baixa estruturação genética em populações naturais de *A. altiparanae* da bacia do rio Iguaçu, Alto rio Paraná, devido provavelmente à presença de um ancestral comum (Prioli *et al.*, 2002). Leuzzi *et al.* (2004) que

analisaram populações de diversos reservatórios do Alto Paraná através da técnica de RAPD, e cujos resultados foram similares, justificam a elevada identidade genética destas populações como sendo uma possível consequência de repovoamento destes reservatórios com peixes de mesma origem. Opostamente, a avaliação da estrutura genética de *Astyanax* aff. *bimaculatus* em duas regiões distintas, uma a montante e outra a jusante de uma hidrelétrica no estado da Bahia, revelou poucas diferenças morfológicas e padrões cariotípicos semelhantes entre as duas populações, contudo, as análises por RAPD e SPAR realizadas no mesmo estudo diferenciaram as populações de forma eficiente, com índices de estruturação populacional significativos. Desta maneira, o referido trabalho demonstra que a realização de estudos envolvendo diferentes marcadores é extremamente útil para a identificação de estruturas populacionais em espécies amplamente distribuídas, e para a verificação dos impactos das atividades humanas sobre as populações naturais de peixes.

A análise Bayesiana revelou fraca estruturação populacional nas 13 localidades de *A. altiparanae* analisadas pelo programa STRUCTURE, como mostrado na Figura 3. Os valores obtidos para o parâmetro "admixture" mostrou que as 13 localidades são distinguidas em 6 *clusters* ( $K=6$ ). Porém, 3 localidades apareceram bem distinguidas, P3, P4 e G2, as quais foram analisadas posteriormente separadas das demais. Uma nova análise Bayesiana feita com as 10 localidades que apresentaram fraca estruturação na primeira análise, confirmou o resultado separando as populações em apenas 2 *clusters*. O resultado obtido com esta análise deixa claro a possibilidade da ação antrópica sobre a estruturação das populações de *A. altiparanae* da bacia do Alto rio Paraná, já que se trata de uma espécie muito utilizada como isca na atividade

pesqueira e também por se tratar de uma espécie migradora de pequenas distâncias (Castro *et al.*, 2003; 2004; 2005). Analisando regiões tão distantes geograficamente, se esperaria uma estruturação ao menos das populações mais afastadas entre si. A falta de estruturação genética normalmente é observada em espécie migradoras, como por exemplo em populações naturais de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) da bacia do Alto Paraguai caracterizadas utilizando marcadores microssatélites, cujo resultado revelou que praticamente não houve diferenciação genética entre as nove populações estudadas, apresentando uma estruturação muito tênue e revelando certa homogeneidade genética, devido a grande amplitude migratória e as características relacionadas à origem e história do Pantanal Matogrossense (Suganuma, 2008).

As regiões de coleta das três localidades (P3, P4 e G2) claramente delimitadas pela análise no STRUCTURE apresentam características peculiares as quais é importante abordar. São locais com isolamento geográfico considerável onde o curso do rio foi severamente alterado por barreiras impostas pelo homem dificultando a passagem dos peixes. A localidade P3 abriga uma população de *A. altiparanae* que possui a migração extremamente dificultada por canais escavados ao longo do tributário que deságua no reservatório de Capivara, rio Paranapanema. Tais canais foram feitos para fins de irrigação de plantações. A localidade P4 se encontra em uma região que anteriormente tinha conexão com a calha do reservatório de Capivara e hoje é parcialmente isolada, devido a uma estrada construída sobre o reservatório há aproximadamente 40 anos, a única comunicação é feita por tubulações.

E a localidade G2 abriga uma população também isolada em uma área represada há aproximadamente 25 anos para abastecimento de tanques de

piscicultura no Centro de Aquicultura da UNESP de Jaboticabal (CAUNESP). O curso do pequeno tributário represado drena em direção ao rio Mogi-Guaçu, porém, dificultando severamente a passagem de peixes. Esta localidade foi a que apresentou o menor número de alelos ( $N_a=6,375$ ) e a menor diversidade gênica ( $H_E=0,690$ ). Estes valores podem ter sido consequência do baixo número amostral coletado nesta localidade (16 indivíduos) e/ou do isolamento a qual esta população está submetida.

Os fatores que determinam o isolamento genético de uma determinada população dependem de forças evolutivas, como seleção natural, fluxo gênico, deriva genética, mutações e o tempo viável para que estes processos ocorram (Chakraborty e Leimar, 1987). A deriva genética parece ser uma força evolutiva que está agindo sobre as populações nas localidades P3, P4 e G2.

Com o passar das gerações estas populações poderão sentir os efeitos da endogamia e ter seu *pool* gênico extremamente reduzido. Segundo Dias *et al.* (2005), entre as características mais relevantes de *A. altiparanae* na colonização bem sucedida dos reservatórios está a ampla distribuição geográfica, a habilidade em ocupar e se reproduzir em ambientes lênticos e a flexibilidade alimentar. Também é observado que o fechamento de um reservatório tropical durante a reprodução pode ter impacto positivo nas primeiras desovas, dado que o processo de enchimento simula uma grande inundação natural. Em contrapartida, estudos sobre a estrutura populacional e a variabilidade genética de *Astyanax* através de marcadores morfológicos e cromossômicos, mostram que em regiões também isoladas do rio Tibagi, PR, caracterizadas por poços profundos escavados naturalmente a partir de rochas de arenito pela ação da água no lençol freático e ligados por pequenas fissuras nas rochas que drenam para o rio,

indicam que este interessante modelo de população fechada mostra evidências de depressão endogâmica e perda de heterozigidade devido a condições particulares observadas nesses ambientes (Gross *et al.*, 2004).

Em ambientes naturais se espera que quanto mais distanciadas geograficamente, mais diferentes sejam as populações em termos de base genética. Populações naturais frequentemente não mantêm panmixia, ou seja, a probabilidade de reprodução não é sempre a mesma, e depende de fatores biológicos e geográficos (Solé-Cava e Cunha, 2012). A ausência de panmixia provoca uma estruturação (subdivisão) das populações, e segundo Wright (1978) é possível observar três tipos principais de estruturação de populações: i) **Modelo de ilhas**; ii) **Modelo passo-a-passo** (*stepping stones*) e iii) **Isolamento por distância** (IBD), em que o fator principal para a diferenciação é a limitação da dispersão em função da distância geográfica. Este último tipo de estruturação, testado no presente estudo não indicou uma associação direta entre distância genética e distância geográfica (Km), mostrando que o isolamento por distância não é um fator significativo na estruturação das populações de *A. altiparanae* da bacia do Alto rio Paraná. A falta de correlação entre a divergência genética das localidades estudadas e a distância geográfica pode ter ocorrido provavelmente em decorrência da ação antrópica que interferiu na distribuição das populações de *A. altiparanae* na bacia do Alto rio Paraná.

Uma das ações antrópicas que pode ter contribuído para a desestruturação das populações de *A. altiparanae*, é a soltura sem controle de indivíduos utilizados como isca viva na pesca esportiva. Os pescadores costumam viajar em busca de rios piscosos e limpos onde podem pescar uma boa variedade de espécies. A isca viva é portanto, comprada em estações de piscicultura as vezes

muito distantes do local da pesca. Considerando a elevada capacidade que *A. altiparanae* possui em se reproduzir nos mais diversos ambientes da bacia do Paraná, apenas alguns casais são suficientes para que uma nova população se estabeleça no local e troque material genético com a população residente.

Além da questão da soltura de iscas vivas, outro fator que pode ter interferido de maneira significativa na estruturação das populações foram as ações de manejo tomadas durante a construção das diversas hidrelétricas da bacia do Alto rio Paraná. Ao longo do século XX, a construção de reservatórios nos rios brasileiros foi acompanhada pela adoção de uma série de ações de manejo, com ênfase na pesca. Entretanto, as ações implementadas pelo setor elétrico com o objetivo de minimizar os impactos dos represamentos, preservar estoques pesqueiros ou aumentar o rendimento da pesca em seus reservatórios podem ser, até agora, consideradas malsucedidas, exceto em casos esporádicos.

Nos reservatórios do Alto rio Paraná, os programas de repovoamento vêm sendo executados desde a década de 1970, tendo sido utilizadas mais de 25 espécies de peixes, nativas ou não. O primeiro Código de Pesca do Brasil (Decreto-Lei N.º 794 de 19/10/1938) já previa que,

*"As represas dos rios, ribeirões e córregos devem ter, como complemento obrigatório, obras que permitam a conservação da fauna fluvial, seja facilitando a passagem de peixes, seja instalando estações de piscicultura".*

Essas estações tinham como finalidade a obtenção de alevinos para o repovoamento. As ações de repovoamento ganharam impulso após a divulgação de documentos legais que prescreviam que,

"O proprietário ou concessionário de represa em cursos de água, além de outras disposições legais, é obrigado a tomar medidas de proteção à fauna".

E a melhor alternativa encontrada foi o repovoamento e, por isso, houve a exigência para que as concessionárias hidrelétricas instalassem em cada sub-bacia pelo menos uma estação produtora de alevinos (Alzuguir, 1994; Agostinho *et al.*, 2004). A CESP, concessionária responsável pela construção das hidrelétricas da bacia do Alto rio Paraná, no início das obras (década de 1970) mantinha estações de piscicultura em Jupuíá, rio Paraná e Paraibuna, rio Paraíba do Sul, estas duas inicialmente eram responsáveis pelo fornecimento de alevinos para repovoamento dos diversos reservatórios recém construídos da bacia do Alto rio Paraná (CESP, 2013). Naquela época não havia informações sobre os estoques da fauna nativa, e a escolha da espécie-alvo de repovoamento era baseada nas facilidades de obtenção e na disponibilidade de alevinos, e cuja meta era apenas a quantidade a ser estocada. Atualmente, essas estações estão envolvidas com a produção de alevinos de espécies nativas e/ou se tornaram estruturas de apoio a projetos ambientais.

Vermulm *et al.* (2001) avaliaram o rendimento pesqueiro comercial no período de 1994 a 1999 nos trechos paulistas dos rios Grande, Paranapanema e Paraná, incluindo regiões represadas e lóticás, e o predomínio nos desembarques foi da corvina (*Plagioscion squamosissimus*), mandi (*Pimelodus maculatus*) e curimba (*Prochodus lineatus*), *Astyanax* spp., traíra (*Hoplias malabaricus*) e peixe-cadela (*Galeocharax knerii*). No reservatório de Furnas, rio Grande, o lambari (*Astyanax altiparanae*) representou 70% das capturas em biomassa. Mesmo se tratando de espécies nativas, a liberação inadvertida e em grandes

quantidades pode levar à progressiva degeneração genética (Hindar *et al.*, 1991; Vieira e Pompeu, 2001), sendo essa ocorrência tão impactante quanto a introdução de um piscívoro voraz ou a degradação da qualidade da água. A degradação genética tem uma série agravante: ela não produz efeitos visíveis a olho nu, e somente técnicas e análises específicas podem quantificar tais efeitos. Quando suas consequências são detectadas, a situação pode não ser mais reversível.

A análise molecular da variância (AMOVA) calculada com o índice  $F_{ST}$  evidenciou que a maior diversidade genética encontra-se dentro das populações e não entre elas ou entre bacias hidrográficas. Esta característica se fez presente tanto na análise de todas as 13 populações, quanto nas análises que as separou em dois grupos, o grupo 1 (dez populações) e grupo 2 (três populações). A análise de todas as populações e a do grupo 1 revelaram baixa diferenciação genética. E no grupo 2, representado pelas três populações em um possível processo de deriva genética, foi detectada uma moderada diferenciação genética, igualmente demonstrado pela análise entre os pares de populações utilizando o mesmo índice. Segundo Hartl e Clarck (2007), de forma natural, muitos organismos agregam-se de diferentes maneiras dentro de uma população.

Ambientes naturais geralmente são fragmentados em áreas favoráveis e desfavoráveis, sendo que ao longo do tempo mesmo áreas uniformemente favoráveis podem ser fragmentadas por diferentes ameaças naturais ou antrópicas, o que foi observado nos ambientes onde as amostras foram coletadas e em geral na bacia do Alto rio Paraná. Uma maior diversidade genética dentro das populações e não entre elas é comum, e observada em diferentes espécies, como *Pseudoplatystoma reticulatum* (Abreu *et al.*, 2009); Salmonídeos do Canadá

(Gomez-Uchida *et al.*, 2009); truta marrom *Salmo trutta* da Suécia (Carlsson e Nilsson, 2000); pirarucu *Arapaima gigas* da Amazônia brasileira (Araripe *et al.*, 2013) e da espécie exclusivamente oceânica *Hoplostethus atlanticus* (Varela *et al.*, 2013).

Através da análise de escala multidimensional (MDS) foi possível ilustrar as relações entre as 13 populações, revelando que não há um padrão de distribuição geográfico de *A. altiparanae* na bacia do Alto Paraná. Entretanto, a análise das localidades separadas entre os grupos 1 e 2, mostrou uma distribuição sutil das populações, conforme a bacia hidrográfica a qual pertencem, no grupo 2 por exemplo as localidades das bacias do Paranapanema ficaram agrupadas em dois quadrantes de uma dimensão, e a localidades da bacia do rio Grande nos outros dois quadrantes. Portanto, foi possível verificar que há pouca relação entre a distribuição das localidades e a bacia hidrográfica, provavelmente por consequência da interferência humana, resultado concordante com Leuzzi *et al.* (2004) já referido, que supõem que em algum tempo os dois reservatórios do rio Paranapanema por eles estudados, foram repovoados com alevinos de *A. altiparanae* de mesma origem.

É interessante ressaltar que no presente estudo, a quantidade de áreas amostradas foi bem maior com relação a quantidade amostrada no estudo de Leuzzi e colaboradores acima citado, abrangendo diversos reservatórios e tributários ao longo da bacia do Alto Paraná. Adicionalmente, o dendrograma elaborado com a medida de distância genética  $D_A$  corrobora os resultados da análise multidimensional e revela uma baixa diferenciação entre as populações no geral, e sem um padrão de distribuição conforme a bacia, porém, quando analisadas em grupos distintos, observa-se no grupo 1, dois agrupamentos, um

formado pelas bacias Ivinhema, Paranapanema e Tietê e outro formado pela bacia do rio Grande, e para o segundo grupo, as duas localidades do rio Paranapanema separadas da localidade do rio Grande.

De acordo com Garutti (1995), o gênero *Astyanax* possui uma distribuição compartimentalizada, sugerindo certo grau de endemismo, ou seja, há diferenças dentro e entre as bacias e no presente estudo essa característica não foi observada, com base nos resultados apresentados até o momento. E somado ao longo histórico sobre cultivo e repovoamento desta espécie, é possível concluir que no geral as populações de *A. altiparanae* da bacia do Alto Paraná possuem uma alta variabilidade genética, provavelmente por consequência da história evolutiva, das características intrínsecas, versatilidade ambiental e a capacidade de ocupar os mais diversos habitats; e uma baixa estruturação genética, ao contrário do que se esperaria por se tratar de uma espécie de pequeno porte que migra pequenas distâncias, provavelmente em decorrência da ação antrópica, que causou uma mistura nos estoques, desde o início das construções das hidrelétricas há mais de 40 anos atrás e ainda hoje devido a utilização desta espécie na pesca esportiva como isca viva.

O conhecimento do componente genético da biodiversidade é fundamental, pois é a variação genética que fornece o material básico para a seleção natural e, portanto, para a evolução de todas as espécies (Allcock *et al.*, 1995). O objetivo central da genética aplicada à conservação é o uso de marcadores moleculares no estudo das estruturas populacionais e sua interpretação ecológica e evolutiva para ajudar a minimizar os danos causados pelas atividades humanas nas populações das espécies tanto daquelas exploradas comercialmente como das espécies já ameaçadas de extinção (Solé-Cava e Cunha, 2012).

O custo da proteção de uma área, através da demarcação e fiscalização de parques nacionais, é, em geral, muito menor do que tentar manter e reproduzir em cativeiro cada uma das espécies daquela área uma vez que estejam ameaçadas (Adam e Carwardine, 1990; Solé-Cava, 1993). Estudos genéticos podem ser úteis também na sugestão de políticas de preservação em seus estágios iniciais e mais simples, como na determinação de estruturas populacionais e na análise filogeográfica. A ciência tem sido usada mais frequentemente no estudo de espécies com populações já muito reduzidas, muitas vezes em fase terminal. A genética certamente é instrumento poderoso nesses estudos, juntamente com a ecologia. Mas a prevenção do processo de extinção por meio da proteção ambiental seria um uso mais inteligente dos recursos. Lamentavelmente, a preocupação com a recuperação, não só no Brasil, mas na maioria dos países, vem somente após a catástrofe (Solé-Cava e Cunha, 2012).

Segundo Agostinho *et al.* (2007) em algumas bacias hidrográficas, como a do rio Paraná, poucos trechos de rio permanecem sem a influência de represamentos, preservando suas características lólicas originais. As perdas na biodiversidade local e as alterações impostas no funcionamento dos ecossistemas são fenômenos cada vez mais compreensíveis e a implementação de medidas atenuadoras de impactos é agora uma exigência ética fundamental.

Nesse contexto, os dados obtidos no presente estudo, demonstraram que a ação antrópica pode ter sido um fator relevante responsável pela falta de estruturação observada nas populações de *A. altiparanae* provenientes da bacia do Alto rio Paraná, tanto pelo repovoamento dos diversos reservatórios com indivíduos de mesma origem, como pela liberação sem qualquer controle durante

a pesca esportiva, causando uma mistura nos estoques. Apesar disso, a alta variabilidade genética encontrada, é fator de extrema importância, que facilita a elaboração de planos de manejo e conservação desta espécie, já que a alta variabilidade foi observada em todas as bacias hidrográficas do Alto Paraná amostradas.

O manejo, não apenas conservacionista, mas também o reprodutivo adequado voltado à produção e comercialização de alevinos, pode ser incrementado com os resultados aqui encontrados, no sentido de obter reprodutores com uma maior variabilidade genética, já que *A. altiparanae* é considerada uma opção interessante para piscicultura brasileira. Adicionalmente, os marcadores desenvolvidos podem ser utilizados no estudo da diversidade genética de espécies relacionadas, reduzindo custos e maximizando o tempo com a obtenção de resultados.

## 5 CONCLUSÃO

Com os dados obtidos no presente estudo foi possível destacar uma série de conclusões, que demonstram a importância da utilização de marcadores moleculares microssatélites na análise populacional de espécies nativas e de interesse comercial, como *Astyanax altiparanae*, bem como a transferabilidade dos marcadores desenvolvidos para espécies relacionadas.

- ✓ Os marcadores desenvolvidos para *A. altiparanae* mostraram-se altamente polimórficos e eficientes na análise da variabilidade e estrutura genética de 13 populações da bacia do Alto rio Paraná;
- ✓ Tais marcadores foram eficientes na transferabilidade para espécies do mesmo gênero. Isso facilita os estudos em outras espécies, reduzindo custos e maximizando o tempo com a obtenção de resultados, uma vez que os marcadores já estejam desenvolvidos;
- ✓ As populações de *A. altiparanae* apresentaram uma elevada variabilidade genética na bacia do Alto rio Paraná, devido a fatores intrínsecos à espécie e também a características de heterogeneidade ambiental;
- ✓ No geral, não foi detectada estruturação genética, e a distribuição das populações foi relacionada com a atividade antrópica que por vários anos vem misturando os estoques, por razões de repovoamento após a construção de hidrelétricas e por liberação indiscriminada de indivíduos em

locais distantes de sua origem durante a pesca esportiva, largamente praticada nos rios da bacia do Alto Paraná;

- ✓ As populações P3, P4, e G2 apresentaram diferenciação genética moderada, provavelmente pelo fato de essas três localidades apresentam um elevado grau de isolamento geográfico, mostrando-se mais estruturadas em relação as demais localidades;
  
- ✓ As informações sobre a variabilidade genética encontradas neste estudo poderão contribuir de maneira significativa na elaboração de planos de manejo e conservação de *A. altiparanae*, além de fornecer embasamento científico à produção desta espécie em pisciculturas, e de maneira geral à aquicultura brasileira.

## 6 REFERÊNCIAS

- 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, n.4, p.868-873, 2009. ISSN 1415-4757.
- AB'SABER, A.N. Os domínios morfoclimáticos da América do Sul. **Geomorfologia**, v.52, p.1-21, 1977.
- ADAM, D.; CARWARDINE, M. **Last chance to see**. Pan Books, 1990. London.
- AGOSTINHO, A. A.; JÚLIO JR, H.F.; BORGHETTI, J.R. Considerações sobre os impactos dos represamentos na ictiofauna e medidas para sua atenuação. Um estudo de caso: reservatório de Itaipu. **Revista UNIMAR**, Maringá, v.14 (Suplemento), p.89-107, 1992.
- AGOSTINHO, A. A.; JÚLIO-JR, H.F. Peixes da bacia do alto Paraná. In: Lowe-McConnell, R. H. (Orgs.). **Estudos ecológicos de comunidades de peixes tropicais**. Tradução VAZZOLER, A.E.A.M.; AGOSTINHO, A.A.; CUNNINGHAM, P.T.M. São Paulo: EDUSP, 1999. p.374-399.
- AGOSTINHO, A.A.; GOMES, L.C.; LATINI, J.D. Fisheries management in Brazilian reservoirs: Lessons from/for South America. **Interciência**, Caracas, v.29, n.6, p.334-338, jun. 2004.
- AGOSTINHO, A.A.; GOMES, L.C.; PELICICE, F.M. **Ecologia e manejo de recursos pesqueiros em reservatórios do Brasil**. Maringá: Eduem, 2007. 501p.
- AITKEN, N.; SMITH, S.; SCHWARZ, C.; MORINS, P.A. Single nucleotide polymorphism (SNP) discovery in mammals: a targeted-gene approach. **Molecular Ecology**, v.13, n.6, p. 1423-1431, 2004.
- ALAM, M.S.; ISLAM, M.S. Population genetic structure of *Catla Catla* (Hamilton) revealed by microsatellite DNA markers. **Aquaculture**, v.246, n.1-4, p.151-160, 2005.
- ALLCOCK, A.L.; CHAUVET, M.; CRANDALL, K.A.; GIVEN, D.R.; HALL, S.J.G.; IRIONDO, J.M.; LEWINSOHN, T.M.; LYNCH, S. M.; G. M.; SOLÉ-CAVA, A. M.; STACKEBRANDT, E.; TEMPLETON, A.R. e WATTS, P.C. Genetic diversity as a component of biodiversity. In: HEYWOOD, V.H.; WATSON, R.T (Orgs). **"Global biodiversity assesment"**. Cambridge: Cambridge University Press. 1995. p.57-88.

- ALMEIDA, F.F.M.de; CARNEIRO, C.D.R. Origem e evolução da Serra do Mar. **Revista Brasileira de Geociências**, São Paulo, v.28, n.2, p.135-150, jun. 1998.
- ALVES, C.M.B.; VIEIRA, F.; POMPEU, P.; FONSECA, P.R. Estudos de ictiofauna. In: **Plano Diretor de recursos hídricos das bacias afluentes do rio São Francisco em Minas Gerais**, Belo Horizonte: Governo Federal de Minas Gerais, v.1, Tomo IV. 1998. 154p.
- ALZUGUIR, F. Histórico da legislação referente à proteção dos recursos íctios de água doce. In: **Seminário sobre fauna aquática e o setor elétrico brasileiro: reuniões temáticas preparatórias, 1994**. Rio de Janeiro: Eletrobrás: Comase, 1994. p.19-32 (Caderno 2: Legislação).
- ARARIPE, J.; RÊGO, P.S.; QUEIROZ, H.; SAMPAIO, I.; SCHNEIDER, H. Dispersal Capacity and Genetic Structure of *Arapaima gigas* on Different Geographic Scales Using Microsatellite Markers. **Plos One**, v.8, n.1, p.1-7, jan. 2013.
- AVISE, J.C. **Phylogeography: the history and formation of species**. London: Harvard University Press, 2000.
- BAKER, J.S.F. Conservation and management of genetic diversity: a domestic animal perspective. **Canadian Journal of Forest Research**, v.31, p.588–595, 2001.
- BARBARÁ, T.; PALMA-SILVA, C.; PAGGI, G.M.; BERED, F.; FAY, M.F.; LEXER, C. **Cross-species transfer of nuclear microsatellite markers: potential and limitations**. **Molecular Ecology**, v.16, p.3759–3767, 2007. doi: 10.1111/j.1365-294X.2007.03439.x
- BARROSO, R.M.; HILSDORF, A.W.S.; MOREIRA, H.L.M.; MELLO, A.M.; GUIMARÃES, S.E.F.; CABELLO, P.H.; TRAUB-CSEKO, E.Y.M. Identification and characterization of microsatellites loci in *Brycon opalinus* (Cuvier, 1819) (Characiforme, Characidae, Bryconia). **Molecular Ecology**, v. 3, p.297-298, 2003.
- BARROSO, R.M.; A.W.S. HILSDORF; H.L.M. MOREIRA; P.H. CABELLO; Y.W. TRAUB-CSEKO. 2005. Genetic diversity of wild and cultured populations of *Brycon opalinus* (Cuvier, 1819) (Characiforme, Characidae, Bryconia) using microsatellites. **Aquaculture**, v.247, p.51-65, 2005.
- BENITES, C. **Características genéticas do Pintado *Pseudoplatystoma corruscans* (Siluriformes: Pimelodidae) da Bacia Paraná-Paraguai, por marcadores do tipo microssatélite**. 2008. 90f. Tese (Doutorado) - Centro de Aquicultura da Unesp - Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2008.

- BENNEMANN, S.T.; GEALH, A.M.; LORSI, M.L.; SOUZA, L.M. **Ocorrência e ecologia trófica de quatro espécies de *Astyanax* (Characidae) em diferentes rios da bacia do rio Tibagi, Paraná, Brasil.** *Iheringia*, v.95, n.3, p.247-254, 2005. (Série Zoologia).
- BERNATCHEZ, L.; DEMPSON, J.B.; MARTIN, S. Microsatellite gene diversity analysis in anadromous char, *Salvelinus alpinus*, from Labrador, Canada. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v.55, p.1264-1272, 1998.
- BILLOTTE, N.; LAGODA, P.J.L.; RISTERUCCI, A.M.; BAURENS, F.C. Microsatellite-enriched libraries: applied methodology for the development of SSR markers in tropical crops. **Fruits** (Paris), v.54, p.277-288, 1999.
- BOHONAK, A.J. IBD (Isolation By Distance): a program for analyses of isolation by distance. **Journal of Heredity**, v.93, p.153-154, 2002.
- BOWIE, R.C.K.; FELDHEIM, K.A.; CARO, L.M.; CADENA, C.D. Novel tetranucleotide microsatellite DNA markers for members of the Henicorhina Wood-wren species complex (Aves, Troglodytidae). *Conservation Genetics Resources*, v.4, p.419-421, 2012. doi 10.1007/s12686-011-9564-7.
- BRADIC, M.; P. BEERLI; F.J.G. LEÓN; S. ESQUIVEL-BOBADILLA; R.L.B. Gene flow and population structure in the Mexican blind cavefish complex *Astyanax mexicanus*. **BMC Evolutionary Biology**, v.12, n.9, p.1-16, 2012.
- BRITSKI, H.A.; F. LANGEANI. *Pimelodus paranaensis*, sp. n., um novo Pimelodidae (Pisces, Siluriformes) do Alto Paraná, Brasil. **Revista Brasileira de Zoologia**, v.5, n.3, p.409-417, 1988. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0101-81751988000300006>>. Acesso em: 15 jan. 2013.
- BRITSKI, H.A.; SATO, Y.; ROSA, A.B.S. Manual de identificação de peixes da região de Três Marias (com chave de identificação para os peixes da bacia do São Francisco). 3ed. Minas Gerais: Ministério da Irrigação - CODEVASF, 1988. 115p.
- BRITSKI, H.A. Conhecimento atual das relações filogenéticas de peixes neotropicais. Situação atual e perspectivas da ictiologia no Brasil. In: AGOSTINHO, A.A.; BENEDITO-CECÍLIO, E. (Orgs.). **Documentos do IX Encontro Brasileiro de Ictiologia**. Maringá: Editora da Universidade Estadual de Maringá, 1992. p.43-57.
- BROOKFIELD, J.F.Y. A simple new method for estimating null allele frequency from heterozygote deficiency. **Molecular Ecology**, v.5, p.453-455, 1996.

- CALCAGNOTTO, D.; RUSSELLO, M.; DESALLE, R. Isolation and characterization of microsatellite loci in *Piaractus mesopotamicus* and their applicability in other Serrasalminae fish. **Molecular Ecology Notes**, v.1, p.245-247, 2001.
- CALLEN, D.F.; THOMPSON, A.D.; SHEN Y.; PHILLIPIS, H.A.; RICHARDS, R.I.; MULLEY J.C.; SUTHERLAND, G.R. Incidence and origin of 'null' alleles in the (AC)*n* microsatellite markers. **American journal of human genetics**, v.52, n.922-927, 1993.
- CARLSSON, J.; NILSSON, J. Population genetic structure of brown trout (*Salmo trutta* L.) within a northern boreal forest stream. **Hereditas**, v.132, p.173-181, 2000.
- CARRERAS-CARBONELL J, MACPHERSON E and PASCUALM. Population structure within and between subspecies of the Mediterranean triplefin fish *Triptyerygion delaisi* revealed by highly polymorphic microsatellite loci. **Molecular Ecology**, v.15, p.3527-3539, 2006.
- CARVALHO, A.Z. **Transferabilidade de microssatélites de arroz para trigo na busca por marcadores ligados à resistência à fusariose**. 2007. 52f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-graduação em Biotecnologia Agrícola - Universidade Federal de Pelotas, Pelotas. 2007.
- CASATTI, L.; F. LANGEANI & R. M. C. CASTRO. Peixes do Parque Estadual Morro do Diabo, bacia do Alto Rio Paraná, SP. **Biota Neotropica**, v.1, p.1-15, 2001. Disponível em: <<http://www.biotaneotropica.org.br>>. Acesso em 28 Maio 2011.
- CASATTI, L.; MENDES, H.F.; FERREIRA, K.M. Aquatic macrophytes as feeding site for small fishes in the Rosana Reservoir, Paranapanema River, Southeastern Brazil. **Brazilian Journal of Biology**, v.63, p.213-222, 2003.
- CASTRO, R.M.C.; CASATTI L. The fish fauna from a small forest stream of the upper Paraná River, southeastern Brazil. **Ichthyological Explorations of Freshwaters**, v.7, n.337-352, 1997.
- CASTRO, R.M.C. Evolução da ictiofauna de riachos sul-americanos: padrões gerais e possíveis processos causais. In: CARAMASCHI, E.P.; MAZZONI R.; PERES-NETO, P.R. **Ecologia de peixes de riachos** (Orgs.). Rio de Janeiro: PPGE-UFRJ, 1999. v.VI, p.139-155. (Série Oecologia Brasiliensis)
- 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.; STOPIGLIA, R.; 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, p.1-31, 2003.

- 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.; PELIÇÃO, G.Z.; 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, p.1-39, 2004.
- CASTRO, R.M.C., CASATTI, L.; SANTOS, H.F.; VARI, R.P.; MELO, A.L.A.; MARTINS L.S.F.; ABREU, T.X.; BENINE, R.C.; GIBRAN, F.Z.; RIBEIRO, A.C.; BOCKMANN, F.A.; CARVALHO, M.; PELIÇÃO, G.Z.; FERREIRA, K.M.; STOPIGLIA, R.; AKAMA, A. Structure and composition of the stream ichthyofauna of four tributary rivers of the upper Rio Paraná basin, Brazil. **Ichthyological Exploration of Freshwaters**, v.16, n.3, p.193-214, 2005.
- CASTRO, R.M.C.; MENEZES, N.A. Estudo diagnóstico da diversidade de peixes do Estado de São Paulo. In: CASTRO, R.M.C. (Ed.). JOLY, C.A.; BICUDO, C.E.M. (Orgs.). **Biodiversidade do Estado de São Paulo, Brasil: síntese do conhecimento ao final do século XX**. São Paulo: WinnerGraph- FAPESP, v.6 - Vertebrados, 1998. p.1-13.
- CESP. **Aspectos limnológicos, ictiológicos e pesqueiros de reservatórios da CESP no período de 1986 a 1994**. São Paulo: Série Pesquisa e Desenvolvimento, 136, 1996. 78p.
- CESP. **Aquicultura e Piscicultura**. Disponível em <http://www.cesp.com.br/portalcesp/porta1.nsf/3b723606f1deab8203256b0400507209/5995317f7cba173c83257575006878dc?OpenDocument>. Acesso em 16 Maio 2013.
- CHAKRABORTY, R.; LEIMAR, O. Genetic variation within a subdivided population. In: **Population Genetics and Fishery Management**. Seattle: University of Washington Press, 1987. p. 89-120.
- CHEVOLOT M.; J.R. ELLIS; G. HOARAU; A.D. Rijnsdorp; W.T STAM and J.L. Olsen. Population structure of the thornback ray (*Raja clavata* L.) in British waters. **Journal of Sea Research**, v.56, n.305-316, 2006.
- COURTENAY, W.R.Jr.; WILLIAMS, J. D. Dispersal of exotic species from aquaculture sources, with emphasis on freshwater fishes. In: ROSENFELD, A.; MANN, R. (Orgs.). **Dispersal of living organisms into aquatic ecosystems**. College Park, Maryland: Maryland Sea Grant Publication, 1992. ch.1, p.49-81.
- DAKIN, E.E.; AVISE, J.C. Microsatellite null alleles in parentage analysis. **Heredity**, v.93, p.504-509, 2004.

- DIAS, A.C.M.I.; WYSS, C.C.B.; LOPES, V.G. Estudo da dieta natural de peixes no reservatório de Ribeirão das Lajes, Rio de Janeiro, Brasil. **Acta scientiarum Biological sciences**, v.27, n4, p.355-364, 2005.
- DISNER, G.R.; ROCHA, M.V.; MIRANDA, G.B. Avaliação da atividade mutagênica do Roundup® em *Astyanax altiparanae* (Chordata, Actinopterygii). **Evidência**, Joaçaba, v.11, n.1, p. 33-42, janeiro/junho 2011.
- DOMINGUES, M.S., VICARI, M.R.; ABILHOA, V.; WAMSER, J.P.; CESTARI, M.M.; BERTOLLO, L.A.; ALMEIDA, M.C.; ARTONI, R.F. Cytogenetic and comparative morphology of two allopatric populations of *Astyanax altiparanae* Garutti & Britski, 2000 (Teleostei: Characidae) from upper rio Paraná basin. **Neotropical Ichthyology**, v.5, n.1, p.37-44, 2007.
- EVANNO, G.; REGNAUT, S.; GOUDET, J. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. **Molecular Ecology**, v.14, p.2611-2620, p. 2005.
- EXCOFFIER, L.; LAVAL, G.; SCHNEIDER, S. ARLEQUIN ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. **Evolutionary Bioinformatics Online**, v.1, p.47-50, 2005.
- FEARNSIDE, P.M. Brazil's Balbina Dam: environment versus the legacy of the pharaohs in Amazonia. **Environmental Management**, New York, v.13, n.4, p.401-423, 1989.
- FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao Uso de Marcadores Moleculares em Análise Genética**. 3. ed. Brasília: Embrapa, 1998. 220 p.
- FOULLEY J.L.; L. OLLIVIER. Estimating allelic richness and its diversity. **Livestock Science**, v.101, p.150-158, 2006.
- FUNGARO, M.H.P.; VIEIRA, M.L.C. Marcadores Moleculares. In: AZEVEDO, J.L.; BARROS, N.M.; SERAFINI, L.A. (Orgs). **Biotecnologia na Agricultura e na Agroindústria**. Guaíba: Livraria e Editora Agropecuária, 2001. p.153-200
- GARUTTI, V. Contribuição ao conhecimento reprodutivo de *Astyanax bimaculatus* (Ostariophysi, Characidae) em cursos de água da bacia do Rio Paraná. **Revista Brasileira de Biologia**, v.53, n.2, p.159-166, 1989.
- GARUTTI, V. **Revisão taxonômica dos *Astyanax* (Pisces, Characidae), com mancha umeral ovalada e mancha no pedúnculo caudal, estendendo-se a extremidade dos raios caudais medianos, das bacias do Paraná, São Francisco e Amazônica**. 1995. 286f. Tese (Livre-Docência) - Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, IBILCE, Universidade Estadual Paulista, São Jose do Rio Preto, 1995.

- GARUTTI, V.; BRITSKI, H.A.; Descrição de uma espécie nova de *Astyanax* (Teleostei: Characidae) da bacia do alto rio Paraná e considerações sobre as demais espécies do gênero na bacia. **Comunicações do Museu de Ciência e Tecnologia da PUCRS**, v.13, p.65-88, 2000. (Série Zoologia).
- GÈRY, J. The freshwater fishes of South America. In: FITTKAU, E.J.; ILLIES, J.; KLINGE, H.; SCHWABE, G.H.; SIOLI, H. (Orgs.). **Biogeography and ecology in South America**. Junk, The Hague, 1969. p. 828-848.
- GÈRY, J. **Characoids of the world**. Neptune City: T.F.H. Publ. 1977. 672p.
- GIMBO, R.Y.; SAITA, M.V.; GONÇALVES, A.F.N.; TAKAHASHI, L.S. Diferentes concentrações de benzocaína na indução anestésica do lambari-do-rabo-amarelo (*Astyanax altiparanae*). **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v.9, n.2, p. 350-357, Abr/Jun, 2008. Disponível em: <<http://www.rbspa.ufba.br>> ISSN 1519 9940. Acesso em 03 Mar.
- GRAÇA, W.J; PAVANELLI, C.S. *Astyanax altiparanae* Garutti & Britski, 2000 (Osteichthyes, Characidae) in the Iguaçu River basin. **Acta Scientiarum**, v.24, n.2, p.451-453, 2002.
- GRIFFITHS A.J.F.; MILLER, J.H.; SUZUKI, D.T.; LEWONTIN, R.C.; GELBARTH, W.M. **Introdução à genética**. 7ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. 794p.
- GODOY, M.P. **Peixes do Brasil: subordem Characoidei, bacia do Rio Mogi Guassu**. Piracicaba: Ed. Franciscana, 1975. v.1, p.1-216.
- GOLDONI, A.; SILVA, L.B. Potencial mutagênico do fungicida mancozebe em *Astyanax jacuhiensis* (Teleostei: Characidae). **Bioscience Journal**, Uberlândia, v.28, n.2, p.297-301, mar/abr. 2012.
- GOMEZ-UCHIDA, D.; KNIGHT, T.W.; RUZZANTE, D.E. Interaction of landscape and life history attributes on genetic diversity, neutral divergence and gene flow in a pristine community of salmonids. **Molecular Ecology**, v.18, p.4854-4869, 2009. doi: 10.1111/j.1365-294X.2009.04409.x
- GOUDET J. 2001. **FSTAT, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices (version 2.9.3)**. Disponível em: < <http://www.unil.ch/izea/softwares/fstat.html>>. Acesso em 11 Nov. 2012.
- GROSS, M.C.; SCHNEIDER, C.H; MATIELLO, M.C.A.; LEITE, M.L.; BERTOLLO, L.A.C.; ARTONI, R.F. Population structure, fluctuating asymmetry and genetic variability in an endemic and highly isolated *Astyanax* fish population (Characidae). **Genetics and Molecular Biology**, v.27, n.4, p.529-535, 2004.

- HANCOCK, J.M. Microsatellites and Other Simple Sequences: Genomic Context and Mutational Mechanisms. In: GOLDSTEIN, D.B.; SCHLOTTERER, C. (Orgs.) **Microsatellites: Evolution and Applications**. Oxford: Oxford University Press, 2000. p.1-9.
- HARTL, D.L.; CLARK, A.G. **Principles of Population Genetics**. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates, Inc. Publisher. 2007. 652p.
- HASHIMOTO, D.T.; V.R GONÇALVES; J. BORTOLOZZI; F. FORESTI; F. PORTO-FORESTI. 2008. First report of a B chromosome in a natural population of *Astyanax altiparanae* (Characiformes, Characidae). **Genetics and Molecular Biology**, v.31, n.1, p.275-278.
- HATANAKA, T.; GALETTI Jr, P.M. RAPD markers indicate occurrence of structured populations in a migratory freshwater fish species. **Genetics and Molecular Biology**, v.26, p.19-25, 2003.
- HATANAKA, T.; HENRIQUE-SILVA, F.; GALETTI Jr, P.M. Population substructuring in a migratory freshwater fish *Prochilodus argenteus* (Characiformes, Prochilodontidae) from the São Francisco River. **Genetica**, v.126, p.1-7, 2006.
- HINDAR, K.; RYMAN, N.; UTTER, F. Genetic effects of cultured fish on natural fish populations. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v.48, p.945-957, 1991.
- HOARAU, G.; RIJNSDORP, A.D.; VAN DER VEER, H.W.; STAM, W.T.; OLSEN, J.L. Population structure of plaice (*Pleuronectes platessa*) in northern Europe: Microsatellites revealed large-scale spatial and temporal homogeneity. **Molecular Ecology**, v.11, p.1165-1176, 2002.
- IBM® Corp. Released. **IBM SPSS Statistics for Windows**, Version 20.0. Armonk, NY: IBM Corp. 2011.
- JAVONILLO, R.; MALABARBA, L. R.; WEITZMAN, S. H.; BURNS, J. R. Relationships among major lineages of characid fishes (Teleostei: Ostariophysi: Characiformes), based on molecular sequence data. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v.54, p.498-511, 2010.
- JEFFERY, W.R. Cavefish as a model system in evolutionary developmental biology. **Developmental Biology**, v.231, p.1-12, 2001.
- KNOWLES, L.L. Statistical Phylogeography. **Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics**, v.40, p.593-612, 2009.
- 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.
- LANGGANI, F. Revisão do gênero *Neoplecostomus* Eigenmann & Eigenmann, 1888, com a descrição de quatro novas espécies do sudeste brasileiro (Ostariophysi, Siluriformes, Loricariidae). **Comunicações do Museu de Ciência e Tecnologia da PUCRS**, v.3, p.3-31, 1990 (Série Zoologia).
- LANGHECKER, T.G.; WILKENS, H.; JUNGE, P. Introgressive hybridization in the Pachon cave population of *Astyanax fasciatus*. **Ichthyological Exploration of Freshwaters**, v.2, p.209-212, 1991.
- LATINI, A.O.; PETRERE Jr, M. Reduction of native fish fauna by alien species: an example from Brazilian freshwater tropical lakes. **Fisheries Management and Ecology**, v.11, p.71-79, 2004.
- 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, n.3, p.355-362, 2004.
- LIMA, M.R.; SALARD-CHEBOLDAEF, M.; SUGUIO, K. Etude Palinologique de la Formation Tremembé, tertiaire du Bassin de Taubaté, (Etat de São Paulo, Bresil), D' Apres les Echantillons du Sondage n°42 du CNP. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PALEONTOLOGIA, VIII, 1983, MMEDNPM, série Geologia, 27, Paleontologia Estratigráfica, v.2, p.379-393, 1985.
- LIMA, F.C.T.; MALABARBA, L.R.; BUCKUP, P.A.; PEZZI da SILVA, J.F.; VARI, R.P.; HAROLD, A.; BENINE, R.; OYAKAWA, O.T.; PAVANELLI, C.S.; MENEZES, N.A.; LUCENA, C.A.S.; MALABARBA, M.C.S.L.; LUCENA, Z.M.S.; REIS, R.E.; LANGGANI, F.; CASATTI, L.; BERTACO, V.A.; MOREIRA, C.; LUCINDA, P.H.F. Genera Incertae Sedis in Characidae. p. 106-169. In: REIS, R.E.; KULLANDER, S.O.; FERRARIS Jr., C.J. (Orgs.). **Check list of the freshwater fishes of South and Central America**. Porto Alegre: Edipucrs, 2003. 729p.
- LODGE, D.M.; STEIN, R.A.; BROWN, K.M.; COVICH, A.P.; BRONMARK, C.; GARVEY, J.E.; KLOSIEWSKI, S.P. Predicting impact of fresh-water exotic species on native biodiversity – challenges in spatial scaling. **Australian Journal of Ecology**, v.23, p.53-67, 1998.
- 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, n.2, p.131-138, 2007.

- LOWE-MCCONNELL, R.H. **Estudos ecológicos de comunidades de peixes tropicais**. São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo, 1999. 534 p.
- MAACK, R. **Geografia física do Estado do Paraná**. 2 ed., Rio de Janeiro: José Olímpio; Curitiba: Secret. Cult. Esp. Est. Paraná, 1981. 450 p.
- MACHADO, C.E.M. **Experiências de piscicultura em represas paulistas**. In: SEMINÁRIO alternativas de desenvolvimento: pesca, coleta e cultivo. São Paulo: SEP, 1977 (Série Documentos, 7).
- MALABARBA, M.C. Phylogeny of fossil Characiformes and paleobiogeography of the Tremembé Formation, São Paulo, Brazil. In: MALABARBA, L. R., REIS, R. E., VARI, R. P., LUCENA, Z. M. & LUCENA, C. A. (Orgs.). **Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes**. Porto Alegre: Edipucrs. 1998. p.69-84.
- MANTEL, N. The detection of disease clustering and a generalized regression approach. **Cancer Research**, v.27, p.209-220, 1967.
- MARGULIES, M. *et al.* Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. **Nature**, v.437, p.376-380, 2005. doi:10.1038/nature03959.
- MARQUES, C.G. **Prospecção de marcadores microssatélites em *Litopenaeus vannamei* e análise da diversidade genética em duas famílias de referencia de camarões cultivados**. 2009. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2009.
- 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, n.3, p.395-402, 2009.
- MENDONÇA, F.F.; USSAMI, L.H.F.; HASHIMOTO, D.T.; PEREIRA, L.H.G.; PORTO-Foresti, F.; OLIVEIRA, C.; GADIG, O.B.F.; Foresti, F. Identification and characterization of polymorphic microsatellite loci in the blue shark *Prionace glauca*, and cross-amplification in other shark species. **Journal of Fish Biology**, v.80, p.2643–2646, 2012. doi: 10.1111/j.1095-8649.2012.03291.x
- MENESES, J. **Popular de água doce**. Globo Rural, Edição 247. Maio 2006. Disponível em: <[http://revistagloborural.globo.com/EditoraGlobo/componentes/article/edg\\_articloe\\_print/1,3916,1192169-4530-1,00.html](http://revistagloborural.globo.com/EditoraGlobo/componentes/article/edg_articloe_print/1,3916,1192169-4530-1,00.html)>. Acesso em: 10 Ago. 2010.
- MENEZES, N.A. Implications of the distribution patterns of the species of *Oligosarcus* (Teleostei, Characidae) from central and southern South America. In: VANZOLINI, P.E.; HEYER, W.R. (Orgs.) **Proceedings of a workshop on**

- neotropical distribution patterns.** Rio de Janeiro: Academia Brasileira de Ciências, 1988. p.295-304.
- MILANI, E.J.; RAMOS, V.A. Orogenias paleozóicas do domínio sul-oriental do Gondwana e os ciclos de subsidência da Bacia do Paraná. **Revista Brasileira de Geociências**, v.28, n.4, p.473-484, 1998.
- MIRANDE, J.M. Weighted parsimony phylogeny of the family Characidae (Teleostei: Characiformes). **Cladistics**, v.25, p.1-39, 2009.
- MOYSES, C.B.; ALMEIDA-TOLEDO, L.F. Restriction Fragment Length Polymorphisms of mitochondrial DNA among five freshwater species of the genus *Astyanax* (Pisces, Characidae). **Genetics and Molecular Biology**, v.25, n.4, p.401-407, 2002.
- MORI, N.T.; MORAES, M.L.T.; MORITA, C.M.; MORI, E.S. Genetic diversity between and within populations of *Handroanthus heptaphyllus* (vell.) matto using microsatellite markers. **Cerne, Lavras**, v.18, n.1, p. 9-15, jan/mar. 2012.
- MORENO, V.R.; GRISOLIA, A.B.; CAMPAGNARI, F.; MILAZZOTTO, M.; ADANIA, C.H.; GARCIA, J.F.; SOUZA, E.B. Genetic variability of *Herpailurus yagouaroundi*, *Puma concolor* and *Panthera onca* (Mammalia, Felidae) studied using *Felis catus* microsatellites **Genetics and Molecular Biology**, v.29, n.2, p.290-293, 2006.
- NEI, M.; TAJIMA, F.; TATENO, Y. Accuracy of estimated phylogenetic trees from molecular data. **Journal of Molecular Evolution**, v.19, p.153-170, 1983.
- NETO, M.F.; VICARI, M.R.; CAMARGO, E.F.; ARTONI, R.F.; MOREIRA-FILHO, O. Comparative cytogenetics among populations of *Astyanax altiparanae* (Characiformes, Characidae, Incertae sedis). **Genetics and Molecular Biology**, v.32, n.4, p.792-796, 2009.
- NOGUEIRA, D.J.; CASTRO, S.C.; SÁ, O.R. Utilização das brânquias de *Astyanax altiparanae* (Garutti & Britski, 2000) (Teleostei, Characidae) como biomarcador de poluição ambiental no reservatório UHE Furnas - MG. **Revista Brasileira de Zootecias**, v.11, n.3, p.227-232. dez. 2009.
- NOTTER, D.R. The importance of genetic diversity in livestock populations of the future. **Journal of Animal Science**, v.77, p.61-69, 1999.
- OLIVEIRA, E.J.; PÁDUA, J.G.; ZUCCHI, M.I.; VENCOVSKY, R.; VIEIRA, M.L.C. Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. **Genetics and Molecular Biology**, v.2, p.294-307, 2006.

- ORSI, M.L.; CARVALHO, E.D.; FORESTI, F. Biologia populacional de *Astyanax altiparanae* Garutti & Britski (Teleostei, Characidae) do médio Rio Paranapanema, Paraná, **Revista Brasileira de Zoologia**, v.21, p.207-218, 2004.
- PACHECO, R.B.; GIULIANO-CAETANO, L.; DIAS, A.L. Cytotypes and multiple NORs in an *Astyanax altiparanae* population (Pisces, Tetragonopterinae). **Chromosome Science**, v.5, p.109-114, 2001.
- PAIVA, R. Lambari, de invasor a hóspede. **Revista Globo Rural**, v.11, n.142, p.49-53, 1997.
- PANARARI-ANTUNES, R.S.; PRIOLI, A.J.; PRIOLI, S.M.A.P.; GALDINO, A.S.; JUNIOR, H.F.J.; PRIOLI, L.M.. Genetic Variability of *Brycon orbignyanus* (Valenciennes, 1850) (Characiformes: Characidae) in Cultivated and Natural Populations of the Upper Paraná River, and Implications for the Conservation of the Species. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.54, n.4, p. 839-848, jul/ago 2011.
- PELICICE, F.M. **A introdução de *Cichla kelberi* Kullander & Ferreira determinando a destruição de Assembléias de peixes associadas a bancos de *Egeria* no reservatório de Rosana, rio Paranapanema.** 2007. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2007.
- PERDICES, A; DOADRIO, I. The Molecular Systematics and Biogeography of the European Cobitids Based on Mitochondrial DNA Sequences. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v.19, n.3, p.468-478, 2001.
- PEREIRA, L.H.G.; FORESTI, F.; OLIVERIA, C. Genetic structure of the migratory catfish *Pseudoplatystoma corruscans* (Siluriformes, Pimelodidae) suggests homing behavior. **Ecology of Freshwater Fish**, v.18, p.215-225, 2009.
- PEREIRA, G.S.; TEIXERA, R.K.S.; PINHO, É.V.R.V.; PADILHA, L.; CARVALHO, C.H.S. **Microssatélites para a caracterização de *Coffea arabica*.** VII Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil. 2011. 4 p.
- PERES, M.D.; VASCONCELOS, M.S.; RENESTO, E. Genetic variability in *Astyanax altiparanae* Garutti and Britski, 2000 (Teleostei, Characidae) from the Upper Paraná River basin, Brazil. **Genetics and Molecular Biology**, v.28, n.4, p.717-724, 2005.
- PETIT, R.J.; EI MOUSADIK, A.; PONS, O. Identifying populations for conservation on the basis of genetic markers. **Conservation Biology**, v.12, p.844-855, 1998.
- 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, n.4, p.1039-1050, 2008 ( Suplemento).
- PORTO-FORESTI F.; CASTILHO-ALMEIDA, R.B.; SENHORINI, J.A.; FORESTI, F. Biologia e criação do lambari-do-rabo-amarelo (*Astyanax altiparanae*). In: BALDISSEROTTO, B.; GOMES, L.C. (Orgs.) **Espécies nativas para piscicultura no Brasil**, 2.ed. Santa Maria: Editora UFSM, 2005. p.101-115.
- 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, n.4, p.421-430, 2002.
- PRITCHARD, J.K.; STEPHENS, M.; DONNELLY, P. Inference of population structure using multilocus genotype data. **Genetics**, v.155, p.945-959, 2000.
- RENESTO, E.; ZAWADZKI, C.H. Taxonomia bioquímica de *Astyanax* do reservatório de Segredo. In: AGOSTINHO, A.A.; GOMES, L.C. (Orgs). Reservatório **de Segredo: Bases Ecológicas para Manejo**. Maringá: Ed. Universidade Estadual de Maringá, 1997. p.85-96.
- REVALDAVES, E.; PEREIRA, L.H.G.; F. FORESTI; C. OLIVEIRA. Isolation and characterization of microsatellite loci in *Pseudoplatystoma corruscans* (Siluriformes: Pimelodidae) and cross-species amplification. **Molecular Ecology Notes**, v.5, p.463-465, 2005. doi: 10.1111/j.1471-8286.2005.00883.x.
- RUBIN, C.S.; WARNER, R.E.; BOUZAT, J.L.; PAIGE, K.N. Population structure of Blanding's turtles (*Emydoidea blandingi*) in an urban landscape. **Biological Conservation**, v.99, p.323-330, 2001.
- 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.
- SALLUN, A.E.M.; SUGUIO, K.; STEVAUX, J.C. Proposição formal do Alogrupo Alto Rio Paraná (SP, MS e PR). **Geologia USP - Serie Científica**, v.7, p.49-70, 2007.
- SAMPAIO, T. Relatório dos rios Itapetininga e Paranapanema. **Revista do Instituto Geográfico e Geológico**, v.II, n.3, p.222-271, 1944.
- SANCHES, A.; GALETTI, J.P.M. Microsatellites loci isolated in the freshwater fish *Brycon hilarii*. **Molecular Ecology Notes**, v.6, p.1045-1046, 2006.

- SANCHES, A.; GALETTI, J.P.M. **Population genetic structure revealed by a school of the freshwater migratory fish, *Brycon hilarii***. *Latin American Journal of Aquatic Research*, v.40, n.2, p.408-417, 2012. doi: 10.3856/vol40-issue2-fulltext-15
- SANTOS, G.B.; MAIA-BARBOSA, P.M.; VIEIRA, F.; LÓPEZ, C.M. Fish and zooplankton community structure in reservoirs of southeastern Brazil: effects of the introduction of exotic predatory fish. In: PINTO-COELHO, R.M.; GIANI, A.; VON SPERLING, E. (Orgs). **Ecology and human impact on lakes and reservoirs in Minas Gerais, with special reference to future development and management strategies**. Belo Horizonte: Segrac, 1994. p.115-132.
- SANTOS, G.B.; FORMAGIO, P.S. Estrutura da ictiofauna das represas do rio Grande, com ênfase no estabelecimento de peixes piscívoros exóticos. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v.21, n.203, p.98-106, 2000. doi:10.1111/j.1095-8649.2011.03109.x. Disponível em <wileyonlinelibrary.com>. Acesso em 23 Maio 2013.
- SANTOS, G.M.; FERREIRA, E.J.G.; ZUANON, J.A.S. 2006. **Peixes Comerciais de Manaus**. Manaus: Ibama/AM, Pro Várzea, 144p.
- SANZ, N.; CORTEY, M.; PLA, C.; GARCÍA-MARÍN, J.L. Hatchery introgression blurs ancient hybridization between brown trout (*Salmo trutta*) lineages as indicated by complementary allozymes and mtDNA markers. **Biological Conservation**, v.130, n.2, p.278-289, 2006.
- SIMIANER, H. Using expected allele number as objective function to design between and within breed conservation of farm animal biodiversity. **Journal of Animal Breeding and Genetics**, v.122, p.177-187, 2005.
- SOLÉ-CAVA, A.M. Vasculhando as cinzas. **Bioletim**, v.1, p.26-27, 1993.
- SOLÉ-CAVA, A.M.; CUNHA, H.A. A genética e a Conservação da Natureza. In: MATIOLI, S.R e FERNANDES, F.M.C. (Orgs). **Biologia Molecular e Evolução**. Riberão Preto: Holos, Editora Sociedade Brasileira de Genética, 2012. p.217-238.
- SPRUELL, P.; RIEMEN, B.E.; KNUDSEN, K. L.; UTTER, F. M.; ALLENDORF, F.W. Genetic population structure within streams: microsatellite analysis of bull trout populations. **Ecology of Freshwater Fish**, v.8, p.114-121, 1999.
- STRECKER, U.; BERNATCHEZ, L.; WILKENS, H. Genetic divergence between cave and surface populations of *Astyanax* in Mexico (Characidae, Teleostei). **Molecular Ecology**, v.12, n.3, p.699-710, 2003.
- STRECKER, U.; FAÚNDEZ, V.H.; WILKENS, H. Phylogeography of surface and cave *Astyanax* (Teleostei) from Central and North America based on

- cytochrome b sequence data. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v.33, p.469-481, 2004.
- SUGANUMA, C.H. **Avaliação da Diversidade Genética de Populações de Pacu (*Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887) do Pantanal Matogrossense com o Uso de Marcadores Moleculares do Tipo Microssatélites**. 2008. 130f. Tese (Doutorado) - Centro de Aqüicultura da Unesp - Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2008.
- SUNNUCKS, P. Efficient genetic markers for population biology. **Trends in Ecology and Evolution**, v.15, p.199-203, 2000.
- TOLEDO-FILHO, S.A.; FORESTI, F.; ALMEIDA-TOLEDO, L.F. **Biotecnologia genética aplicada a piscicultura**. São Paulo: Cadernos de Ictiogenética, v.3, 1996. 30p.
- VAN OOSTERHOUT, C.; HUTCHINSON, W.F.; WILLS, D.P.M.; SHIPLEY, P. MICRO-CHECKER: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. **Molecular Ecology Notes**, v.4, p.535-538, 2004.
- VARELA, A.I.; RITCHIE, P.A.; SMITH, P.J. Global genetic population structure in the commercially exploited deep-sea teleost orange roughy (*Hoplostethus atlanticus*) based on microsatellite DNA analyses. **Fisheries Research**, v.140, p.83-90, 2013.
- VARI, R.P. The Curimatidae, lowland neotropical fish family (Pisces: Characiformes); distribution, endemism and phylogenetic biogeography. In VANZOLINI, P.E.; HEYER, W.R. (Orgs.). **Proceedings of a workshop on neotropical distribution patterns**. Rio de Janeiro: Academia Brasileira de Ciências. 1988.
- VAZZOLER, A.E.A.; MENEZES, N.A. Síntese dos conhecimentos sobre o comportamento reprodutivo dos Characiformes da América do Sul (Teleostei, Ostariophysi). **Revista Brasileira de Biologia**, v.52, p.627-640, 1992.
- VERMULM, H. JR.; GIAMAS, M. T. D.; CAMPOS, E. C.; CAMARA, J. J. C.; BARBIERI, G. Avaliação da pesca extrativa em alguns rios do estado de São Paulo, no período entre 1994 e 1999. **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo. 2001.
- YEH, F.C.; BOYLE, T.J.B. Population genetic analysis of co-dominant and dominant markers and quantitative traits. **Belgian Journal of Botany**, v.129, p.157, 1997.
- WEIR, B.S.; COCKERHAM, C.C. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. **Evolution**, v.38, p.1358-1370, 1984.

- WEITZMAN, S.H.V.; VARI, R. P. Miniaturization in South American freshwater fishes: An overview and discussion. **Proceedings of the Biological Society of Washington**, v.101, p.444-465, 1988.
- WRIGHT J.M.; BENTZEN, P. Microsatellites: Genetic Markers for the Future. In: Carvalho, G.R.; Pitcher, T.J. (Orgs). **Molecular genetics in fisheries**. London: Chapman & Hall, 1995. p.177-121.
- WRIGHT, S. Evolution and the Genetics of Populations, v.4: Variability Within and Among Natural Populations. Chicago: The University of Chicago Press. 590p. 1978.
- WRIGHT, S. Isolation by distance. **Genetics**, v.28, p.114-138, 1943.
- ZAGANINI, R.L.; HASHIMOTO, D.T.; PEREIRA, L.H.G.; OLIVEIRA, C.; FORESTI, F.; PORTO-FORESTI, F. Isolation and characterization of microsatellite loci in the Neotropical fish *Astyanax altiparanae* (Teleostei: Characiformes) and cross-species amplification. **Journal of Genetics**, v.91, n.1. p.24-27, 2012.
- ZÁLAN, P.V.; WOLFF, S.; CONCEIÇÃO, J.C.J.; MARQUES, A.; ASTOLFI, M.A.M.; VIEIRA, I.S.; APPI, V.T.; ZANOTTO, O.A. Bacia do Paraná. In: GABAGLIA, de R.; MILANI, E.J. (Orgs.). Origem e Evolução das Bacias Sedimentares. Rio de Janeiro: Petrobrás, 1990. p.135-164.
- ZAMPARETTE, A.S. 1996. Caracterização de marcadores citogenéticos e genético moleculares em quatro populações de peixes da família Characidae – *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887). Jaboticabal. Dissertação (Mestrado) – FCAV/UNESP.
- ZUCOLOTO, R.B.; VILLELA, P.M.S.; VERDADE, L.M.; COUTINHO, L.L. Cross-species microsatellite amplification in South American caimans (*Caiman* spp and *Paleosuchus palpebrosus*). **Genetics and Molecular Biology**, v.29, p.75-78, 2006.

## ONLINE RESOURCES

# Isolation and characterization of microsatellite loci in the Neotropical fish *Astyanax altiparanae* (Teleostei: Characiformes) and cross-species amplification

ROSÂNGELA LOPES ZAGANINI<sup>1</sup>, DIOGO TERUO HASHIMOTO<sup>1</sup>, LUIZ HENRIQUE GARCIA PEREIRA<sup>2</sup>,  
CLAUDIO OLIVEIRA<sup>2</sup>, FERNANDO FERNANDES MENDONÇA<sup>2</sup>, FAUSTO FORESTI<sup>2</sup>  
and FÁBIO PORTO-FORESTI<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>*Departamento de Ciências Biológicas, Faculdade de Ciências, Universidade Estadual Paulista,  
Júlio de Mesquita Filho, 17033-360, Bauru, SP, Brazil*

<sup>2</sup>*Departamento de Morfologia, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Júlio de Mesquita Filho,  
18618-000, Botucatu, SP, Brazil*

[Zaganini R. L., Hashimoto D. T., Pereira L. H. G., Oliveira C., Mendonça F. F., Foresti F. and Porto-Foresti F. 2012 Isolation and characterization of microsatellite loci in the Neotropical fish *Astyanax altiparanae* (Teleostei: Characiformes) and cross-species amplification. *J. Genet.* **91**, e24–e27. Online only: <http://www.ias.ac.in/jgenet/OnlineResources/91/e24.pdf>]

## Introduction

We isolated and characterized 11 polymorphic microsatellite loci from the Neotropical fish *Astyanax altiparanae*, considered of economic interest, whose stocks have been seriously endangered by the introduction of predatory fishes. The analyses in a population of 33 specimens detected a large number of alleles (ranging from 4 to 11) and high levels of heterozygosity (0.64–0.88) at these loci, indicating their usefulness in population genetic studies. Cross-species amplification was successful only in species of *Astyanax*, 43% of which were polymorphic.

The Characiformes constitute one of the dominant and more diverse orders among tropical fishes, with more than 1800 species, among which the family Characidae is the most diverse, with species spread throughout the Neotropical region. However, the interrelationships among the Characidae are poorly known (Reis *et al.* 2003) and remain under discussion (Javonillo *et al.* 2010; Mirande 2010).

The genus *Astyanax* (Characiformes, Characidae) comprises 163 described species (Froese and Paulay 2010), and its systematics are very complex and several studies have currently shown that the genus needs to be more thoroughly characterized. *A. altiparanae*, encountered along the south and southeast Brazilian rivers, was formerly included in the complex '*A. bimaculatus*' (Garutti and Britski 2000), which is widely distributed in South America. *A. altiparanae* is of great economic interest, also being utilized as bait in

sport fishing and in aquaculture programmes (Garutti and Britski 2000; Porto-Foresti *et al.* 2010). However, the stocks of this species are seriously endangered by introduced predatory fishes, such as tucunaré (*Cichla* spp.) and corvina (*Plagioscion squamosissimus*) (Agostinho *et al.* 2007).

Many molecular markers have been frequently used for the *Astyanax* species (Prioli *et al.* 2002; Leuzzi *et al.* 2004; Peres *et al.* 2005). However, there are no microsatellite data available for this group. These markers can be valuable tools to investigate genetic variability, with applications to conservation and population genetics (Oliveira *et al.* 2006). Their use in stock characterization of *A. altiparanae* may have practical implications for fisheries, fish farming, and conservation biology. We describe the isolation and characterization of 11 novel microsatellite loci from *A. altiparanae*, and their cross-amplification for potential utility in studies of additional species.

## Materials and methods

A microsatellite-enriched genomic library was obtained for *A. altiparanae* following the protocol described by Billotte *et al.* (1999). Genomic DNA was extracted using the commercial Wizard Genomic DNA Purification kit (Promega, São Paulo, Brazil). The total DNA was digested with *RsaI* and enriched in (AC)<sub>n</sub> and (AG)<sub>n</sub> repeats. Enriched fragments were amplified by polymerase chain reaction (PCR) and then linked into a pGEM vector (Promega) and transformed into competent XL1-blue *Escherichia coli* cells. Positive colonies were tested by PCR to confirm the presence

\*For correspondence. E-mail: fpforesti@fc.unesp.br.

**Keywords.** molecular markers; fish conservation; aquaculture; polymorphic DNA.

of inserts. Selected recombinant colonies were sequenced using the primers T7 (5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3') and SP6 (5'-ATTTAGGTGACACTATAGAA-3') and the BigDye Terminator kit (Applied Biosystems, São Paulo, Brazil), and electrophoresed on an ABI Prism 377 automated sequencer (Applied Biosystems, Foster City, USA). Flanking primers were designed with Primer3 software (Rozen and Skaletsky 2000).

## Results and discussion

We isolated and sequenced a total of 48 positive colonies, resulting in 25 good quality flanking sequences. The selected sequences were used to characterize a sample of 33 *A. altiparanae* specimens, collected in the Batalha river (22°6'40.92"S, 49°16'5.81"W), Brazil, and tested in five individuals of the species *Salminus brasiliensis*, *Brycon amazonicus*, *Brycon hilarii*, *A. fasciatus*, *A. bockmanni*, *A. paranae*, *A. abramis*, *A. schubarti*, *A. ribeirae* and *A. jacuhiensis*. PCR was performed in 20  $\mu$ L reaction volume containing approximately 10.9  $\mu$ L H<sub>2</sub>O miliQ, 2.75  $\mu$ L PCR buffer 10 $\times$ , 1.25  $\mu$ L MgCl<sub>2</sub> 50 mM, 1.5  $\mu$ L dNTP 1.25 mM (Invitrogen, São Paulo, Brazil), 1  $\mu$ L of each primer 10  $\mu$ M, 0.1  $\mu$ L *Taq* DNA polymerase (Invitrogen) 5U/ $\mu$ L and 1.5  $\mu$ L of genomic DNA. The conditions for amplification were 5 min at 95°C followed by 35 cycles of 30 s at 95°C, 30 s at the annealing temperature (see table 1), 5 s at 72°C, and a final extension time of 5 min at 72°C. The amplification products were separated in 6% denaturing

polyacrylamide gel and visualized by silver nitrate staining, photographed, and analysed using the Kodak Digital Science program Eastman Kodak Company, Rochester, USA. Allele scoring was done using the 10-bp DNA Ladder (Invitrogen, São Paulo, Brazil) as size standard.

Among the 25 tested primer pairs, 11 loci were highly polymorphic (GenBank accession numbers JQ246359 to JQ246369). The allele number varied from 4 (Asty12) to 11 (Asty21) by locus; the value of expected heterozygosity varied from 0.64 (Asty12) to 0.88 (Asty13), and three loci showed deviation from the Hardy–Weinberg equilibrium (HWE) ( $P < 0.01$ ) (table 1). They were calculated using GENALEX v6.1 software (Peakall and Smouse 2007). Pairwise tests for linkage disequilibrium among loci were calculated using GENEPOP 3.3 package (Raymond and Rousset 1995), and were nonsignificant. Micro-Checker (Van Oosterhout *et al.* 2004) was used to verify possible causes of HWE departures, and the analysis showed no evidence of stuttering, allelic dropout, or null alleles as a possible cause of HWE departures.

Cross-species amplification was investigated in 10 additional species of the same family (table 2). All 11 primers analysed revealed a high level (89%) of cross-amplification in species of *Astyanax*, 43% of which were polymorphic. On the other hand, with noncongeneric species (*Salminus brasiliensis*, *Brycon amazonicus* and *B. hilarii*), the cross-amplification did not show positive results. Barbará *et al.* (2007) revealed that the transferability for fish species can be around 70% in congeners, lowering to 60% among

**Table 1.** Description of microsatellite loci and primer sequences in *Astyanax altiparanae*.

	Primer sequence (5'-3')	Repeat motif	Length (bp)	$T_a$ (°C)	$n$	$A$	$H_o$	$H_e$	$F_{is}$
Asty 4	GGTCACTGGAGGACAGATGTT GGCATGTGCTTGAATGGA	(AC) <sub>17</sub>	200	53	31	5	0.852	0.754	-0,129
Asty 11	TAAATCTATAAAGTCACCAT TTTGTTTTTCTGCCGCTGTTT	(AC) <sub>12</sub>	151	50	32	9	0.630	0.837	0,248
Asty 12	AGACACAATCAGCCGCGAAATG ATCCCCTCTCCACAACCCAACACA	(GT) <sub>8</sub>	163	58	25	4	0.742	0.638	-0,162
Asty 13	AAATGGGTGCAAGCAACG TGCCTGTCTGTAAGCATGTG	(GT) <sub>8</sub>	160	58	25	10	0.563	0.877	0,359*
Asty 15	CAACTTTTACTTAAAACCTGC ATGGGTCTTTACTGCTGAATGTAT	(AC) <sub>17</sub> – (CT) <sub>6</sub>	212	50	33	6	0.500	0.773	0,353*
Asty 16	AAAGTAAAGGGCATCTGTGGAGAA AGAGGGCATCATTGTACATTTTTG	(AC) <sub>10</sub>	165	52	32	8	0.769	0.860	0,106
Asty 21	TTTATGGGGACCGTGAGATGTGC CAGGGGCAGCGGTGATACCT	(CA) <sub>9</sub>	150	57	24	11	0.500	0.852	0,413*
Asty 23	TCAATGGAACCTATGGACAAC GTGGGAAGTAGCCTAATAAATA	(CA) <sub>12</sub>	160	52	30	6	0.600	0.743	0,193
Asty 24	AGACCAAACACTAGGGCTCAG TTCGTCAATCTTCTTCACTCTT	(GT) <sub>9</sub>	139	52	32	7	0.677	0.800	0,153
Asty 26	CCCATTGATCCTGCCTCTAA CAGTCCTGACACAGAGAT	(GT) <sub>8</sub>	190	58	25	8	0.654	0.856	0,236
Asty 27	GCATTGTTCAAGTTGGGTCT AAACGTGGTGAGAGGGAGTG	(GT) <sub>8</sub>	150	58	25	9	0.667	0.809	0,176

Intrapopulational analysis:  $T_a$ , annealing temperature;  $n$ , number of individuals;  $A$ , allele number;  $H_o$ , observed heterozygosity;  $H_e$ , expected heterozygosity;  $F_{is}$ , endogamy index. \*Loci that displayed significant deviations from Hardy–Weinberg equilibrium ( $P < 0.01$ ).

**Table 2.** Cross-amplification of the 11 polymorphic loci in seven species of *Astyanax* and three others species of Characidae.

Species	Primer - Asty										
	4	11	12	13	15	16	21	23	24	26	27
<i>Astyanax paranae</i>	P	M	P	M	P	M	P	M	P	M	M
<i>A. bockmanni</i>	–	P	P	–	P	M	P	P	P	P	M
<i>A. fasciatus</i>	–	P	P	P	P	P	P	P	P	P	M
<i>A. jacuhiensis</i>	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
<i>A. abramis</i>	M	P	M	P	–	M	M	P	P	P	M
<i>A. schubarti</i>	M	P	P	–	–	M	M	P	M	M	M
<i>A. ribeirae</i>	M	P	P	P	–	M	P	P	P	P	M
<i>S. brasiliensis</i>	M	–	M	–	M	M	M	M	M	M	–
<i>B. amazonicus</i>	M	–	M	M	M	M	M	M	M	M	M
<i>B. hilarii</i>	M	–	M	M	M	M	M	M	M	M	M

P, polymorphic; M, monomorphic; –, no amplification.

genera of the same family, which showed that the success of transferability of microsatellite loci were directly linked to phylogenetic relationship between the groups tested.

*Astyanax* spp. represent an excellent model group for studies of evolutionary mechanisms (Langecker *et al.* 1991; Jeffery 2001) because they are naturally distributed into structured groups (Garutti and Britski 2000), favouring vicariant processes responsible for the great diversity of Neotropical fishes (Castro 1999). Additionally, several *Astyanax* spp. are distributed in species complexes, such as *bimaculatus*, *fasciatus* and *scabripinnis* (Moreira-Filho and Bertolo 1991; Fernandes and Martins-Santos 2004; Artoni *et al.* 2006), which are abundant in rivers and other aquatic habitats throughout the Neotropical region (Reis *et al.* 2003). Consequently, the results obtained here reinforce the applicability of the microsatellites for parentage population genetic and studies in this heterogeneous group of fishes.

#### Acknowledgements

This work was supported by grants from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). We are grateful to Laboratório de Análise Genética e Molecular, CBMEG – UNICAMP, for help with microsatellite library enrichment.

#### References

- Agostinho A. A., Gomes L. C. and Pelicice F. M. 2007 *Ecologia e manejo de recursos pesqueiros em reservatórios do Brasil*. EDUEM, Maringá, Brazil.
- Artoni R. F., Shibatta O. A., Gross M. C., Schneider C. H., Almeida M. C., Vicari M. R. and Bertollo L. A. C. 2006 *Astyanax* aff. *fasciatus* Cuvier, 1819 (Teleostei; Characidae): evidences of a species complex in the upper rio Tibagi Basin (Paraná, Brazil). *Neotrop. Ichthyol.* **4**, 197–202.
- Barbará T., Palma-Silva C., Paggi G. M., Bered F., Fay M. F. and Lexer C. 2007 Cross-species transfer of nuclear microsatellite markers: potential and limitations. *Mol. Ecol.* **16**, 3759–3767.
- Billotte N., Lagoda P. J. L., Risterucci A. M. and Baurens F. C. 1999 Microsatellite-enriched libraries: applied methodology for the development of SSR markers in tropical crops. *Fruits* **54**, 277–288.
- Castro R. M. C. 1999 Evolução da ictiofauna de riachos sul-americanos: Padrões gerais e possíveis processos causais. In *Ecologia de Peixes de Riachos* (ed. E. P. Caramashi, R. Mazzoni and P. R. Peres-Neto), pp. 139–155. PPGE-UFRJ, Rio de Janeiro, Brazil.
- Fernandes C. A. and Martins-Santos I. C. 2004 Cytogenetic studies in two populations of *Astyanax altiparanae* (Pisces, Characiformes). *Hereditas* **141**, 328–332.
- Froese R. and Pauly D. 2010 FishBase. World Wide Web electronics publication, <http://www.fishbase.org/>. (Accessed 03 November 2010).
- Garutti V. and Britski H. A. 2000 Descrição de uma nova espécie de *Astyanax* (Teleostei, Characidae) da bacia do Alto Paraná e considerações sobre as demais espécies do gênero na bacia. *Comun. Mus. Ciênc. Ser. Zool. PUCRS* **13**, 65–88.
- Javonillo R., Malabarba L. R., Weitzman S. H. and Burns J. R. 2010 Relationships among major lineages of characid fishes (Teleostei: Ostariophysi: Characiformes), based on molecular sequence data. *Mol. Phyl. Evol.* **54**, 498–511.
- Jeffery W. R. 2001 Cavefish as a model system in evolutionary developmental biology. *Dev. Biol.* **231**, 1–12.
- Langecker T. G., Wilkens H. and Junge P. 1991 Introgressive hybridization in the Pachon cave population of *Astyanax fasciatus*. *Ichthyol. Explor. Freshw.* **2**, 209–212.
- Leuzzi M. S. P., Almeida F. S., Orsi M. L. and Sodrê L. M. K. 2004 Analysis by RAPD of the genetic structure of *Astyanax altiparanae* (Pisces, Characiformes) in reservoirs on the Paranapanema River, Brazil. *Genet. Mol. Biol.* **27**, 355–362.
- Mirande J. M. 2010 Phylogeny of the family Characidae (Teleostei: Characiformes): from characters to taxonomy. *Neotrop. Ichthyol.* **8**, 385–568.
- Moreira-Filho O. and Bertollo L. A. 1991 *Astyanax scabripinnis* (Pisces: Characidae), a species complex. *Rev. Bras. Genet.* **14**, 331–357.
- Oliveira E. J., Pádua J. G., Zucchi M. I., Vencovsky R. and Vieira M. L. C. 2006 Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. *Genet. Mol. Biol.* **2**, 294–307.
- Peakall R. and Smouse P. E. 2007 GENALEX 6.1: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. Australian National University, Canberra, Australia, (<http://www.anu.edu.au/BoZo/GenALEX>).

*Isolation of microsatellites in Astyanax altiparanae*

- Peres M. D., Vasconcelos M. S. and Renesto E. 2005 Genetic variability in *Astyanax altiparanae* Garutti and Britski, 2000 (Teleostei, Characidae) from the Upper Paraná River basin, Brazil. *Genet. Mol. Biol.* **28**, 717–724.
- Porto-Foresti F., Castilho-Almeida R. B., Senhorini J. A. and Foresti F. 2010 Biologia e criação do lambari-do-rabo-amarelo (*Astyanax altiparanae*). In *Espécies nativas para piscicultura no Brasil* (ed. B. Baldisserotto and L. C. Gomes), pp. 101–115. Editora UFSM, Santa Maria.
- Prioli S. M. A. P., Prioli A. J., Júlio Jr H. F., Pavanelli C. S., Oliveira A. V., Carrer H. *et al.* 2002 Identification of *Astyanax altiparanae* (Teleostei, Characidae) in the Iguazu River, Brazil, based on mitochondrial DNA and RAPD markers. *Genet. Mol. Biol.* **25**, 421–430.
- Raymond M. and Rousset F. 1995 Genepop (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. *J. Her.* **86**, 248–249.
- Reis R. E., Kullander S. O. and Ferraris C. J. 2003 *Check list of the freshwater fishes of South and Central America*. Edipucrs, Porto Alegre, Brazil.
- Rosen S. and Skaletsky H. 2000 Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In *Bioinformatics methods and protocols: methods in molecular biology* (ed. S. Misener and S. A. Krawetz), pp. 365–386. Humana Press, Totowa, New Jersey, USA.
- Van Oosterhout C., Hutchinson W. F. , Wills D. P. M. and Shipley P. 2004 Micro-checker: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Mol. Ecol. Notes* **4**, 535–538.

Received 28 October 2011, in final revised form 30 December 2011; accepted 4 January 2012

Published on the Web: 28 March 2012