



**INSTITUTO LATINO-AMERICANO DE  
CIÊNCIAS DA VIDA E DA NATUREZA  
(ILACVN)**

**CIÊNCIAS BIOLÓGICAS – ECOLOGIA E  
BIODIVERSIDADE**

**DIVERSIDADE E ESTRUTURA GENÉTICAS DE *Bryconamericus aff. iheringii*  
(CHARACIFORMES: CHARACIDAE) NA ÁREA DE INFLUÊNCIA DO  
RESERVATÓRIO DA ITAIPU**

**VILMARA DE OLIVEIRA**

Foz do Iguaçu - PR  
2021



**INSTITUTO LATINO-AMERICANO DE  
CIÊNCIAS DA VIDA E DA NATUREZA  
(ILACVN)**

**CIÊNCIAS BIOLÓGICAS – ECOLOGIA E  
BIODIVERSIDADE**

**DIVERSIDADE E ESTRUTURA GENÉTICAS DE *Bryconamericus aff. iheringii*  
(CHARACIFORMES: CHARACIDAE) NA ÁREA DE INFLUÊNCIA DO  
RESERVATÓRIO DA ITAIPU**

**VILMARA DE OLIVEIRA**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto Latino-Americano de Ciências da Vida e da Natureza da Universidade Federal da Integração Latino-Americana, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas – Ecologia e Biodiversidade.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Henrique Garcia Pereira

VILMARA DE OLIVEIRA

**DIVERSIDADE E ESTRUTURA GENÉTICAS DE *Bryconamericus aff. iheringii*  
(CHARACIFORMES: CHARACIDAE) NA ÁREA DE INFLUÊNCIA DO  
RESERVATÓRIO DA ITAIPU**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto Latino-Americano de Ciências da Vida e da Natureza da Universidade Federal da Integração Latino-Americana, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas – Ecologia e Biodiversidade.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Orientador: Prof. Dr. Luiz Henrique Garcia Pereira  
UNILA

---

Prof. Dr. Guilherme José da Costa-Silva  
UNISA

---

Prof. Dr. Dhiego Gomes Ferreira  
UENP

Foz do Iguaçu, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_.

Dedico este trabalho à minha mãe Dâmaris, por sempre ter acreditado em mim e por ter me oferecido ajuda incondicional.

## **AGRADECIMENTOS**

Ao meu orientador Prof. Dr. Luiz Henrique Garcia Pereira, por ter me dado a oportunidade de realizar este trabalho e por toda a sua dedicação, ajuda e paciência ao me orientar.

À Same Costa Lima e Caroline Apolinário da Silva, por toda a ajuda, sugestões e correções que foram fundamentais para a realização deste trabalho.

Aos professores Dr. Dhiego Gomes Ferreira e Dr. Guilherme José da Costa-Silva por terem aceitado avaliar este trabalho e pelas ótimas sugestões e correções.

Aos meus companheiros de curso/laboratório e amigos Fernanda Albino Festa, Diego Fernando Cadena Mantilla, Pilar Mireya Huatatoça Vargas, Jerson Rogelio Chanchay Castro, Mariel Natalia Moreno Benítez e Marina Xavier da Silva pela ajuda em momentos difíceis da vida acadêmica e pessoal e por todos os bons momentos que compartilhamos no laboratório, em campo e na vida.

A todos os professores da UNILA, por compartilhar seus conhecimentos conosco de forma excelente.

À minha falecida mãe Dâmaris, por sempre ter estado ao meu lado oferecendo todo o auxílio necessário para que eu perseguisse e concretizasse o sonho de me tornar bióloga.

Ao meu tio Samuel por todo o apoio dado antes e durante todos esses anos de curso.

Aos meus amigos de longa data, em especial a Taissa, por sempre estar presente nos momentos difíceis, me encorajando a seguir em frente e concluir todos os meus projetos.

**Muito obrigada!**

OLIVEIRA, Vilmara de. **DIVERSIDADE E ESTRUTURA GENÉTICAS DE *Bryconamericus* aff. *iheringii* (CHARACIFORMES: CHARACIDAE) NA ÁREA DE INFLUÊNCIA DO RESERVATÓRIO DA ITAIPU**. 2021. 58. Trabalho de Conclusão de Curso (Ciências Biológicas - Ecologia e Biodiversidade) – Universidade Federal da Integração Latino-Americana, Foz do Iguaçu, 2021.

## RESUMO

A diversidade genética é necessária para que as populações evoluam e se adaptem às mudanças ambientais, e comumente, está distribuída em um padrão dentro e entre populações que é referido como estrutura genética. O isolamento e a existência de poucos caminhos migratórios entre águas doces implicam na estruturação genética, principalmente, para peixes que possuem baixa mobilidade. Peixes de pequeno porte ( $\leq 15$  cm de comprimento), que habitam riachos, representam, no mínimo 50% de toda a ictiofauna sul-americana e apresentam um alto grau de endemismo, devido, em parte, à sua baixa capacidade de deslocamento. Neste contexto, o presente trabalho objetivou avaliar a diversidade e a estrutura genéticas do caracídeo *Bryconamericus* aff. *iheringii* na área de influência do reservatório da Itaipu Binacional. Para isto, foram analisados 47 espécimes, 23 coletados em riachos da margem direita (Paraguai) e 24 coletados em riachos da margem esquerda (Brasil) do reservatório da Itaipu. Para acessar sua diversidade genética, foi empregado o marcador molecular D-loop, sendo estimado o número de haplótipos, os índices de diversidade haplotípica e nucleotídica e o nível de estruturação entre as diferentes amostras. *B.* aff. *iheringii* apresentou níveis de diversidade genética dentro do padrão relatado para a espécie, com moderados (amostras do Paraguai) a altos (amostras do Brasil) níveis de diversidade, o que se deve, sobretudo, ao fato de que quase todos os riachos paraguaios analisados são de uma única microbacia, enquanto os riachos brasileiros são de quatro microbacias diferentes. As populações não parecem ter respondido a eventos drásticos recentes, pois mesmo as presentes em regiões sob a pressão de atividades agrícolas, mostram variações no DNA mitocondrial. Foram encontrados altos níveis de estruturação genética entre o conjunto de amostras paraguaio e brasileiro e entre as microbacias dentro de cada país, o que se deve, principalmente, aos processos de colonização destas drenagens, os quais possivelmente envolvem fundadores com diferentes linhagens haplotípicas. Além disso, parece plausível que o rio Paraná (reservatório da Itaipu) funciona como uma barreira ao fluxo gênico entre as diferentes margens e entre suas microbacias. Deste modo, a identificação de linhagens é de grande importância, pois a manutenção da diversidade genética de uma espécie depende de sua preservação. Considerando a importância de estudos genético-populacionais para a conservação de espécies, espera-se que este trabalho possa servir como base para futuros estudos mais amplos com peixes de riachos.

**Palavras-chave:** genética de populações; diversidade genética; estrutura populacional; ictiofauna.

OLIVEIRA, Vilmara de. **DIVERSIDAD Y ESTRUCTURA GENÉTICAS DE *Bryconamericus aff. iheringii* (CHARACIFORMES: CHARACIDAE) EN LA ZONA INFLUENCIADA POR LA RESERVA DE ITAIPU**. 2021. 58. Trabalho de Conclusão de Curso (Ciências Biológicas - Ecologia e Biodiversidade) – Universidade Federal da Integração Latino-Americana, Foz do Iguaçu, 2021.

## RESUMEN

La diversidad genética es necesaria para que las poblaciones evolucionen y se adapten a los cambios ambientales y, por lo general, se distribuye en un patrón dentro y entre las poblaciones que se conoce como estructura genética. El aislamiento y la existencia de pocas rutas migratorias en las aguas dulces conllevan a estructuración genética, especialmente para los peces que tienen baja movilidad. Los peces pequeños ( $\leq 15$  cm de largo), que habitan los riachuelos, representan al menos el 50% de toda la ictiofauna sudamericana y presentan un alto grado de endemismo, debido, en parte, a su baja capacidad de desplazamiento. En este contexto, el presente trabajo tuvo como objetivo evaluar la diversidad y la estructura genéticas del caracideo *Bryconamericus aff. iheringii* en la zona influenciada por la reserva de Itaipu Binacional. Para ello, se analizaron 47 ejemplares, 23 recolectados en riachuelos de la margen derecha (Paraguay) y 24 recolectados en riachuelos de la margen izquierda (Brasil) de la reserva de Itaipu. Para acceder a su diversidad genética se utilizó el marcador molecular D-loop, estimando el número de haplotipos, los índices de diversidad de haplotipos y nucleótidos y el nivel de estructuración entre las diferentes muestras. *B. aff. iheringii* mostró niveles de diversidad genética dentro del patrón reportado para la especie, con niveles de diversidad moderados (muestras de Paraguay) a altos (muestras de Brasil), lo que se debe principalmente al hecho de que casi todos los riachuelos paraguayos analizados son de una sola microcuenca, mientras que los riachuelos brasileños provienen de cuatro microcuencas diferentes. Las poblaciones no parecen haber respondido a eventos drásticos recientes, ya que incluso aquellos presentes en regiones bajo la presión de las actividades agrícolas muestran variaciones en el ADN mitocondrial. Se encontraron altos niveles de estructuración genética entre el conjunto muestral paraguayo y brasileño y entre las microcuencas dentro de cada país, lo que se debe principalmente a los procesos de colonización de estos drenajes, que posiblemente involucran a fundadores con diferentes linajes haplotípicos. Además, parece plausible que el río Paraná (reserva de Itaipu) actúe como una barrera al flujo génico entre las diferentes márgenes y entre sus microcuencas. Por tanto, la identificación de linajes es de gran importancia, ya que la diversidad genética de una especie depende de su preservación. Teniendo en cuenta la importancia de los estudios genético-poblacionales para la conservación de especies, se espera que este trabajo pueda servir como base para futuros estudios más amplios con peces de riachuelos.

**Palabras-clave:** genética de poblaciones; diversidad genética; estructura poblacional; ictiofauna.

OLIVEIRA, Vilmara de. **GENETIC DIVERSITY AND STRUCTURE OF *Bryconamericus* aff. *iheringii* (CHARACIFORMES: CHARACIDAE) IN THE AREA OF INFLUENCE OF THE ITAIPU RESERVOIR**. 2021. 58. Trabalho de Conclusão de Curso (Ciências Biológicas - Ecologia e Biodiversidade) – Universidade Federal da Integração Latino-Americana, Foz do Iguaçu, 2021.

### ABSTRACT

Genetic diversity is necessary for populations to evolve and adapt to environmental changes, and commonly, it is distributed in a pattern within and between populations that is referred to as genetic structure. Isolation and the existence of few migratory paths between freshwaters imply genetic structuring, especially for fish that have low mobility. Small-bodied fish ( $\leq 15$  cm long), which inhabit streams, represent at least 50% of all South American ichthyofauna and have a high degree of endemism, due in part to their low displacement ability. In this context, this study aimed to evaluate the genetic diversity and structure of the characid *Bryconamericus* aff. *iheringii* in the area of influence of the Itaipu Binacional reservoir. For this purpose, were analyzed 47 specimens, 23 captured in streams on the right bank (Paraguay) and 24 captured in streams on the left bank (Brazil) of the Itaipu reservoir. To access its genetic diversity the molecular marker D-loop was used, estimating the number of haplotypes, the haplotype and nucleotide diversity indices and the level of structuring between the different samples. *B.* aff. *iheringii* showed levels of genetic diversity within the pattern reported for the species, with moderate (samples from Paraguay) to high (samples from Brazil) levels of diversity, which is mainly due to the fact that almost all Paraguayan streams analyzed are from a single micro-basin, while Brazilian streams are from four different micro-basins. Populations do not seem to have responded to recent drastic events, as even those present in regions under pressure from agricultural activities, show variations in mitochondrial DNA. High levels of genetic structuring were found between the Paraguayan and Brazilian sample set and between the micro-basins within each country, which is mainly due to the colonization processes of these drainages, which possibly involve founders with different haplotypic lineages. Furthermore, it seems plausible that the Paraná River (Itaipu reservoir) works as a barrier to gene flow between the different banks and between its micro-basins. Thus, the identification of lineages is of great importance, as the maintenance of the genetic diversity of a species depends on its preservation. Considering the importance of population-genetic studies for species conservation, it is expected that this study can serve as a basis for future broader studies with stream fish.

**Key words:** population genetics; genetic diversity; population structure; ichthyofauna.



## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Espécime de *Bryconamericus aff. iheringii* coletado em um riacho situado na margem esquerda (Brasil) do reservatório da Itaipu..... 26
- Figura 2** - Uso e ocupação do solo no Estado do Paraná, Brasil. Fonte: Secretaria Estadual de Educação do Estado do Paraná (2007). Modificado por: O autor (2021)..... 29
- Figura 3** - Pontos de amostragem e suas localizações na margem direita (Paraguai) e esquerda (Brasil) do reservatório da Itaipu..... 31
- Figura 4** - Haplótipos (H1 – H19) obtidos e suas frequências (%) correspondentes. 35
- Figura 5** - Rede de haplótipos obtida a partir do sequenciamento parcial da região D-loop do DNA mitocondrial em 47 amostras de *Bryconamericus aff. iheringii* de riachos das margens direita (Paraguai - PY) e esquerda (Brasil - BR) do reservatório da Itaipu..... 36
- Figura 6** - Haplótipos presentes em cada ponto de amostragem da margem direita (Paraguai) e esquerda (Brasil) do reservatório da Itaipu..... 37
- Figura 7** - Estruturação populacional pelo método bayesiano para as sequências parciais da região D-loop do DNA mitocondrial dos 47 espécimes de *Bryconamericus aff. iheringii* de riachos das margens esquerda (Brasil) e direita (Paraguai) do reservatório da Itaipu..... 42

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** - Número de indivíduos analisados para cada ponto de amostragem na margem direita (Paraguai) e esquerda (Brasil) do reservatório da Itaipu..... 32
- Tabela 2** - Diversidade genética de *Bryconamericus aff. iheringii* coletados em seis microbacias nas margens direita (Paraguai) e esquerda (Brasil) do reservatório da Itaipu, obtida a partir do sequenciamento parcial da região D-loop do DNA mitocondrial..... 38
- Tabela 3** - Análise de Variância Molecular (AMOVA) para as amostras de *Bryconamericus aff. iheringii* de riachos das margens direita (Paraguai) e esquerda (Brasil) do reservatório da Itaipu, mostrando a porcentagem de variação entre grupos (Paraguai e Brasil), entre populações dentro de grupos e dentro de populações (pontos de coleta)..... 39
- Tabela 4** - Análise de Variância Molecular (AMOVA) para as amostras de *Bryconamericus aff. iheringii* de riachos das margens direita (Paraguai) e esquerda (Brasil) do reservatório da Itaipu, mostrando a porcentagem de variação entre grupos Paraguai (áreas preservadas/agrícolas) e Brasil (áreas preservadas/agrícolas), entre populações dentro de grupos e dentro de populações (áreas preservadas Paraguai, áreas agrícolas Paraguai, áreas preservadas Brasil e áreas agrícolas Brasil)..... 40
- Tabela 5** - Análise de Variância Molecular (AMOVA) para as amostras de *Bryconamericus aff. iheringii* de riachos das margens direita (Paraguai) e esquerda (Brasil) do reservatório da Itaipu, mostrando a porcentagem de variação entre grupos (Paraguai e Brasil), entre populações dentro de grupos e dentro de populações (microbacias)..... 40
- Tabela 6** - Diferenciação genética ( $\Phi_{ST}$ ) par a par de *Bryconamericus aff. iheringii* entre as seis microbacias..... 41

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	13
<b>1.1 Ecossistemas de riachos</b> .....	13
<b>1.2 Diversidade de peixes em ecossistemas de água doce</b> .....	15
<b>1.3 Diversidade e estrutura genética</b> .....	17
1.3.1 Diversidade genética.....	17
1.3.2 Estrutura genética populacional.....	19
1.3.3 Diversidade dentro e entre populações de peixes.....	21
1.3.4 Avaliando a diversidade e estrutura genética.....	22
<b>1.4 A espécie <i>Bryconamericus aff. iheringii</i></b> .....	24
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	27
2.1 Objetivo geral.....	27
2.2 Objetivos específicos.....	27
<b>3 METODOLOGIA</b> .....	28
<b>3.1 Caracterização da área de estudo</b> .....	28
<b>3.2 Obtenção das amostras</b> .....	29
<b>3.3 Obtenção das sequências <i>D-loop</i></b> .....	32
<b>3.4 Análise das sequências <i>D-loop</i></b> .....	33
<b>3.5 Análise de dados</b> .....	33
3.5.1 Diversidade genética.....	33
3.5.2 Estrutura genética populacional.....	33
<b>4 RESULTADOS</b> .....	35
<b>4.1 Diversidade genética</b> .....	35
<b>4.2 Estrutura genética populacional</b> .....	38
<b>5 DISCUSSÃO</b> .....	43
<b>5.1 Diversidade genética</b> .....	43
<b>5.2 Estrutura genética populacional</b> .....	46
<b>6 CONCLUSÃO</b> .....	50

<b>7 REFERÊNCIAS.....</b>	<b>51</b>
---------------------------	-----------

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Ecossistemas de riachos

Os ecossistemas fluviais integram os organismos vivos, as interações biológicas e todos os processos físicos e químicos interatuantes que coletivamente determinam o seu funcionamento (ALLAN & CASTILLO, 2007). Entre estes ecossistemas, rios e riachos não possuem uma distinção real, porém, rios são considerados corpos d'água lóticos de sistema aberto, fluxo unidirecional (DUDGEON et al., 2006; TOWNSEND; BEGON; HARPER, 2010), incluindo mosaicos de tipos de habitat e gradientes ambientais, com alta complexidade espacial e conectividade longitudinal, lateral e vertical (ALLAN, 2004; ALLAN & CASTILLO, 2007). Enquanto isto, riachos são definidos como corpos d'água menores, com baixa produção primária autotrófica local, possuindo assim, uma comunidade lótica predominantemente heterotrófica e dependente da importação alóctone de matéria orgânica (CASTRO, 1999; ALLAN & CASTILLO, 2007).

Rios e riachos podem ser hierarquicamente classificados por ordens dentro de um sistema de drenagem, de modo que o menor riacho com fluxo permanente é referido como de primeira ordem; a união de dois riachos de primeira ordem forma um riacho de segunda ordem; e assim por diante (ALLAN & CASTILLO, 2007), sendo considerados riachos os corpos d'água até a quarta ordem (CASTRO, 1999). Essa hierarquia por ordens é uma medida aproximada de tamanho e correlaciona-se com várias medidas mais precisas, como a área drenada, o volume de água descarregada e as dimensões do canal (ALLAN & CASTILLO, 2007).

A principal função de força em sistemas lóticos é a vazão hidrológica. Os eventos de chuvas, quando torrenciais, determinam elevações drásticas e repentinas no volume da água nos riachos, podendo alterar a conformação do leito fluvial e carrear organismos e sedimentos (ESTEVES, 2011). As secções altas de um corpo d'água são geralmente mais turbulentas, o que faz com que a concentração de oxigênio seja mais alta; a jusante, temperaturas mais altas fazem com que haja redução na sua solubilidade (TOWNSEND; BEGON; HARPER, 2010). Outras

condições físicas e químicas mudam ao longo do curso de um determinado sistema lótico, como pH, temperatura da água e vazão (TOWNSEND, BEGON E HARPER, 2010). A temperatura da água responde ao sombreamento, assim, cabeceiras e pequenos riachos possuem águas mais frias e rios mais largos possuem águas mais quentes, pois são pouco sombreados (ALLAN & CASTILLO, 2007).

Riachos e trechos de cabeceira até a quarta ordem são os componentes mais abundantes em uma rede fluvial (ALLAN & CASTILLO, 2007; MEYER et al., 2007; RICHARDSON, 2019). Estas drenagens possuem dimensões físicas relativamente pequenas e suas bacias hidrográficas são influenciadas pelas condições locais (MEYER et al., 2007). São especialmente sensíveis à perturbações devido ao seu tamanho pequeno e, por contribuírem para a integridade ecológica nos ecossistemas a jusante, a degradação de seus habitats e a perda de conectividade com corpos d'água maiores têm consequências negativas para todos os ecossistemas associados (MEYER et al., 2007). Em razão de seu isolamento e dimensões, os trechos de cabeceira fornecem pequenos espaços de habitat e refúgios livres de predadores de grande porte, competidores e espécies invasoras, o que é importante para as espécies que habitam esses ambientes, pois a maioria é de pequeno porte (RICHARDSON, 2019; MEYER et al., 2007). Esses pequenos espaços de habitat resultam em populações relativamente pequenas e isoladas, o que pode levar à diferenciação genética das populações por deriva genética, seleção natural, ou ambas (RICHARDSON, 2019).

Isolamentos populacionais em cabeceiras de riachos também podem culminar na radiação de grupos taxonômicos, no entanto, essas populações ainda podem ser vulneráveis à extinção local devido ao isolamento espacial e ao tamanho da população (RICHARDSON, 2019). Por suas águas tenderem a ter temperaturas mais frias e menos variáveis do que as de corpos d'água a jusante, riachos e regiões de cabeceira também fornecem refúgio térmico para algumas espécies (RICHARDSON, 2019; MEYER et al., 2007; CASTRO, 1999). A presença de vegetação ripária exerce grande influência nesses ambientes, pois sombreia o seu leito bloqueando total ou parcialmente a incidência direta de luz solar influenciando a disponibilidade de recursos para a biota ao reduzir a produção primária autotrófica, e também fornece grande quantidade de serapilheira, folhas e invertebrados que adentram em suas águas e contribuem para o suprimento alimentar da comunidade local altamente

dependente da importação de material alóctone para sua subsistência (CASTRO, 1999; ALLAN & CASTILLO, 2007; TOWNSEND; BEGON; HARPER, 2010). Adicionalmente, as raízes estabilizam os bancos e impedem sua queda, os galhos e troncos ao caírem nas águas criam diversidade de habitat e a sombra do dossel impede o aquecimento excessivo das águas (ALLAN & CASTILLO, 2007).

Como exposto acima, os ecossistemas fluviais são grandemente influenciados pela paisagem do entorno, sendo, deste modo, bastante vulneráveis às ações humanas na escala da paisagem, as quais podem interromper os processos que mantêm a paisagem ribeirinha e sua biota associada, podendo resultar em habitats degradados, homogêneos e em reduzida diversidade de espécies (ALLAN, 2004). Por exemplo, o uso agrícola de terra, principalmente nas formas de cultivo intensivo, impacta os ambientes lóticos por causar o declínio na qualidade de água, de habitats e das assembleias biológicas. Os riachos são degradados, pois, a vegetação nativa é removida para dar lugar às plantações e pastagens e, conseqüentemente, o aporte de poluentes (sedimentos, nutrientes e pesticidas) é aumentado, o que afeta os habitats ripários e de canais alterando seu fluxo (ALLAN, 2004). Da mesma forma, o represamento destes ambientes altera o regime de fluxo inundação/seca (ALLAN & CASTILLO, 2007), fragmenta os habitats ribeirinhos, o que restringe a alimentação, o abrigo, a dispersão e a migração de peixes e aumenta a endogamia (DUDGEON et al., 2006; SHAW et al., 2016). Além disso, a formação de lagos e represas também altera a estrutura do habitat, a diversidade e a composição das comunidades de peixes (ESTEVES, 2011) e facilita o estabelecimento de espécies não nativas (VITULE; SKÓRA; ABILHOA, 2012).

## **1.2 Diversidade de peixes em ecossistemas de água doce**

Apesar de englobarem cerca de 0,01% de toda a água do mundo e cobrirem aproximadamente 0,8% da superfície terrestre, os ecossistemas de água doce, incluindo rios, riachos e lagoas abrigam mais de 12.000 espécies de peixes, o que representa mais de 40% de todas as espécies de peixes conhecidas e um quarto da diversidade global de vertebrados (DUDGEON et al., 2006; TOWNSEND; BEGON; HARPER, 2010; ESTEVES, 2011; RICHARDSON, 2019). O isolamento geográfico,

juntamente com a intensidade das pressões seletivas, contribuíram efetiva e diferencialmente para a diversificação da fauna de peixes de água doce (ESTEVES, 2011).

A América do Sul possui grande riqueza e diversidade de espécies de peixes de água doce, abrigando mais de 5.000 espécies, o que representa mais de um terço de todas as espécies de águas continentais do mundo (REIS et al., 2016). Espécies de peixes de pequeno porte (15 cm ou menos de comprimento), que habitam riachos, representam, no mínimo, 50% de toda a ictiofauna sul-americana e apresentam um alto grau de endemismo, devido, em parte, à sua baixa capacidade relativa de deslocamento, pois, em sua maioria, são sedentárias ou realizam migrações curtas, o que facilita a ocorrência de eventos vicariantes, levando à multiplicação por especiação alopátrica dessas espécies de peixes (CASTRO, 1999).

A distribuição da ictiofauna no eixo longitudinal de um sistema lótico segue um padrão geral relacionado aos seus requerimentos ecológicos e à vazão de água (ESTEVES, 2011). As espécies predominantes em cabeceiras, pertencentes as ordens Characiformes e Siluriformes, possuem diversas adaptações aos ambientes de cabeceiras e riachos, como corpo achatado lateralmente e grande habilidade natatória para se manter na coluna d'água (diversas espécies de Characiformes) e corpo alongado e comprimido dorso-ventralmente, nadadeiras pares alongadas horizontalmente dotadas de raios modificados em espinhos e boca ventral que funciona como ventosa para resistir à velocidade da correnteza (algumas espécies de Siluriformes, como os cascudos) (ESTEVES, 2011). Já as espécies de peixes que habitam rios de médio e grande porte são submetidas a uma dinâmica regida pelas variações sazonais no nível fluviométrico. As cheias anuais permitem a realização de migrações longitudinais reprodutivas e o trânsito lateral de organismos entre a calha dos rios e ambientes que permanecem isolados durante o período de águas baixas (ESTEVES, 2011). A ictiofauna de água doce sul-americana apresenta grande plasticidade alimentar, consumindo praticamente de tudo o que estiver disponível no ambiente aquático e fora dele. No entanto, quando se trata de estratégias reprodutivas, a maioria das espécies apresenta um caráter conservativo (ESTEVES, 2011).

A enorme riqueza de espécies animais e vegetais que as águas continentais suportam, faz com que esses ambientes sejam especialmente vulneráveis às



atividades humanas e mudanças ambientais (DUDGEON et al., 2006). Dentre as principais alterações antrópicas que ameaçam o ecossistema de rios e riachos, estão a modificação dos regimes hidrológicos naturais, a destruição ou degradação do habitat, a invasão por espécies exóticas e a poluição das águas (DUDGEON et al., 2006). Essas alterações também impactam a biodiversidade no seu nível genético, afetando a adaptação das espécies e a especiação dos táxons (HUGHES; DAILY; EHRlich, 1997; TEMPLETON, 2001).

### **1.3 Diversidade e estrutura genética**

#### **1.3.1 Diversidade genética**

A variação no nível genético constitui a base para todos os outros níveis de biodiversidade e para a evolução da vida na Terra (LAIKRE; PALM; RYMAN, 2005). A diversidade genética, em si, é a variedade de alelos e genótipos presentes nas populações, espécies ou grupos de espécies (FRANKHAM; BALLOU; BRISCOE, 2010). Adicionalmente, é denominada diversidade genética qualquer medida que quantifique a magnitude da variabilidade genética dentro de uma população (HUGHES et al., 2008). A União Internacional para a Conservação da Natureza (UICN) reconhece a necessidade de conservação da diversidade genética, pois ela é necessária para que as populações evoluam e se adaptem às mudanças ambientais e também contribui para a diversidade e resistência dos ecossistemas a choques ambientais (FRANKHAM; BALLOU; BRISCOE, 2010; REED & FRANKHAM, 2003). A perda de diversidade genética, geralmente, está associada à endogamia e à redução na sobrevivência e reprodução das espécies (FRANKHAM; BALLOU; BRISCOE, 2010).

Populações grandes de espécies exogâmicas geralmente têm ampla diversidade genética, mas, esta é tipicamente reduzida nas populações pequenas, ameaçadas de extinção ou que sofreram gargalo (FRANKHAM; BALLOU; BRISCOE, 2010). Os níveis de diversidade genética dentro das populações são diretamente influenciados por processos evolutivos, tais como mutação, migração, deriva genética

e seleção natural (HUGHES et al., 2008). A diversidade genética dentro das populações é alimentada por mutação ou migrações, sendo removida principalmente por seleção natural ou deriva genética (FRANKHAM; BALLOU; BRISCOE, 2010).

O ambiente biótico e abiótico de todas as espécies estão continuamente mudando e, para sobreviver a longo prazo, as populações das espécies devem se ajustar a essas mudanças, se adaptando. Essas adaptações podem representar modificações fisiológicas, comportamentais, ou adaptações genéticas, moldadas pela seleção natural (FRANKHAM; BALLOU; BRISCOE, 2010). As mudanças evolutivas por meio da seleção natural são referidas como evolução adaptativa e, para que a evolução adaptativa ocorra, é necessário populações geneticamente variáveis (FRANKHAM; BALLOU; BRISCOE, 2010). Populações pequenas e/ou isoladas geralmente possuem baixa diversidade genética e, além disso, sofrem endogamia acelerada, resultando em vigor reprodutivo reduzido (depressão endogâmica) e menor habilidade para evoluírem em resposta às mudanças ambientais (FRANKHAM; BALLOU; BRISCOE, 2010).

A deriva genética também tem consequências significativas em pequenas populações. Nessas populações a diversidade genética também é perdida como consequência da amostragem ao acaso durante a transmissão dos alelos entre as gerações. Principalmente os alelos raros podem não ser transmitidos de uma geração para a próxima pelo acaso. As principais consequências dessa amostragem de gametas ao acaso incluem a perda de diversidade genética e fixação de alelos dentro das populações com consequente redução no potencial evolutivo e a diversificação entre populações replicadas da mesma fonte original, como por exemplo, em populações fragmentadas (FRANKHAM; BALLOU; BRISCOE, 2010).

Populações pequenas também são mais sujeitas à endogamia, pois nessas populações, o acasalamento entre indivíduos aparentados é inevitável. A endogamia leva a reduções na heterozigosidade, à redução do vigor reprodutivo, e ao aumento do risco de extinção. Como consequência primária da endogamia temos uma maior probabilidade de herança de alelos idênticos por descendência em uma população (FRANKHAM; BALLOU; BRISCOE, 2010). A endogamia também é refletida na redução da frequência de heterozigotos e aumento na frequência de homozigotos em relação às expectativas do Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW). Como consequência, os homozigotos para os alelos recessivos deletérios se tornam mais

frequentes, causa primária da depressão endogâmica, o que reduz o valor adaptativo e a viabilidade dos indivíduos (FRANKHAM; BALLOU; BRISCOE, 2010). Em grandes populações a endogamia também pode ocorrer, mas isso demanda tempo. Logo, a endogamia acumula-se com as gerações a uma taxa que depende do tamanho das populações (FRANKHAM; BALLOU; BRISCOE, 2010).

A fragmentação de populações, frequentemente como resultado das ações humanas, tem impactos sobre a diversidade genética, diferenciação, endogamia e risco de extinção, e dependem do nível de fluxo gênico entre os fragmentos. Os efeitos da perda da diversidade genética e da depressão endogâmica são mais severos em populações fragmentadas com fluxo gênico diminuído do que em uma população não fragmentada de mesmo tamanho total, pois, a longo prazo, os fragmentos de populações menores terão maiores taxas de extinção devido a fatores genéticos, estocasticidade ambiental, demográfica e catástrofes (FRANKHAM; BALLOU; BRISCOE, 2010). O fluxo gênico reduz os efeitos genéticos da fragmentação populacional. Em populações ideais (em EHW), independentemente de seu tamanho, um único migrante por geração é suficiente para prevenir a diferenciação completa e a fixação de alelos. No entanto, em populações reais, cerca de dez migrantes por geração podem ser necessários (FRANKHAM; BALLOU; BRISCOE, 2010). As consequências genéticas da fragmentação populacional tendem a ser piores para metapopulações, pois elas passam por frequentes gargalos populacionais associados a extinções regulares e eventos de recolonização (FRANKHAM; BALLOU; BRISCOE, 2010).

A diversidade genética também possui efeitos significativos nos níveis de comunidades e ecossistemas. No nível de comunidades, maior diversidade genética pode auxiliar na coexistência de espécies competidoras ou inibir a colonização de um ambiente por novas espécies. Já no nível ecossistêmico, a diversidade genética tem efeitos na decomposição e nos fluxos de energia e nutrientes, pois contribui, por exemplo, para complementaridade de nicho na comunidade de decompositores (HUGHES et al., 2008).

### **1.3.2 Estrutura genética populacional**

As espécies, frequentemente, são geneticamente heterogêneas. Elas são estruturadas em grupos de indivíduos que são mais ou menos isolados uns dos outros. Isso resulta em um padrão de distribuição da variação genética dentro e entre populações que é referido como estrutura genética (LAIKRE; PALM; RYMAN, 2005). A diferenciação de uma população é induzida por processos evolutivos, como mutação, seleção natural, deriva genética, fluxo gênico e também pelo tempo em que ocorrem esses processos (HILSDORF & HALLERMAN, 2017).

A estrutura genética populacional de uma espécie pode assumir três formas básicas separadas ou combinadas, sendo elas: populações distintas; com mudança genética contínua; e/ou sem diferenciação. As unidades básicas dentro de cada um desses tipos são populações com um alto nível de conectividade entre indivíduos caracterizados por acasalamento aleatório (panmixia), o que representa a população local (LAIKRE; PALM; RYMAN, 2005). A distância geográfica de migração e a quantidade de fluxo gênico entre as populações locais moldam a estrutura genética de uma região (LAIKRE; PALM; RYMAN, 2005).

Em populações distintas, a migração entre populações locais é pequena e permite a divergência genética. A manutenção da diversidade genética entre as populações depende da preservação dos níveis naturais de fluxo gênico, sendo que alterações nos níveis naturais de troca genética entre populações distintas podem resultar em efeitos genéticos negativos. A redução do fluxo gênico natural pode resultar na perda de diversidade genética e endogamia nas populações, enquanto que o seu aumento pode resultar na perda de diferenciação genética e de adaptações locais (LAIKRE; PALM; RYMAN, 2005).

Em populações com mudança genética contínua no espaço, o fluxo gênico entre populações próximas é maior do que no caso de populações distintas, resultando em alterações genéticas sucessivas ao longo do espaço. Existe mudança genética contínua sobre a área de distribuição como um todo, mas há homogeneidade genética relativa em áreas de tamanho restrito (LAIKRE; PALM; RYMAN, 2005).

Em algumas populações sem diferenciação, a homogeneidade genética prevalece sobre grandes áreas geográficas. O fluxo gênico entre as unidades básicas é extenso e toda a população se comporta semelhantemente a uma única população

panmítica, não havendo isolamento reprodutivo que possa resultar em divergência genética (LAIKRE; PALM; RYMAN, 2005).

A diferenciação genética dentro e entre populações é essencial, pois, não somente aumenta a aptidão dentro de um habitat particular, mas também promove a colonização e permite a persistência através de uma gama ampla de ambientes (CARVALHO, 1993). O sucesso reprodutivo ou a sobrevivência de indivíduos em um determinado ambiente está correlacionado a complexos de genes coadaptados que podem ser específicos dessa população e, que através das gerações, podem representar uma resposta da população às condições ambientais locais. Como a aptidão de um indivíduo em um ambiente pode não prever a aptidão em um outro ambiente, as flutuações nas frequências de genótipos que diferem em aptidão faz com que a população tenha plasticidade suficiente para conseguir se adaptar a mudanças ambientais e persistir em novos ambientes (CARVALHO, 1993).

### **1.3.3 Diversidade dentro e entre populações de peixes**

As espécies de peixes frequentemente se subdividem em populações locais, as quais são isoladas em variados graus. Se elas habitam ambientes similares ou estão conectadas através de fluxo gênico, podem exibir traços fenotípicos ou genéticos homogêneos, ao contrário, pode surgir uma estruturação populacional. Outros fatores, como os níveis de variabilidade genética em traços ecologicamente importantes, número de fundadores e tamanho populacional, também podem influenciar o grau de heterogeneidade espacial das populações (CARVALHO, 1993).

Vários fatores, incluindo sistemas de acasalamento, fluxo gênico e deriva genética, podem influenciar os padrões espaciais de distribuição da diversidade genética dentro das espécies (CARVALHO, 1993). A diversidade genética intrapopulacional pode diferir entre populações mesmo em escala local, principalmente quando os indivíduos de mesma espécie ocupam habitats com características contrastantes, tais como aqueles existentes ao longo do curso de um rio. As águas de trechos de cabeceiras, por exemplo, são rasas, claras e de fluxo rápido, enquanto que as águas de trechos baixos são comumente profundas, turvas

e de fluxo lento (CARVALHO, 1993). Além das características do habitat, esses padrões parecem ser determinados pelo isolamento geográfico, refletindo em uma distribuição correspondentemente fragmentada da diversidade genética (CARVALHO, 1993).

O isolamento e a existência de poucos caminhos migratórios entre águas doces implicam na extensão da divergência genética em peixes de água doce, podendo levar a um alto grau de divergência em escala local, produzindo um *pool* genético fragmentado, aumentando as oportunidades para a diferenciação adaptativa da população. Essa divergência pode ser aumentada pela mobilidade limitada e alta fidelidade para locais específicos, assim como o fluxo gênico restrito, implica em baixa imigração natural (CARVALHO, 1993). Também é destacável que, assim como os processos históricos e específicos das espécies, os fatores antropogênicos também podem afetar a estrutura populacional das espécies, dividindo, por exemplo, a variação genética a partir da inserção de barreiras ou eliminando a estruturação a partir de conectividades impostas pelo homem (HUSEMANN et al., 2012).

A estrutura genética populacional de uma espécie de peixe, também pode assumir as três formas básicas, separadas ou combinadas, de populações distintas, com mudança genética contínua e/ou sem diferenciação. As unidades básicas dentro de cada um desses tipos são as populações locais, onde local refere-se à localização geográfica do local de desova. Assim, para populações distintas pode ser percebida algum tipo de limite espacial entre elas durante a época de desova; para populações com mudança genética contínua podem existir ou não um limite entre os locais de desova e; no caso das populações sem diferenciação, os indivíduos usam uma única área de desova para a reprodução (LAIKRE; PALM; RYMAN, 2005).

#### **1.3.4 Avaliando a diversidade e estrutura genética**

A forma mais comum de avaliar a diversidade e estrutura genética em populações naturais é utilizando os marcadores moleculares (HUGHES et al., 2008). Dentre eles, o DNA mitocondrial é um dos mais amplamente estudados (MCCUSKER & BENTZEN, 2010). O DNA mitocondrial é uma molécula circular haploide com cerca

de 15.000 a 20.000 pares de bases que é maternalmente herdada na maioria das espécies e transmitida sem recombinação (AVISE & SAUNDERS, 1984; TABERLET, 1996; FRANKHAM; BALLOU; BRISCOE, 2010; MCCUSKER & BENTZEN, 2010). O arranjo gênico é altamente conservado no genoma mitocondrial (AVISE & ELLIS, 1986). Em animais, os genes mitocondriais codificam 13 proteínas, 22 RNAs transportadores e duas moléculas de RNA ribossomal. Além disso, o DNA mitocondrial também possui uma região não codificante de cerca de 1000 pares de bases, a qual possui a origem de replicação, sendo chamada de região controle ou *D-loop* em vertebrados (AVISE & ELLIS, 1986; BILLINGTON & HEBERT, 1991; TABERLET, 1996).

Mesmo sendo conservador em tamanho, conteúdo gênico e arranjo gênico, as sequências nucleotídicas do DNA mitocondrial evoluem rapidamente, de maneira quase neutra (AVISE & ELLIS, 1986; MCCUSKER & BENTZEN, 2010; HILSDORF & HALLERMAN, 2017). Em decorrência de sua herança materna, o tamanho populacional efetivo do DNA mitocondrial é menor em comparação com marcadores nucleares (HUSEMANN et al., 2012), porém sua taxa de mutação é relativamente alta. Em animais, por exemplo, ele mostra uma taxa evolutiva 5 a 10 vezes maior do que a de genes nucleares de cópia única (BROWN; GEORGE; WILSON, 1979), o que faz com que seja amplamente usado para estudar processos evolutivos recentes, tais como as diferenças entre populações de uma espécie (FRANKHAM; BALLOU; BRISCOE, 2010), visto que o polimorfismo genético entre co-específicos é extenso (AVISE & ELLIS, 1986). No caso da região *D-loop*, de modo particular, existem blocos variáveis que evoluem cerca de 4 a 5 vezes mais rápido do que toda a molécula de DNA mitocondrial (TABERLET, 1996). Deste modo, analisar sequências dentro da região *D-loop* traz a vantagem de aumentar a resolução do DNA mitocondrial para estudos intraespecíficos (TABERLET, 1996), sendo considerado adequado para o estudo de diversidade e estrutura genética em peixes (HUSEMANN et al., 2012). Além das suas características biológicas e evolutivas, a facilidade de uso técnico do DNA mitocondrial (por exemplo, grande quantidade por célula e fácil purificação) torna essa molécula amplamente utilizada (FRANKHAM; BALLOU; BRISCOE, 2010; HILSDORF & HALLERMAN, 2017).

Marcadores seletivamente neutros são utilizados por fornecerem uma imagem que independe de processos históricos que moldam a distribuição da diversidade

genética dentro e entre populações (VRIJENHOEK, 1998). Usando sequências do DNA mitocondrial como marcador molecular, é possível analisar a diversidade genética a partir do índice de diversidade haplotípica ( $Hd$ ), que mede a variabilidade genética dentro das populações, também estimando o número de haplótipos compartilhados entre as populações. Também é utilizada a divergência ou diversidade nucleotídica ( $\pi$ ) para medir a divergência média entre as sequências de DNA em uma população (HILSDORF & HALLERMAN, 2017). Com o desenvolvimento de pacotes computacionais para a análise de sequências de DNA, a quantificação e a interpretação das diferenças interpopulacionais foram melhoradas. A análise de variância molecular (AMOVA) (EXCOFFIER; SMOUSE; QUATTRO, 1992) permite a divisão da variação genética em componentes intra e interpopulacional. Enquanto isto, a divergência interpopulacional dos haplótipos é capturada no índice  $\Phi$ , análogo ao  $F_{ST}$  (HILSDORF & HALLERMAN, 2017).

#### 1.4 A espécie *Bryconamericus aff. iheringii*

*Bryconamericus* Eigenmann, 1907 é um dos gêneros mais numerosos em Characidae (Ordem Characiformes), com 80 espécies válidas atualmente (FISHBASE, 2021), sendo considerado *Incertae Sedis* por ser pouco conhecido taxonomicamente e possivelmente não monofilético (LIMA et al., 2003). O gênero compreende espécies de pequeno porte que ocorrem em diversas bacias hidrográficas das Américas Central e do Sul, da Costa Rica até a Argentina (LIMA et al., 2003).

*Bryconamericus iheringii* (Boulenger, 1887) é uma espécie que ocupa uma ampla área geográfica. Suas populações ocorrem na bacia do rio da Prata e no sistema da Laguna dos Patos, onde habitam rios, riachos e lagoas (CASCIOTTA et al., 2002). Entretanto, existem evidências morfológicas, incluindo a altura do corpo, diâmetro do olho e ganchos ósseos nos ramos anteriores e posteriores da nadadeira anal de machos, indicando que as populações de *Bryconamericus* da bacia do Alto rio Paraná e dos afluentes dos rios Paranapanema e Tietê são diferentes das populações de *B. iheringii* do sistema da Laguna dos Patos e das bacias dos rios Uruguai e Iguaçu (TATSUMI, 2006; LANGEANI et al., 2005). Deste modo, será adotada a nomenclatura



de Da Graça & Pavanelli (2007), *Bryconamericus aff. iheringii* (Figura 1), para as populações da bacia do Alto rio Paraná, objeto de análise deste estudo.

*B. aff. iheringii*, conhecido popularmente como “lambarizinho” ou “piquira”, pode chegar ao comprimento total máximo de 60 mm (DA GRAÇA & PAVANELLI, 2007). Possui hábito alimentar onívoro, adotando a estratégia generalista oportunista, aproveitando todos os itens alimentares disponíveis no ambiente, como sementes e outras partes vegetais, insetos, quironomídeos, detritos, sedimento, algas filamentosas e até mesmo ovos da própria espécie; os dois últimos itens, consumidos apenas em determinados períodos do ano, quando em abundância (ORICOLLI & BENNEMANN, 2006). Por possuir grande flexibilidade trófica, a espécie consegue sobreviver, mesmo que em menor abundância, alimentando-se apenas de detrito, comportando-se assim como especialista detritívora. Ela adota a última estratégia quando presente em ambientes que não são de sua preferência ou da preferência de algumas de suas presas (ORICOLLI & BENNEMANN, 2006). Esses ambientes são possivelmente menos preservados, com pouca ou nenhuma vegetação marginal, como alguns dos ambientes estudados por Kokubun et al. (2018) e Dala-Corte; Becker; Melo (2016), com a espécie *B. iheringii*. Desta forma, *B. aff. iheringii* pode ser considerada uma espécie tolerante à degradação ambiental, como diagnosticado por Caetano; Oliveira; Zawadzki (2016). Por sua semelhança e proximidade a *B. iheringii*, é possível inferir que a espécie se reproduz sazonalmente, durante a primavera e o verão e desova múltiplas vezes ao longo do período reprodutivo (LAMPERT; AZEVEDO; FIALHO, 2004). Os machos possuem ganchos ósseos nas nadadeiras pélvicas e nos ramos anteriores e posteriores da nadadeira anal (TATSUMI, 2006), e é sugerido que esses ganchos não são perdidos após a reprodução, estando presentes após os machos atingirem a maturação gonadal (LAMPERT; AZEVEDO; FIALHO, 2004).

Diante de todas as características apresentadas, por ser comum dentro de sua área de distribuição (SHIBATTA et al., 2002; ORICOLLI & BENNEMANN, 2006; COSTA et al., 2013; CAETANO; OLIVEIRA; ZAWADZKI, 2016) e pelo pequeno número de estudos genéticos populacionais com *Bryconamericus*, a espécie *B. aff. iheringii* foi selecionada para o presente trabalho.

**Figura 1** - Espécime de *Bryconamericus* aff. *iheringii* coletado em um riacho situado na margem esquerda (Brasil) do reservatório da Itaipu.



Fonte: O autor (2021).

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral:

Dentro do contexto apresentado, o presente trabalho objetivou avaliar a diversidade e a estrutura genéticas do caracídeo *Bryconamericus aff. iheringii* na área de influência do reservatório da Itaipu Binacional.

### 2.2 Objetivos específicos:

1. Estimar os índices de diversidade genética e estruturação populacional por meio do sequenciamento parcial da região controladora do DNA mitocondrial, *D-loop*, em amostras de *Bryconamericus aff. iheringii* coletadas em riachos na área de influência do reservatório da Itaipu Binacional;

2. Inferir quais mecanismos podem estar influenciando o padrão encontrado.

### 3 METODOLOGIA

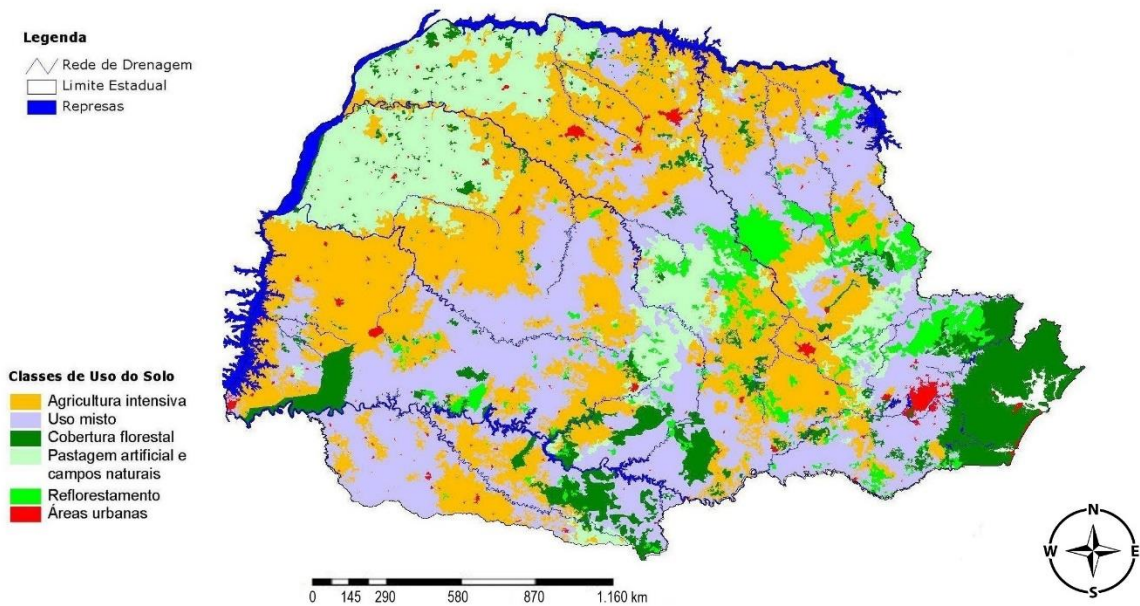
#### 3.1 Caracterização da área de estudo

A área de estudo compreende as margens direita e esquerda do rio Paraná, abrangendo riachos que desaguam no reservatório da Usina Hidrelétrica de Itaipu (Itaipu Binacional). O reservatório da Itaipu, formado em 1982, tem área inundada de 1460 km<sup>2</sup>, dos quais 835 km<sup>2</sup> são brasileiros (margem esquerda) e 625 km<sup>2</sup> paraguaios (margem direita). Sua extensão, em seu eixo longitudinal, entre Foz do Iguaçu-Ciudad del Este e Guaíra-Salto del Guairá é de 151 km (AGOSTINHO; JÚLIO JR.; BORGHETTI, 1992; AGOSTINHO; OKADA; GREGORIS, 1999). Com a formação do reservatório, foram alagadas áreas de alguns municípios do estado do Paraná (Guaíra, Terra Roxa, Marechal Cândido Rondon, Santa Helena, Matelândia, Medianeira, São Miguel do Iguaçu e Foz do Iguaçu), no Brasil, e dos departamentos de Canindeyú (distrito de Salto del Guairá) e Alto Paraná (distrito de Hernandarias), no Paraguai (AGOSTINHO; OKADA; GREGORIS, 1999). O reservatório também submergiu os baixos cursos dos rios locais, corredeiras e cachoeiras, como o Salto de Sete Quedas, barreira geográfica e natural que antes delimitava os segmentos alto e baixo do rio Paraná e separava duas províncias ictiofaunísticas (AGOSTINHO & ZALEWSKI, 1995, 1996; FERREIRA, 2015). Após o represamento, houveram consideráveis alterações na composição da ictiofauna da região. Por exemplo, foi constatado um aumento na abundância de espécies sedentárias de pequeno porte e baixo valor comercial e uma redução dos estoques dos grandes migradores, de alto valor comercial (AGOSTINHO & ZALEWSKI, 1996; AGOSTINHO; OKADA; GREGORIS, 1999). Adicionalmente, principalmente no lado paraguaio, que detinha grande porcentagem de sua vegetação natural, o reservatório cobriu grandes áreas florestadas, com os remanescentes hoje transformados em áreas de preservação permanente (AGOSTINHO; OKADA; GREGORIS, 1999).

Em função de estarem localizados na mesma latitude, os lados brasileiro e paraguaio apresentam as mesmas condições climáticas (BALLER, 2014). A precipitação fica na faixa de 1.000 a 2.200 milímetros por ano e não é distribuída uniformemente, podendo ocorrer períodos secos, normalmente no inverno. A

temperatura média anual varia de 16 a 22°C com alta amplitude anual. A vegetação natural da região é caracterizada pela floresta estacional semidecidual (Mata Atlântica) (DI BITETTI; PLACCI; DIETZ, 2003). Esta vegetação se encontra atualmente muito degradada, restando no estado do Paraná apenas 3,4% de sua cobertura inicial, devido, principalmente, à produção agrícola (INSTITUTO DAS ÁGUAS DO PARANÁ, 2014) (Figura 2). O Paraná, em especial a sua região Oeste, é destaque na produção intensiva de culturas anuais como soja, milho e trigo (SERRA, 2009; PEREIRA & SCROCCARO, 2010). A produção de *commodities*, principalmente de soja, ocorre também na região Oriental do Paraguai, fronteira com o Brasil e Argentina (SOUCHAUD, 2005).

**Figura 2** - Uso e ocupação do solo no Estado do Paraná, Brasil.



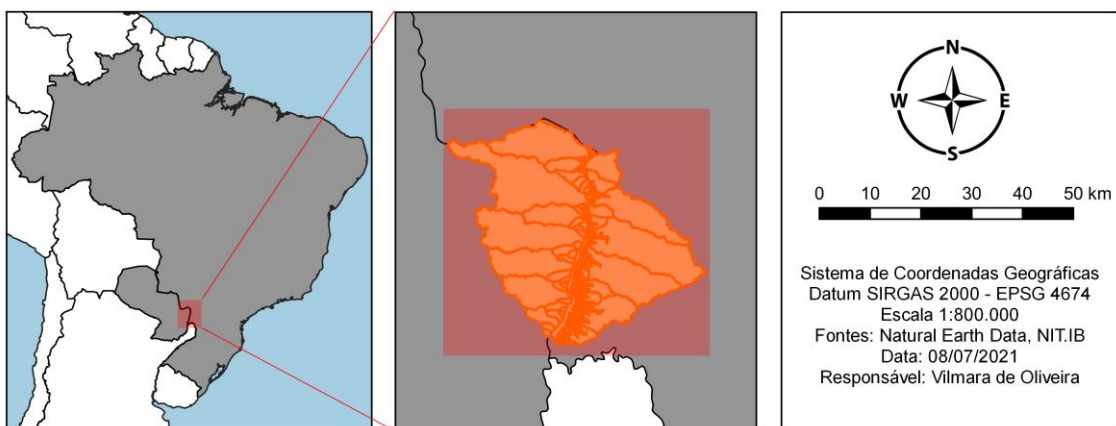
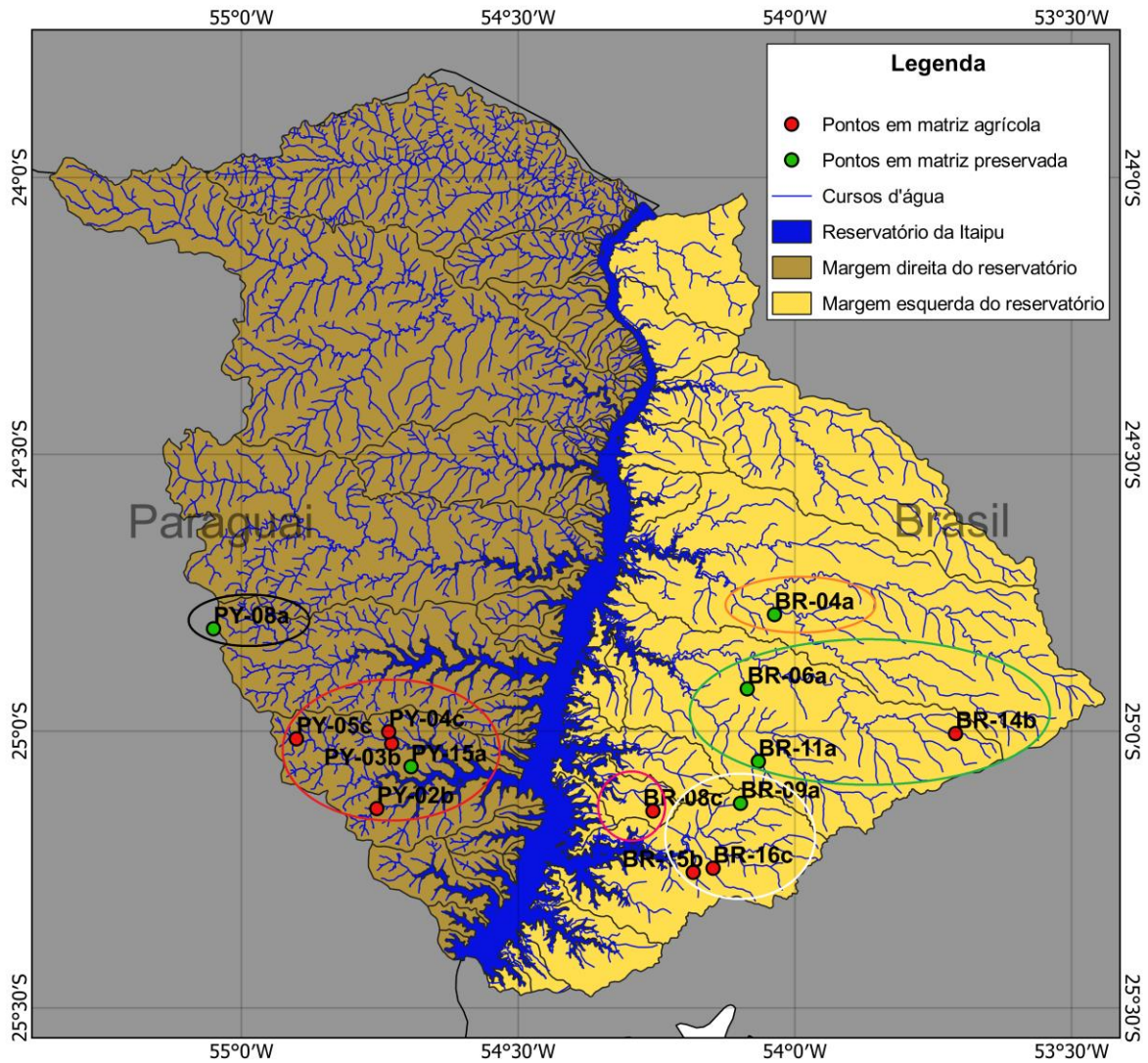
Fonte: Secretaria Estadual de Educação do Estado do Paraná (2007). Modificado por: O autor (2021).

### 3.2 Obtenção das amostras

No presente estudo foram utilizados espécimes de *Bryconamericus aff. iheringii* disponíveis na coleção de ictiologia da Universidade Federal da Integração Latino-Americana (UNILA), obtidos durante a execução do projeto denominado

“Estudo da Dinâmica de Micropoluentes em Diferentes Matrizes Ambientais na Região Transfronteiriça (Brasil-Paraguai)”. A partir desse projeto foram definidos os pontos de coleta em matriz preservada (pontos classificados como “a”) e em matriz agrícola (pontos classificados como “b” e “c”). As coletas, do lado brasileiro, foram realizadas com o uso de licença permanente para obtenção de material zoológico obtida junto ao Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (SISBIO) do Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio), em nome do coordenador do projeto, sob número 39135-1. Do lado paraguaio as coletas foram realizadas com o apoio da equipe de ictiólogos da Itaipu Paraguai, os quais possuem licença de coleta fornecida pelo órgão regulador paraguaio. Foram analisados 47 indivíduos coletados em 14 riachos pertencentes a região de influência do reservatório da Itaipu, dos pontos de amostragem PY-02b (Arroyo López-Cue), PY-03b (Arroyo Itabó-Mi), PY-04c (Afluente do Arroyo Itabó), PY-05c (Arroyo Itabó-Guazú), PY-08a (Arroyo Barrero Pochy) e PY-15a (Afluente do Arroyo Itabó), na margem direita (lado paraguaio) do reservatório e BR-04a (Córrego Três Ranchos), BR-06a (Córrego Esperança), BR-08c (Rio São João), BR-09a (Rio Branco), BR-11a (Córrego Cristalino), BR-14b (Rio São Francisco Falso), BR-15b (Rio Laranjita) e BR-16c (Rio Alegria), na margem esquerda (lado brasileiro) do reservatório. Os pontos de amostragem estão distribuídos em seis microbacias diferentes, estando o ponto PY-08a na “Microbacia 1”, os pontos PY-02b, PY-03b, PY-04c, PY-05c e PY-15a na “Microbacia 2”, o ponto BR-04a na “Microbacia 3”, os pontos BR-06a, BR-11a e BR-14b na “Microbacia 4”, o ponto BR-08c na “Microbacia 5” e os pontos BR-09a, BR-15b e BR-16c na “Microbacia 6” (Figura 3). O número de indivíduos analisados para cada ponto de amostragem pode ser conferido na Tabela 1. Para a correta identificação da espécie foram utilizadas chaves-de-identificação recentes (e.g. DA GRAÇA & PAVANELLI, 2007; OTA et al., 2018). As amostras de tecido muscular ou nadadeira caudal de todos os peixes coletados durante a execução do projeto, estão disponíveis no banco de tecidos da coleção de ictiologia da UNILA.

**Figura 3** - Pontos de amostragem e suas localizações na margem direita (Paraguai) e esquerda (Brasil) do reservatório da Itaipu. Os pontos em uma mesma microbacia estão circulado por uma cor: Microbacia 1 (PY-08a) em preto; Microbacia 2 (PY-02b, PY-03b, PY-04c, PY-05c e PY-15a) em vermelho; Microbacia 3 (BR-04a) em laranja; Microbacia 4 (BR-06a, BR-11a e BR-14b) em verde; Microbacia 5 (BR-08c) em rosa e Microbacia 6 (BR-09a, BR-15b e BR-16c) em branco.



**Tabela 1** - Número de indivíduos analisados para cada ponto de amostragem na margem direita (Paraguai) e esquerda (Brasil) do reservatório da Itaipu.

Pontos de amostragem (Paraguai)	Número de indivíduos analisados	Pontos de amostragem (Brasil)	Número de indivíduos analisados
PY-02b	4	BR-04a	3
PY-03b	6	BR-06a	3
PY-04c	3	BR-08c	3
PY-05c	1	BR-09a	3
PY-08a	3	BR-11a	3
PY-15a	6	BR-14b	3
		BR-15b	3
		BR-16c	3

Fonte: O autor (2021).

### 3.3 Obtenção das sequências D-loop

A análise da diversidade e estrutura genética das populações de *Bryconamericus aff. iheringii* foi conduzida a partir de sequências parciais da região D-loop do DNA mitocondrial, obtidas usando o conjunto de *primers* H16498 5'-CCTGAAGTAGGAACCAGATG-3' (MEYER et al., 1990) e L15774M 5'-caacatgaattggaggtataccagt-3' (PRIOLI et al., 2002). O DNA total foi extraído de amostras de tecido muscular ou nadadeira caudal, utilizando o kit de extração comercial PureLink® (ThermoFisher Scientific), verificado em gel de agarose a 1,2%, corado com o corante intercalante UniSafe Dye (20.000x) (Uniscience) e armazenado a 4°C. Amplificações via Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) foram conduzidas em um volume final de 12,5 µl, contendo 8,15 µl de água, 1,25 µl de tampão 10X, 0,5 µl de cada primer (F e R), 0,5 µl de dNTP, 0,5 µl de MgCl<sub>2</sub>, 0,1 µl de Taq Platinum e 1,0 µl de DNA molde de acordo com as condições descritas por Prioli et al. (2002). Os fragmentos de DNA amplificados foram verificados no gel de agarose 1%, corados com o corante intercalante UniSafe Dye (20.000x) (Uniscience). Os produtos da PCR foram utilizados na reação de sequenciamento utilizando o kit "Big Dye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Ready Reaction" (Applied Biosystems). Após a amplificação, o produto da reação foi purificado por precipitação em EDTA/Acetato de sódio/Etanol



e analisado em um sequenciador de DNA automático, modelo ABI 3500-Genetic Analyzer (Applied Biosystems), o qual está disponível na UNILA.

### **3.4 Análise das sequências D-loop**

As sequências de DNA obtidas foram editadas com o *software* Geneious v.11.0.5 (KEARSE et al., 2012), o qual forneceu as sequências consenso (*contigs*). O alinhamento das sequências foi realizado usando o algoritmo MUSCLE - *Multiple Sequence Comparison by Log- Expectation* (EDGAR, 2004), disponível *online* (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/muscle/>). As sequências alinhadas tiveram suas pontas cortadas por meio do *software* MEGA6 - *Molecular Evolutionary Genetics Analysis* v.6.0 (TAMURA et al., 2013).

### **3.5 Análise de dados**

#### **3.5.1 Diversidade genética**

Para identificar e quantificar o número e a frequência de haplótipos e os índices de diversidade haplotípica ( $Hd$ ) e nucleotídica ( $\pi$ ), foi utilizado o *software* DnaSP v.5 (LIBRADO & ROZAS, 2009). Para a construção da rede de haplótipos, foi utilizado o *software* Network v.10.2.0.0. (Fluxus Technology Ltd - <http://www.fluxus-engineering.com>), com base no algoritmo *median-joining* (BANDELT; FORSTER; RÖHL, 1999).

#### **3.5.2 Estrutura genética populacional**

Para estimar a partição da variação genética dentro das amostras, entre as amostras e entre grupos de amostras, foi realizada a Análise de Variância Molecular

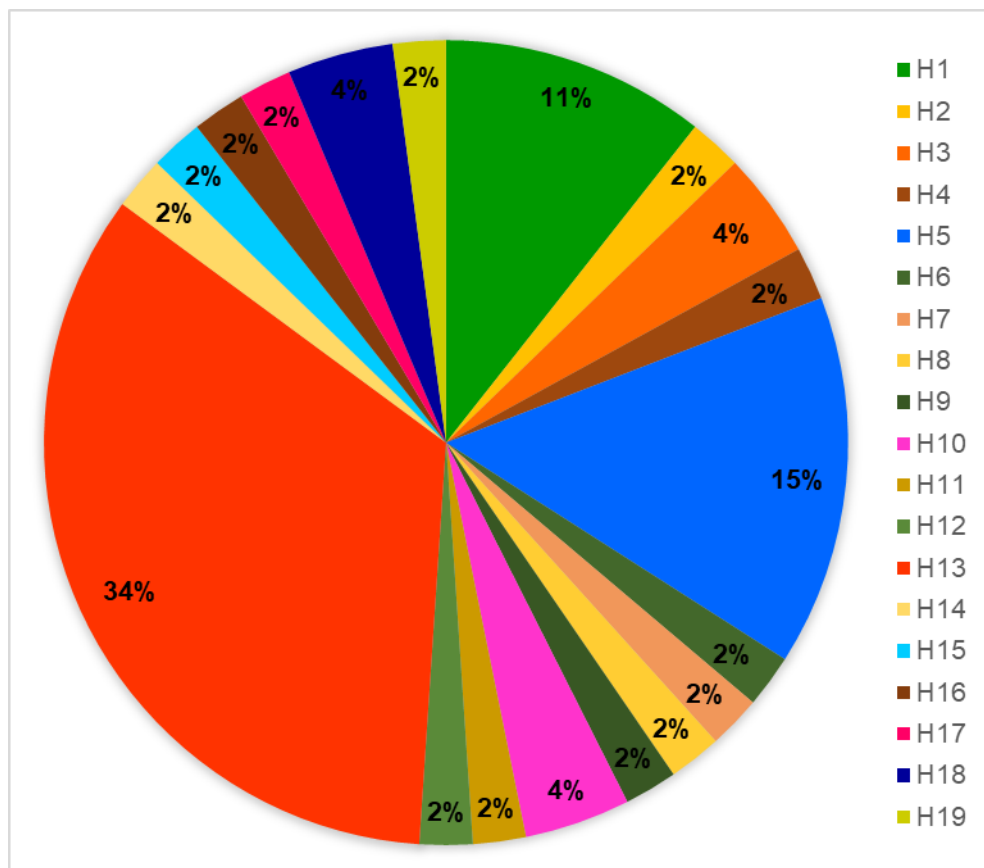
(AMOVA), utilizando o *software* Arlequin v.3.5.1.3 (EXCOFFIER & LISCHER, 2010). Nesta abordagem, três hipóteses de agrupamentos foram testadas: a primeira, considerando cada ponto de coleta como uma população e Paraguai e Brasil como grupos distintos; a segunda, considerando quatro sub-agrupamentos (áreas preservadas Paraguai, áreas agrícolas Paraguai, áreas preservadas Brasil e áreas agrícolas Brasil) alocados dentro dos grupos Paraguai (áreas preservadas/agrícolas) e Brasil (áreas preservadas/agrícolas); e a terceira, considerando cada microbacia como uma população e Paraguai e Brasil como grupos distintos. O *software* Arlequin v.3.5.1.3 (EXCOFFIER & LISCHER, 2010) também foi utilizado para obter os índices de diferenciação  $\Phi_{ST}$ . Por fim, o *software* BAPS – *Bayesian Analysis of Population Structure* v. 6.0 (CORANDER et al., 2013), foi utilizado para verificar a estruturação populacional da variação genética por inferência bayesiana, utilizando a opção *Genetic mixture analysis with sequences or linked loci* (CORANDER & TANG, 2007), que permite a análise de sequências de DNA.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Diversidade genética

Como resultado do sequenciamento parcial da região *D-loop* do DNA mitocondrial, foram obtidos fragmentos com 690 pares de bases. A análise dos 47 espécimes revelou 50 sítios polimórficos e 19 haplótipos diferentes (Figura 4).

**Figura 4** - Haplótipos (H1 – H19) obtidos e suas frequências (%) correspondentes.

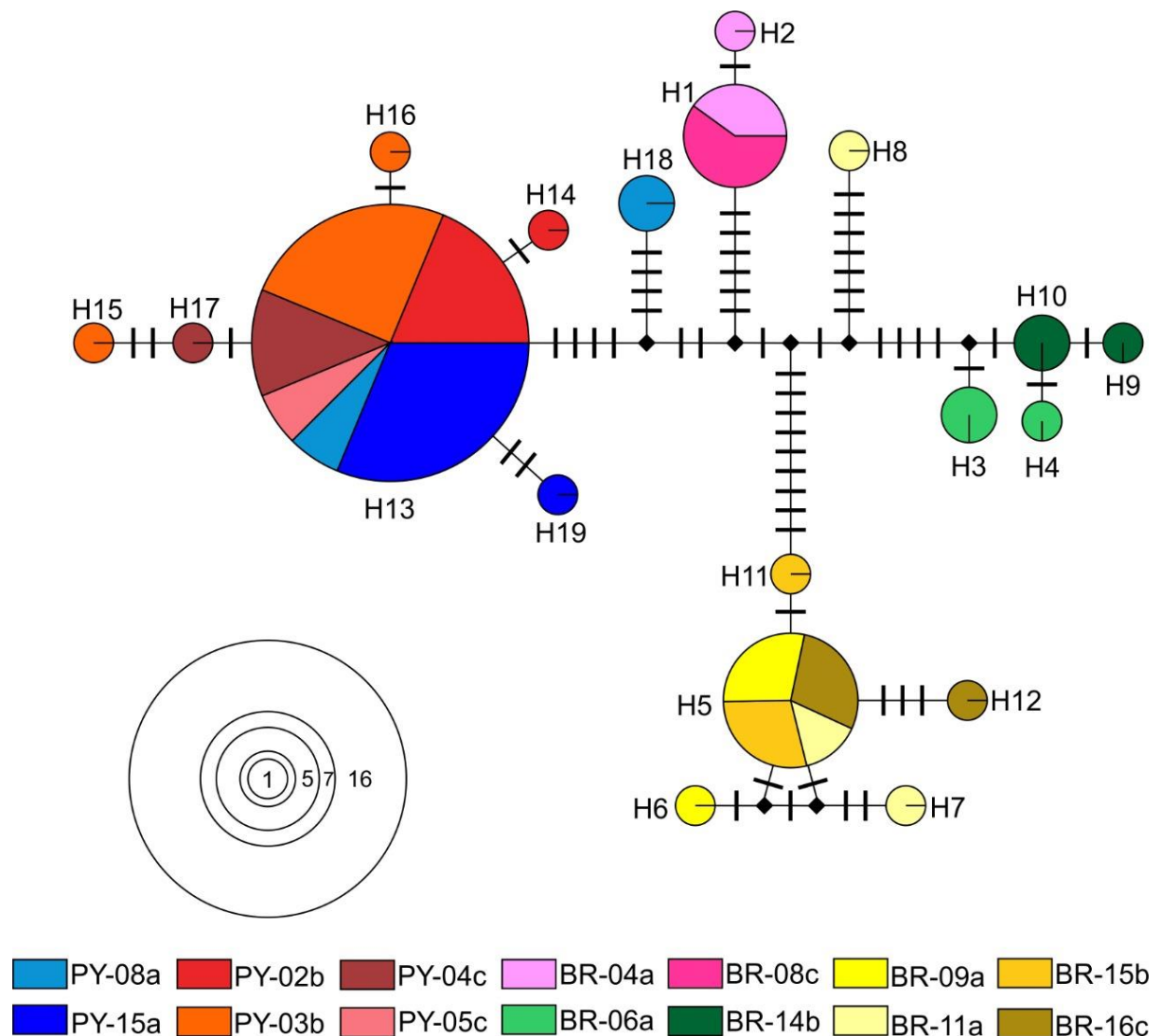


Fonte: O autor (2021).

O haplótipo H13 foi o mais frequente, estando presente em 16 indivíduos (34%), seguido pelo haplótipo H5, presente em 7 indivíduos (15%) e pelo haplótipo H1, presente em 5 indivíduos (11%). Estes três haplótipos estão presentes em 60% dos indivíduos coletados. Treze haplótipos (H2, H4, H6, H7, H8, H9, H11, H12, H14,

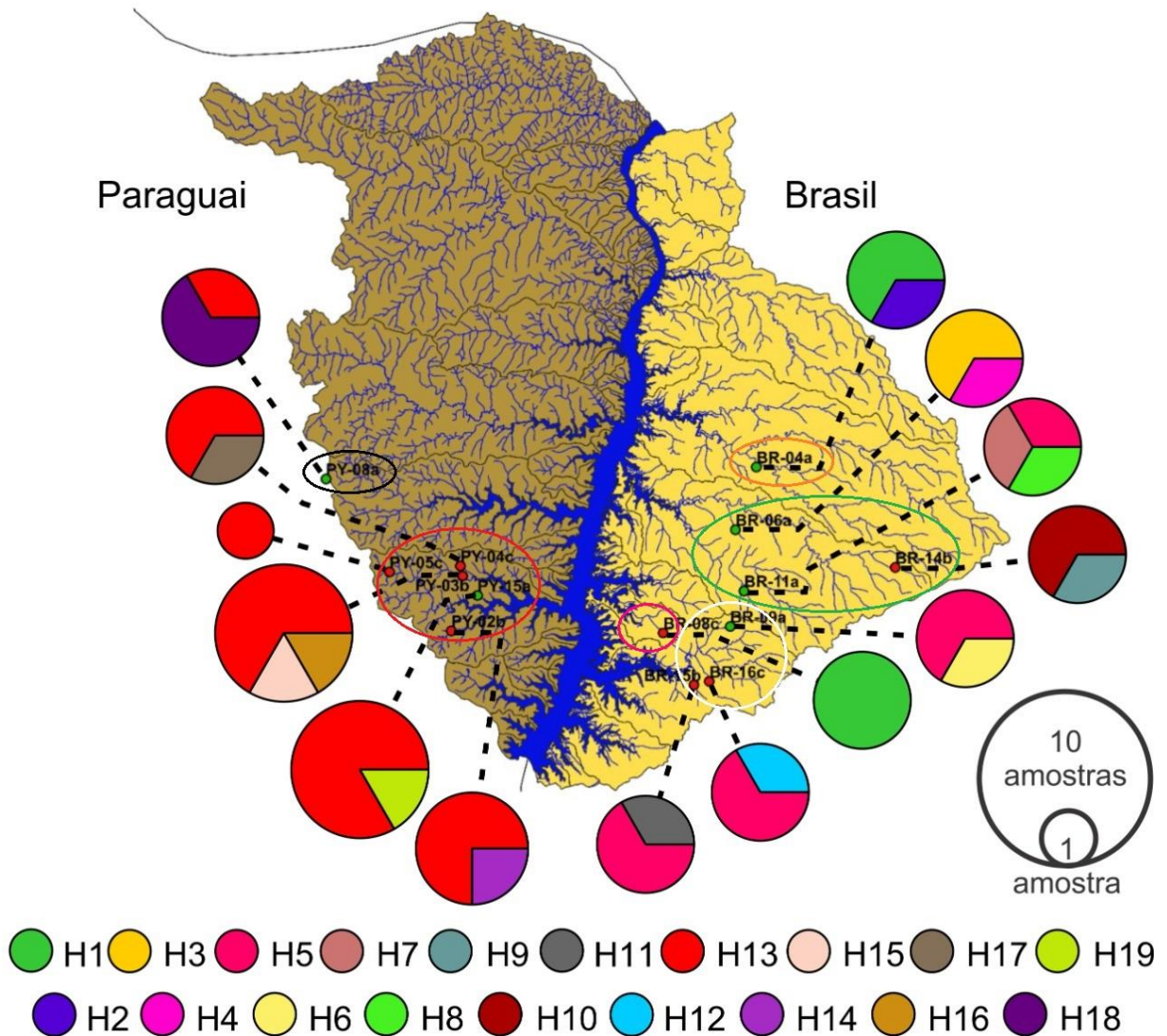
H15, H16, H17 e H19) foram *singletons*, ou seja, cada um ocorrendo em apenas um indivíduo. Os haplótipos presentes nos 23 espécimes coletados em riachos do Paraguai (H13 – H19) diferem dos haplótipos presentes nos 24 espécimes coletados em riachos do Brasil (H1 – H12) (Figuras 5 e 6).

**Figura 5** - Rede de haplótipos obtida a partir do sequenciamento parcial da região D-loop do DNA mitocondrial em 47 amostras de *Bryconamericus aff. iheringii* de riachos das margens direita (Paraguai - PY) e esquerda (Brasil - BR) do reservatório da Itaipu. Os tamanhos dos círculos são proporcionais às frequências dos haplótipos. As barras pretas indicam passos mutacionais entre sequências. Os losangos pretos são prováveis haplótipos não amostrados sugeridos pelo software. Cada ponto de amostragem está representado por uma cor.



Fonte: O autor (2021).

**Figura 6** - Haplótipos presentes em cada ponto de amostragem da margem direita (Paraguai) e esquerda (Brasil) do reservatório da Itaipu. Os tamanhos dos círculos são proporcionais às frequências dos haplótipos. As linhas pontilhadas indicam de qual ponto são provenientes os haplótipos. Os pontos em uma mesma microbacia estão circulado por uma cor: Microbacia 1 (PY-08a) em preto; Microbacia 2 (PY-02b, PY-03b, PY-04c, PY-05c e PY-15a) em vermelho; Microbacia 3 (BR-04a) em laranja; Microbacia 4 (BR-06a, BR-11a e BR-14b) em verde; Microbacia 5 (BR-08c) em rosa e Microbacia 6 (BR-09a, BR-15b e BR-16c) em branco.



Fonte: O autor (2021).

É possível notar que os haplótipos para os pontos de coleta paraguaios, possuem uma configuração no formato de estrela, com o haplótipo H13 dominante e os demais posicionados na periferia (Figura 5).

De uma forma geral, as amostras coletadas em riachos do Brasil, apresentaram maior número de haplótipos ( $Nh = 12$ ) e sítios polimórficos ( $S = 35$ ), além de maiores valores de diversidade haplotípica ( $Hd = 0,880$ ) e nucleotídica ( $\pi =$

0,01633), quando comparadas com o número de haplótipos ( $Nh = 7$ ), sítios polimórficos ( $S = 15$ ) e índices de diversidade haplotípica e nucleotídica exibidos pelas amostras coletadas em riachos do Paraguai ( $Hd = 0,552$  e  $\pi = 0,00293$ , respectivamente). A diversidade haplotípica ( $Hd$ ) e nucleotídica ( $\pi$ ) por microbacia variou de 0 a 0,944 e de 0 a 0,01270, respectivamente. Os testes de neutralidade  $D$  de Tajima e  $F_s$  de Fu foram ambos estatisticamente significativos ( $p < 0,05$ ) somente para a Microbacia 2 (Tabela 2).

**Tabela 2** - Diversidade genética de *Bryconamericus aff. iheringii* coletados em seis microbacias nas margens direita (Paraguai) e esquerda (Brasil) do reservatório da Itaipu, obtida a partir do sequenciamento parcial da região D-loop do DNA mitocondrial.  $N$  – Número de indivíduos analisados,  $Nh$  – Número de haplótipos,  $S$  – Sítios polimórficos,  $Hd$  – Diversidade haplotípica,  $\pi$  – Diversidade nucleotídica,  $D$  – Teste de neutralidade de Tajima (1989),  $F_s$  – Teste de neutralidade de Fu (1997). \*  $p < 0,05$ .

Amostras	$N$	$Nh$	$S$	$Hd$	$\pi$	$D$	$F_s$
Microbacia 1	3	2	8	0,667	0,00774	0	3,10109
Microbacia 2	20	6	7	0,447	0,00115	-1,97235*	-3,01269*
<b>Paraguai</b>	<b>23</b>	<b>7</b>	<b>15</b>	<b>0,522</b>	<b>0,00293</b>	<b>-1,79838*</b>	<b>-0,89898</b>
Microbacia 3	3	2	1	0,667	0,00097	0	0,20067
Microbacia 4	9	7	24	0,944	0,01270	0,40028	0,15724
Microbacia 5	3	1	0	0	0	0	-
Microbacia 6	9	4	6	0,583	0,00193	-1,72782*	-0,44951
<b>Brasil</b>	<b>24</b>	<b>12</b>	<b>35</b>	<b>0,880</b>	<b>0,01633</b>	<b>0,76873</b>	<b>1,32523</b>

Fonte: O autor (2021).

## 4.2 Estrutura genética populacional

O primeiro agrupamento testado na AMOVA, que considerou cada ponto de coleta como uma população e Paraguai e Brasil como grupos distintos, mostrou a maior parte da variação molecular ocorrendo entre os grupos (49,17% da variação), enquanto a variação entre populações dentro dos grupos foi de 39,74% e dentro das populações foi de 11,08%. Neste agrupamento, os índices de fixação obtidos entre populações dentro de grupos ( $\Phi_{SC} = 0,782$ ), entre populações ( $\Phi_{ST} = 0,889$ ) e entre grupos ( $\Phi_{CT} = 0,492$ ), foram estatisticamente significativos com  $p < 0,05$  (Tabela 3).

**Tabela 3** - Análise de Variância Molecular (AMOVA) para as amostras de *Bryconamericus aff. iheringii* de riachos das margens direita (Paraguai) e esquerda (Brasil) do reservatório da Itaipu, mostrando a porcentagem de variação entre grupos (Paraguai e Brasil), entre populações dentro de grupos e dentro de populações (pontos de coleta).  $\Phi_{SC}$  – Diferenciação genética entre populações dentro de grupos,  $\Phi_{ST}$  – Diferenciação genética entre populações,  $\Phi_{CT}$  – Diferenciação genética entre grupos. \*  $p < 0,05$  (teste de significância usando 1000 permutações).

Fonte da Variação	% de variação
Entre grupos	49,17%
Entre populações dentro de grupos	39,74%
Dentro de populações	11,08%
Índice de Fixação	
$\Phi_{SC}$ :	0,782*
$\Phi_{ST}$ :	0,889*
$\Phi_{CT}$ :	0,492*

Fonte: O autor (2021).

No caso do segundo agrupamento testado na AMOVA, que considerou quatro sub-agrupamentos (áreas preservadas Paraguai, áreas agrícolas Paraguai, áreas preservadas Brasil e áreas agrícolas Brasil) alocados dentro dos grupos Paraguai (áreas preservadas/agrícolas) e Brasil (áreas preservadas/agrícolas), a maior parte da variação molecular ocorreu entre os grupos (55,38% da variação). Nesta AMOVA, uma maior variação foi encontrada dentro de populações (46,26%), quando comparadas à variação obtida entre populações dentro de grupos (-1,64%). Para os índices de fixação, foi obtido um valor estatisticamente significativo ( $p < 0,05$ ) somente para o  $\Phi_{ST}$  (0,537) (Tabela 4).

**Tabela 4** - Análise de Variância Molecular (AMOVA) para as amostras de *Bryconamericus aff. iheringii* de riachos das margens direita (Paraguai) e esquerda (Brasil) do reservatório da Itaipu, mostrando a porcentagem de variação entre grupos Paraguai (áreas preservadas/agrícolas) e Brasil (áreas preservadas/agrícolas), entre populações dentro de grupos e dentro de populações (áreas preservadas Paraguai, áreas agrícolas Paraguai, áreas preservadas Brasil e áreas agrícolas Brasil).  $\Phi_{SC}$  – Diferenciação genética entre populações dentro de grupos,  $\Phi_{ST}$  – Diferenciação genética entre populações,  $\Phi_{CT}$  – Diferenciação genética entre grupos. \*  $p < 0,05$  (teste de significância usando 1000 permutações).

Fonte da Variação	% de variação
Entre grupos	55,38%
Entre populações dentro de grupos	-1,64%
Dentro de populações	46,26%
Índice de Fixação	
$\Phi_{SC}$ :	-0,037
$\Phi_{ST}$ :	0,537*
$\Phi_{CT}$ :	0,554

Fonte: O autor (2021).

O terceiro agrupamento testado, que considerou cada microbacia como uma população e Paraguai e Brasil como grupos distintos, mostrou a maior parte da variação molecular ocorrendo entre populações dentro dos grupos (57,01% da variação). Ainda, parte da variação molecular também foi obtida entre grupos (24,55%) e dentro de populações (18,43%). Para este agrupamento, os índices de fixação  $\Phi_{SC}$  (0,756) e  $\Phi_{ST}$  (0,816) apresentaram valores de diferenciação estatisticamente significativos ( $p < 0,05$ ) (Tabela 5).

**Tabela 5** - Análise de Variância Molecular (AMOVA) para as amostras de *Bryconamericus aff. iheringii* de riachos das margens direita (Paraguai) e esquerda (Brasil) do reservatório da Itaipu, mostrando a porcentagem de variação entre grupos (Paraguai e Brasil), entre populações dentro de grupos e dentro de populações (microbacias).  $\Phi_{SC}$  – Diferenciação genética entre populações dentro de grupos,  $\Phi_{ST}$  – Diferenciação genética entre populações,  $\Phi_{CT}$  – Diferenciação genética entre grupos. \*  $p < 0,05$  (teste de significância usando 1000 permutações).

Fonte da Variação	% de variação
Entre grupos	24,55%
Entre populações dentro de grupos	57,01%
Dentro de populações	18,43%
Índice de Fixação	
$\Phi_{SC}$ :	0,756*
$\Phi_{ST}$ :	0,816*
$\Phi_{CT}$ :	0,246

Fonte: O autor (2021).



O índice de diferenciação ( $\Phi_{ST}$ ) par a par, foi estatisticamente significativo ( $p < 0,05$ ) entre o conjunto de amostras do Paraguai e do Brasil, apresentando alto valor de diferenciação ( $\Phi_{ST} = 0,542$ ). Entre as microbacias, esse índice foi estatisticamente significativo ( $p < 0,05$ ) para a maioria das comparações. Os valores de  $\Phi_{ST}$  par a par variam de 0,000 a 0,946 (Tabela 6).

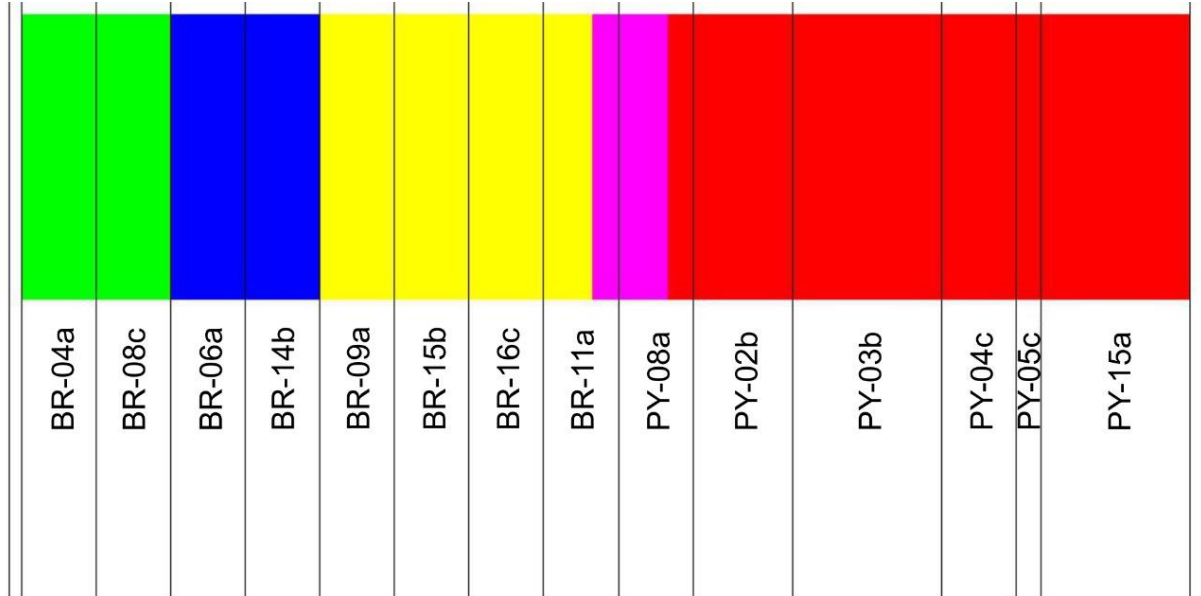
**Tabela 6** - Diferenciação genética ( $\Phi_{ST}$ ) par a par de *Bryconamericus aff. iheringii* entre as seis microbacias. \*  $p < 0,05$ .

	Microbacia 1	Microbacia 2	Microbacia 3	Microbacia 4	Microbacia 5
Microbacia 2	0,732*				
Microbacia 3	0,757	0,939*			
Microbacia 4	0,422*	0,722*	0,534*		
Microbacia 5	0,778	0,943*	0,000	0,536*	
Microbacia 6	0,873*	0,946*	0,933*	0,581*	0,940*

Fonte: O autor (2021).

Por fim, a análise de estruturação populacional pelo método bayesiano, realizada pelo *software* BAPS, indicou que o número mais provável de agrupamento seria cinco ( $K = 5$ ). Dos 23 espécimes provenientes de riachos do Paraguai, 21 (pertencentes aos pontos PY-02b, PY-03b, PY-04c, PY-05c, PY-15a e um indivíduo do PY-08a) parecem ser provenientes da mesma ancestralidade (*cluster* vermelho). Os outros dois espécimes pertencentes ao ponto PY-08a, mostraram ancestralidade similar à de uma amostra brasileira, pertencente ao ponto BR-11a, no *cluster* rosa. Em contrapartida, os espécimes provenientes de riachos do Brasil apresentaram mais três ancestralidades distintas, agrupando os indivíduos dos pontos BR-04a e BR-08c no *cluster* verde, os indivíduos dos pontos BR-06a e BR-14b no *cluster* azul e os indivíduos dos pontos BR-09a, BR-15b, BR-16c e o restante de BR-11a no *cluster* amarelo (Figura 7).

**Figura 7** - Estruturação populacional pelo método bayesiano para as sequências parciais da região D-loop do DNA mitocondrial dos 47 espécimes de *Bryconamericus aff. iheringii* de riachos das margens esquerda (Brasil) e direita (Paraguai) do reservatório da Itaipu. As cores representam os cinco agrupamentos obtidos a partir de  $K = 5$ . Os pontos de amostragem aos quais os indivíduos pertencem estão indicados logo abaixo.



Fonte: O autor (2021).

## 5 DISCUSSÃO

### 5.1 Diversidade genética

De modo geral, é esperado que populações naturais de tamanho grande, habitando ambientes heterogêneos e com histórias de vida que favorecem o crescimento populacional, apresentem um alto nível de diversidade genética (NEI, 1987). Contudo, como populações de peixes de água doce podem estar limitadas a certas drenagens (DEWOODY & AVISE, 2000), as quais possuem diferentes características, diferentes amostras de uma mesma espécie, em diferentes sistemas lóticos, mesmo que próximos, podem revelar níveis distintos de variabilidade genética (ASHIKAGA, 2013).

Considerando as análises de sequências de DNA, uma estimativa importante para a variação genética é o número de haplótipos em cada população (MARIN, 2013). De modo geral, o número de haplótipos obtidos para os 47 espécimes de *Bryconamericus aff. iheringii* no presente estudo (19) (Figura 4) parece alto quando comparado ao de algumas análises prévias da região D-loop na mesma espécie e em outros pequenos Characiformes neotropicais. Apolinário-Silva (não publicado<sup>1</sup>), por exemplo, obteve 14 haplótipos em mais de 200 espécimes de *B. aff. iheringii* da bacia do rio das Cinzas. Schneider (2007), obteve 13 haplótipos em 69 espécimes de *Carnegiella strigata* nas bacias dos rios Negro, Urubu e Uatumã. Diferentemente, Terêncio (2009) obteve 97 haplótipos a partir de 125 espécimes de *Nannostomus eques* em tributários do rio Negro. Contudo, é importante destacar que a quantidade geral de haplótipos do presente estudo não reflete uma única população, uma vez que diferentes riachos em ambas as margens do rio Paraná foram amostrados e diferentes populações parecem ocorrer em cada drenagem.

No caso das amostras do Paraguai, a configuração em estrela na rede de haplótipos, com o haplótipo mais frequente (H13) ao centro e haplótipos mais restritos

---

<sup>1</sup> APOLINÁRIO-SILVA, C. Padrões de Distribuição e Estruturação da Diversidade Genética em Pequena Escala para Peixes Neotropicais. 2021. Tese (Doutorado em Genética e Biologia Molecular) – Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2021.

nas ramificações (Figura 5), mostra um possível sinal de expansão populacional (SLATKIN & HUDSON, 1991; SILVA, 2006). De fato, com exceção de PY-08a, os pontos do lado paraguaio estão em afluentes de uma mesma microbacia, de modo que o sinal de expansão parece reflexo do efeito fundador durante a colonização da microbacia, o que possivelmente envolveu fundadores carregando o haplótipo mais frequente (H13). Interessantemente, os haplótipos das drenagens paraguaias não foram compartilhados com as drenagens brasileiras, o que sugere a ausência de fluxo gênico entre os indivíduos que habitam os riachos das diferentes margens. Ao mesmo tempo, isto também indica que a colonização dos riachos da margem esquerda envolveram fundadores carregando outras linhagens mitocondriais, tal como pode ser observado na rede de haplótipos.

Além do número de haplótipos, os índices de diversidade haplotípica e nucleotídica são comumente utilizados para estimar a diversidade genética em dados haploides (FREELAND, 2005). No presente estudo, o conjunto de amostras de *B. aff. iheringii* obtidos em riachos do Brasil teve maiores diversidades haplotípica ( $Hd = 0,880$ ) e nucleotídica ( $\pi = 0,01633$ ) que aquelas obtidas para o conjunto de amostras dos riachos paraguaios  $Hd = 0,552$  e  $\pi = 0,00293$  (Tabela 2), o que também parece ser reflexo do fato da maioria das amostras paraguaias serem de uma única microbacia, enquanto as amostras brasileiras são de quatro microbacias. De fato, considerando o estudo de Apolinário-Silva (não publicado), o qual também analisou a região D-loop de *B. aff. iheringii* entre drenagens de uma única microbacia ( $Hd = 0,770$  e  $\pi = 0,0061$ ), os resultados são próximos aos do conjunto de amostras do Paraguai. De todo modo, os níveis de variação para a região D-loop parecem ser variáveis entre os pequenos Characiformes. Por exemplo, Schneider (2007), encontrou  $Hd$  de 0,6224 e 0,6993 e  $\pi$  de 0,0058 e 0,0029 para duas unidades evolutivas diferentes de *Carnegiella strigata*, enquanto Terêncio (2009), encontrou  $Hd$  de 0,913 e 0,999 e  $\pi$  de 0,00266 e 0,02390 para duas unidades evolutivas de *Nannostomus eques*. Contudo, é esperado que espécies de pequeno porte, sedentárias ou que realizam migrações curtas, a exemplo das que habitam riachos, apresentem níveis de variação abaixo do observado, por exemplo, para espécies de peixes grandes e migratórias (SIVASUNDAR; BERMINGHAM; ORTI, 2001). Martins et al. (2003), encontrou  $Hd = 0,958$  e  $\pi = 0,0351$  para *Leporinus elongatus* da bacia do rio Paraná. Ashikaga (2014), encontrou valores de  $Hd$  variando entre 0,4052 e 1,0 e de  $\pi$  variando entre 0,0307 e

0,1890 para *Brycon orbignyianus* ao longo do Rio Paraná e seus principais afluentes. Semelhantemente, Ferreira et al. (2017), encontrou valores de  $Hd$  variando entre 0,972 e 1,000 e de  $\pi$  variando entre 0,0102 e 0,0195 para *Prochilodus lineatus* do alto e médio rio Paraná.

Segundo Grant & Bowen (1998), uma combinação de alta diversidade haplotípica ( $Hd > 0,5$ ) com alta diversidade nucleotídica ( $\pi > 0,5\%$ ), como a encontrada nas amostras do Brasil, indica um contato secundário entre diferentes linhagens, ou, que a população é grande e estável, com uma longa história evolutiva. Isto parece plausível, uma vez que o conjunto de amostras do Brasil inclui diferentes drenagens, as quais, segundo a rede de haplótipos, possivelmente incluem populações diferentes e com histórias distintas. No caso das amostras do Paraguai, alta diversidade haplotípica ( $Hd > 0,5$ ) combinada com uma baixa diversidade nucleotídica ( $\pi < 0,5\%$ ), indica, segundo os mesmos autores citados acima, um gargalo genético seguido de um rápido crescimento populacional e acúmulo de mutações. Isto também é bastante plausível, pois como já mencionado, a maioria das amostras paraguaias estão em uma mesma microbacia e sua distribuição de haplótipos parece ser reflexo do efeito fundador (gargalo populacional) durante a colonização deste sistema de drenagem.

Os resultados dos testes de neutralidade  $D$  de Tajima e  $F_s$  de Fu foram ambos estatisticamente significativos ( $p < 0,05$ ) somente para a Microbacia 2 (que compreende a maioria das amostras paraguaias) (Tabela 2). Eles possuem valores negativos, podendo assim indicar eventos recentes de expansão populacional (EXCOFFIER; LAVAL; SCHNEIDER, 2005; CUNHA & SOLÉ-CAVA, 2012), o que entra em concordância com os valores das diversidades haplotípica e nucleotídica para o Paraguai (Tabela 2), que também indicam, segundo Grant & Bowen (1998), um crescimento populacional, e com a distribuição de haplótipos (Figura 5), que parece refletir o efeito fundador durante a colonização daquele sistema de drenagem. O  $D$  de Tajima também foi estatisticamente significativo ( $p < 0,05$ ) e negativo para a Microbacia 6, indicando expansão populacional (EXCOFFIER; LAVAL; SCHNEIDER, 2005; CUNHA & SOLÉ-CAVA, 2012). Para as demais microbacias, os resultados destes testes de neutralidade não foram estatisticamente significativos ( $p > 0,05$ ), possivelmente, pela pequena quantidade de amostras para algumas destas microbacias.

De modo geral, apesar da região circundante à que parte dos exemplares foram amostrados estar sob a pressão do cultivo intensivo de *commodities* (SERRA, 2009; PEREIRA & SCROCCARO, 2010; SOUCHAUD, 2005), com conseqüente diminuição da qualidade ambiental, mais que um haplótipo puderam ser obtidos para as drenagens paraguaias e brasileiras. Embora seja necessário bastante cautela ao traçar este tipo de relação usando dados de DNA mitocondrial, parece plausível que se as populações tivessem reflexos de eventos drásticos recentes, não mostrariam variações no DNA mitocondrial ou estariam extintas dos locais. De fato, dados como os de Caetano; Oliveira; Zawadzki (2016) sugerem que *B. aff. iheringii* pode ser considerado tolerante à degradação ambiental, uma vez que a espécie é generalista no uso de recursos.

## 5.2 Estrutura genética populacional

A estruturação genética em populações naturais é comum em peixes de água doce (ALLAN & FLECKER, 2003), tais como os membros da ordem Characiformes (REIS, 2012). No presente estudo, é marcante a estruturação genética entre os conjuntos de amostras do Paraguai e do Brasil, o que é corroborado pela rede de haplótipos, índice  $\Phi_{ST}$  e pela AMOVA. Dois dos três agrupamentos testados na AMOVA evidenciaram a maior parte da variação genética ocorrendo entre grupos (49,17% para o primeiro, 55,38% para o segundo agrupamento, Tabelas 3 e 4). Reforçando este dado, o valor de  $\Phi_{ST}$  par a par entre os conjuntos de amostras do Paraguai e do Brasil foi de 0,542, sendo estatisticamente significativo ( $p < 0,05$ ). Segundo Wright (1978), valores de  $\Phi_{ST}$  acima de 0,25 indicam uma alta diferenciação genética, com populações altamente estruturadas. Esses valores, assim como a falta de haplótipos compartilhados, mostram que os conjuntos de amostras do Paraguai e do Brasil são diferentes, sugerindo histórias de colonização distintas para as drenagens, envolvendo linhagens fundadoras diferentes entre as margens.

É importante destacar também, que para o segundo agrupamento testado na AMOVA (Tabela 4), não houve variação entre os sub-agrupamentos preservados e agrícolas do Paraguai, nem entre os sub-agrupamentos preservados e agrícolas do Brasil, sendo o índice de diferenciação genética entre populações dentro de grupos

( $\Phi_{SC}$ ) estatisticamente não significativo ( $p > 0,05$ ). Isso também entra em concordância com o diagnóstico de que *B. aff. iheringii* é tolerante à degradação ambiental (CAETANO; OLIVEIRA; ZAWADZKI, 2016).

Adicionalmente, entre as microbacias de cada margem do rio Paraná, embora o número amostral seja baixo para algumas, a rede de haplótipos, índice  $\Phi_{ST}$  e AMOVA também sugerem populações possivelmente distintas em cada microbacia. O terceiro agrupamento testado na AMOVA evidenciou a maior parte da variação genética ocorrendo entre populações dentro de grupos (57,01%), ou seja, entre as microbacias dentro de cada país, com valores de  $\Phi_{SC}$  e  $\Phi_{ST}$  globais altos e estatisticamente significativos (0,756 e 0,816, respectivamente, com  $p < 0,05$ ) (Tabela 5). Os valores de  $\Phi_{ST}$  par a par foram altos e estatisticamente significativos ( $p < 0,05$ ) para a maioria das comparações (Tabela 6), reforçando a diferenciação genética entre as microbacias.

Além disso, considerando a diferenciação genética entre riachos em cada margem do rio Paraná (primeiro agrupamento testado, Tabela 3), a AMOVA também indica 39,74% de variação entre populações, incluindo  $\Phi_{SC} = 0,782$  ( $p < 0,05$ ). Mesmo *B. aff. iheringii* sendo relatado como uma espécie que realiza curtas migrações reprodutivas (BRITTO et al., 2003), populações distintas já foram relatadas ocorrendo entre riachos de uma mesma microbacia, ou mesmo entre secções de um riacho (APOLINÁRIO-SILVA, não publicado). De fato, Apolinário-Silva (não publicado), em seu estudo da região *D-loop* de *B. aff. iheringii* da bacia do rio das Cinzas, relata 66,43% da variação entre grupos e valores de  $\Phi_{ST}$  par a par que variam de 0,133 a 0,840 ( $p < 0,05$ ). O mesmo padrão também foi relatado para outros Characiformes de pequeno porte (SCHNEIDER, 2007; TERÊNCIO, 2009), reforçando que particularidades biológicas e características intrínsecas dos riachos poderiam ser determinantes para os padrões de estruturação genética obtidos nestes tipos de drenagem (FERREIRA et al., 2016; APOLINÁRIO-SILVA et al., 2021). De fato, quando se considera grandes Characiformes migradores, populações únicas e panmíticas são comumente relatadas para grandes áreas de drenagem (SIVASUNDAR; BERMINGHAM; ORTI, 2001; MARTINS et al., 2003; FERREIRA et al., 2017).

A análise de estruturação populacional pelo método bayesiano, realizada pelo *software* BAPS, indicou que os indivíduos estão estruturados em 5 agrupamentos ( $K = 5$ ) (Figura 7). Três deles podem ser atribuídos a linhagens ancestrais exclusivas do

Brasil (*clusters* verde, azul e amarelo), um pode ser atribuído a uma linhagem ancestral exclusiva do Paraguai (*cluster* vermelho) e um último pode ser uma linhagem ancestral para os dois países (*cluster* rosa). Com exceção do último agrupamento, que abrange indivíduos do Paraguai e do Brasil, o resultado da análise entra em concordância com a rede de haplótipos obtida (Figura 5). Nela, observa-se também uma separação entre haplótipos de indivíduos paraguaios e brasileiros, com os haplótipos H13, H14, H15, H16, H17 e H19, de indivíduos paraguaios, possuindo a mesma ancestralidade (*cluster* vermelho), o que é justificado por eles estarem dentro da mesma microbacia. Para os indivíduos brasileiros, os haplótipos H5, H6, H7, H11 e H12 possuem a mesma ancestralidade (*cluster* amarelo), os haplótipos H1 e H2 também possuem a mesma ancestralidade (*cluster* verde), assim como os haplótipos H3, H4, H9 e H10 possuem a mesma ancestralidade (*cluster* azul), também justificado, em grande parte, pelas amostras serem de uma mesma microbacia. De forma contrária, os haplótipos H18 e H8, pertencentes a indivíduos do Paraguai e do Brasil, respectivamente, possuem a mesma ancestralidade (*cluster* rosa), mas estão relativamente distantes na rede haplótipos, separados por 15 passos mutacionais.

Os agrupamentos obtidos também são concordantes com os valores dos índices de diversidade genética, que mostram uma maior diversidade para o Brasil se comparado com o Paraguai (Tabela 2), e com os valores dos índices de diferenciação ( $\Phi_{ST}$ ), que apontam a existência de alta estruturação entre as populações do Paraguai e do Brasil e entre as microbacias (Tabela 6).

De acordo com Avise (1994), diversos fatores como mobilidade, presença de barreiras, características comportamentais, história de vida do organismo, história evolutiva e a distância geográfica entre as subpopulações, podem influenciar na estrutura populacional de uma espécie. Neste sentido, a mobilidade se destaca, principalmente em se tratando de um pequeno caracídeo que se presume possuir baixa capacidade de deslocamento, característica comum dos peixes de pequeno porte de riachos neotropicais (CASTRO, 1999). Aliado a isso, está a provável existência de uma barreira geográfica à dispersão de peixes pequenos, o reservatório da Itaipu.

É sabido que os canais dos grandes rios atuam como barreiras à dispersão de algumas espécies de peixes de pequeno porte, tanto por seu tamanho e regime de descarga, como por neles ser maior a competição interespecífica e/ou predação



desses pequenos peixes (KAVALCO & MOREIRA-FILHO, 2003; ALCALÁ & SÁNCHEZ-DUARTE, 2011). A alta estruturação encontrada entre Paraguai e Brasil e entre as microbacias dentro de cada país, pode ser devida a que, o rio Paraná (reservatório da Itaipu), funciona como uma barreira que impede o fluxo gênico entre eles. Por outro lado, indivíduos dos pontos BR-04a e BR-08c, mesmo sendo de microbacias diferentes (Figura 3), pertencem ao mesmo agrupamento (Figura 7), compartilham o haplótipo H1 (Figura 5) e, conseqüentemente, não apresentam estruturação ( $p > 0,5$ ) (Tabela 6). Desta forma, pode-se supor que o reservatório da Itaipu, ao submergir algumas áreas após o seu enchimento, pode estar permitindo o fluxo gênico entre esses indivíduos. Contudo, para testar tal hipótese, seria necessário um estudo com maior número amostral, uso conjunto de outros marcadores moleculares e análises mais específicas.

Por fim, é válido ressaltar que é de extrema importância o conhecimento do componente genético da biodiversidade, pois a diversidade genética é necessária para que as populações evoluam e se adaptem às mudanças ambientais (FRANKHAM; BALLOU; BRISCOE, 2010). O uso de marcadores moleculares têm se mostrado eficiente para tal propósito, indicando a saúde genética das populações e como elas estão estruturadas, fornecendo dados para interpretações ecológicas e evolutivas, que podem servir de base para a formulação de programas de manejo e conservação de populações e espécies.

## 6 CONCLUSÃO

Os níveis de diversidade genética obtidos para a região *D-loop* de *B. aff. iheringii* estão dentro do padrão relatado para a espécie, de modo que a diferença observada entre os níveis obtidos para o conjunto de amostras da margem direita (moderada diversidade) e o conjunto da margem esquerda (alta diversidade) se deve, principalmente, ao fato de que os riachos paraguaios analisados são quase todos de uma única microbacia, enquanto os riachos brasileiros são de diferentes microbacias. A configuração da rede de haplótipos, AMOVA, índice de diferenciação e análise de estruturação populacional pelo método bayesiano mostram uma clara diferenciação entre o conjunto de amostras paraguaio e brasileiro e entre suas microbacias. Além disso, pode ser sugerida a diferenciação populacional entre as diferentes drenagens em cada margem. Valores das diversidades haplotípica e nucleotídica, bem como a rede de haplótipos, sugerem que tais diferenças derivem, principalmente, dos processos de colonização destas drenagens, os quais possivelmente envolvem fundadores carregando diferentes linhagens haplotípicas. Além disso, também parece plausível que o rio Paraná (reservatório da Itaipu) funciona como uma barreira ao fluxo gênico entre as diferentes margens e até mesmo dentro de cada margem. Quanto a avaliação de áreas preservadas e agrícolas, mais estudos são necessários, incluindo outros marcadores, porém, foi notado que se as populações tivessem respondido a eventos drásticos recentes, não mostrariam variações no DNA mitocondrial ou teriam se extinguido das áreas agrícolas. Em se tratando da conservação genética de espécies, a identificação de suas linhagens é de crucial importância, pois a manutenção da diversidade genética de uma espécie depende da preservação de suas diferentes linhagens (FRANKHAM; BALLOU; BRISCOE, 2010), o que depende da conservação das drenagens em que habitam. Deste modo, estratégias voltadas para a conservação de riachos devem ser elaboradas, uma vez que se esses ambientes forem degradados, as espécies que os habitam perderiam parte do seu potencial evolutivo. Considerando a importância de estudos genético-populacionais para a conservação de espécies, espera-se que este trabalho possa servir como base para futuros estudos mais amplos com esses e outros pequenos peixes de riachos, que possuem grande importância para suas comunidades e para o ecossistema como um todo.

## 7 REFERÊNCIAS

- 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**, v. 14, n. Suplemento, p. 89-107, 1992.
- AGOSTINHO, A. A.; OKADA, E. K.; GREGORIS, J. A pesca no reservatório de Itaipu: aspectos socioeconômicos e impactos do represamento. *In*: HENRY, R. **Ecologia de reservatórios: estrutura, função e aspectos sociais**. Botucatu: FUNDIBIO, 1999. p. 281-319.
- AGOSTINHO, A. A.; ZALEWSKI, M. **A planície alagável do alto rio Paraná: importância e preservação (Upper Paraná River floodplain: importance and Preservation)**. Maringá: EDUEM, 1996.
- AGOSTINHO, A. A.; ZALEWSKI, M. The dependence of fish community structure and dynamics on floodplain and riparian ecotone zone in Parana River, Brazil. *In*: **The Importance of Aquatic-Terrestrial Ecotones for Freshwater Fish**. Springer, Dordrecht, 1995. p. 141-148.
- ALCALÁ, C. A. L.; SÁNCHEZ-DUARTE, P. **LOS PECES DEL DELTA DEL ORINOCO: Diversidad, bioecología, uso y conservación**. Caracas: FLSCN y Chevron, 2011.
- ALLAN, J. D. Landscapes and riverscapes: the influence of land use on stream ecosystems. **Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics**, v. 35, p. 257-284, 2004.
- ALLAN, J. D.; CASTILLO, M. M. An introduction to fluvial ecosystems. *In*: **Stream Ecology: structure and function of running waters**: 2nd. ed. Netherlands: Springer, 2007. p. 1-12.
- ALLAN, J. D.; FLECKER, A. S. Biodiversity conservation in running waters. **BioScience**, v. 43, n. 1, p. 32-43, 1993.
- APOLINÁRIO-SILVA, C. et al. Fine-scale genetic structure of suckermouth *Hypostomus ancistroides* populations: the importance of Neotropical streams for fish conservation. **Biological Journal of the Linnean Society**, blab039, 2021.
- ASHIKAGA, F. Y. **Análise da Estrutura Genética de *Brycon orbignyanus* na Bacia do Rio Paraná para Fins de Conservação**. 2013. Tese (Doutorado em Zoologia) – Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2013.
- AVISE, J. C. **Molecular markers, natural history and evolution**. New York: Springer-Science+Business Media, 1994.

AVISE, J. C.; ELLIS, D. Mitochondrial DNA and the Evolutionary Genetics of Higher Animals [and Discussion]. **Philosophical Transactions of the Royal Society B | Biological Sciences**, v. 312, p. 325-342, 1986.

AVISE, J. C.; SAUNDERS, N. C. Hybridization and introgression among species of sunfish (*Lepomis*): analysis by mitochondrial DNA and allozyme markers. **Genetics**, v. 108, n. 1, p. 237-255, 1984.

BALLER, L. **Caracterização de perfis longitudinais dos rios nas bacias hidrográficas do Paraná III (Brasil) e Alto Paraná (Paraguai)**. 2014. Dissertação (Mestrado em Geografia) – Programa de Pós-Graduação em Geografia, Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Marechal Cândido Rondon, 2014.

BANDELT, H. J.; FORSTER, P.; RÖHL, A. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. **Molecular Biology and Evolution**, v. 16, n. 1, p. 37-48, 1999.

BILLINGTON, N.; HEBERT, P. D. N. Mitochondrial DNA diversity in fishes and its implications for introductions. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v. 48, n. S1, p. 80-94, 1991.

BRITTO, S. G. C., SIROL, R. N., VIANNA, N. C., JARDIM, S. M., SANTOS, J. C., PELISARI, E. **Peixes do rio Paranapanema**. São Paulo: Duke Energy Internacional Geração Paranapanema, 2003.

BROWN, W. M.; GEORGE, M.; WILSON, A. C. Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 76, n. 4, p. 1967-1971, 1979.

CAETANO, D. L. F.; DE OLIVEIRA, E. F.; ZAWADZKI, C. H. Fish species indicators of environmental quality of Neotropical streams in Southern Brazil, upper Paraná River basin. **Acta Ichthyologica et Piscatoria**, v. 46, n. 2, p. 87-96, 2016.

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

CASCIOTTA, J. R.; AZPELIQUETA, M. de las M.; ALMIRON, A. E. *Bryconamericus uporas* sp. n. (Characiformes, Characidae), a new species from the rio Uruguay basin, in Argentina. **Revue suisse de Zoologie**, v. 109, n. 1, p. 155-165, 2002.

CASTRO, R. M. C. Evolução da ictiofauna de riachos sul americanos: padrões gerais e possíveis processos. In: CARAMASCHI, E. P. R.; MAZZONI, R.; PERES NETO, P. R. (Eds.). **Ecologia de peixes de riachos**. Série Oecologia Brasiliensis, v. 6, PPGE UFRJ. Rio de Janeiro, 1999. p. 139-155.

CORANDER, J. *et al.* BAPS: Bayesian analysis of population structure. **Department of Mathematics and statistics, University of Helsinki, Finland. Manual**, v. 6, 2013.

CORANDER, J.; TANG, J. Bayesian analysis of population structure based on linked molecular information. **Mathematical biosciences**, v. 205, n. 1, p. 19-31, 2007.

COSTA, A. *et al.* Fishes (Osteichthyes: Actinopterygii) from the Penacho stream, upper Paraná River basin, Paraná State, Brazil. **Check List**, v. 9, n. 3, p. 519-523, 2013.

CUNHA, H. A.; SOLÉ-CAVA, A. M. Análise filogeográfica. *In*: Matioli, S. R., Fernandes, F. M. C. (Eds.). **Biologia Molecular e Evolução**. 2. ed. Ribeirão Preto: Holos Editora, 2012. p. 197-2015.

DA GRACA, W. J.; PAVANELLI, C. S. **Peixes da planície de inundação do alto rio Paraná e áreas adjacentes**. Maringá: EDUEM, 2007.

DALA-CORTE, R. B.; BECKER, F. G.; MELO, A. S. Riparian integrity affects diet and intestinal length of a generalist fish species. **Marine and Freshwater Research**, v. 68, n. 7, p. 1272-1281, 2017.

DEWOODY, J. A.; AVISE, J. C. Microsatellite variation in marine, freshwater and anadromous fishes compared with other animals. **Journal of fish biology**, v. 56, n. 3, p. 461-473, 2000.

DI BITETTI, M. S.; PLACCI, G.; DIETZ, L. A. **Uma visão de Biodiversidade para a Ecorregião Florestas do Alto Paraná—Bioma Mata Atlântica**: planejando a paisagem de conservação da biodiversidade e estabelecendo prioridades para ações de conservação. Washington, DC: WWF, 2003.

DUDGEON, D. *et al.* Freshwater biodiversity: importance, threats, status and conservation challenges. **Biological Reviews**, v. 81, p. 163-182, 2006.

EDGAR, R. C. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. **Nucleic Acids Res.** v. 32, n. 5, p. 1792-1797, 2004.

ESTEVEZ, F. **Fundamentos de limnologia**. 3. ed. Rio de Janeiro: Interciência, 2011.

EXCOFFIER, L. G.; LAVAL, A.; SCHNEIDER, S. Arlequin (version 3.0): An integrated software package for population genetics data analysis. **Evolutionary Bioinformatics Online**, v. 1, p. 47-50, 2005.

EXCOFFIER, L. & LISCHER, H. E. Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. **Molecular ecology resources**, v. 10, n. 3, p. 564–567, 2010.

EXCOFFIER, L.; SMOUSE, P. E.; QUATTRO, J. M. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. **Genetics**, v. 131, n. 2, p. 479-491, 1992.

FERREIRA, D. G. *et al.* Fine-scale genetic structure patterns in two freshwater fish species, *Geophagus brasiliensis* (Osteichthyes, Cichlidae) and *Astyanax altiparanae*

(Osteichthyes, Characidae) throughout a Neotropical stream. **Genetics and Molecular Research**, v. 15, n. 4, gmr15048124, 2016.

FERREIRA, D. G. *et al.* Genetic structure and diversity of migratory freshwater fish in a fragmented Neotropical river system. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, v. 27, n. 1, p. 209-231, 2017.

FERREIRA, M. E. M. C. “Doenças tropicais”: o clima e a saúde coletiva. Alterações climáticas e a ocorrência de malária na área de influência do reservatório de Itaipu, PR. **Terra Livre**, v. 1, n. 20, p. 179-192, 2015.

FISHBASE. **Scientific Names where Genus Equals Bryconamericus**. 2021.

Disponível em:

<https://www.fishbase.se/Nomenclature/ValidNameList.php?syng=bryconamericus&sy ns=&vtitle=Scientific+Names+where+Genus+Equals+%3Ci%3EBryconamericus%3C %2Fi%3E&crit2=CONTAINS&crit1=EQUAL>. Acesso em: 22 abr. 2021.

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

FREELAND, J. R. **Molecular ecology**. Chichester: John Wiley & Sons, 2005.

GHISI, N. de C. *et al.* Length-weight relationship and condition factor for *Astyanax* aff. *paranae* (pisces) in water bodies with different levels of anthropogenic interference in the midwest of Paraná, Brazil. **Publicatio UEPG-Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 18, n. 1, p. 53-60, 2012.

GRANT, W. A. S.; BOWEN, B. W. Shallow population histories in deep evolutionary lineages of marine fishes: insights from sardines and anchovies and lessons for conservation. **Journal of heredity**, v. 89, n. 5, p. 415-426, 1998.

HILSDORF, A. W. S; HALLERMAN, E. M. Characterization of Genetic Resources. *In*: **Genetic Resources of Neotropical Fishes**. Springer, Cham, 2017. p. 55-117.

HORAI, S.; HAYASAKA, K. Intraspecific nucleotide sequence differences in the major noncoding region of human mitochondrial DNA. **American journal of human genetics**, v. 46, n. 4, p. 828-842, 1990.

HUGHES, A. R. *et al.* Ecological consequences of genetic diversity. **Ecology letters**, v. 11, n. 6, p. 609-623, 2008.

HUGHES, J. B.; DAILY, G. C.; EHRLICH, P. R. Population diversity: its extent and extinction. **Science**, v. 278, n. 5338, p. 689-692, 1997.

HUSEMANN, M. *et al.* Comparative biogeography reveals differences in population genetic structure of five species of stream fishes. **Biological Journal of the Linnean Society**, v. 107, n. 4, p. 867-885, 2012.

INSTITUTO DAS AGUAS DO PARANÁ. **CARACTERÍSTICAS GERAIS DA BACIA**. Disponível em:

<http://www.aguasparana.pr.gov.br/modules/conteudo/conteudo.php?conteudo=239>.  
Acesso em: 17 de novembro de 2019.

KAVALCO, K. F.; MOREIRA-FILHO, O. Cytogenetical analyses in four species of the genus *Astyanax* (Pisces, Characidae) from Paraíba do Sul river basin. **Caryologia**, v. 56, n. 4, p. 453-461, 2003.

KEARSE, M. *et al.* Geneious Basic: An integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. **Bioinformatics**, v. 28, n. 12, p. 1647-1649, 2012.

KOKUBUN, É. E. *et al.* Diet and body shape among populations of *Bryconamericus iheringii* (Otophysi: Characidae) across the Campos Sulinos ecosystem. **Neotropical Ichthyology**, v. 16, n. 4, e170167, 2018.

LAIKRE, L.; PALM, S.; RYMAN, N. Genetic population structure of fishes: implications for coastal zone management. **AMBIO: A Journal of the Human Environment**, v. 34, n. 2, p. 111-120, 2005.

LAMPERT, V. R.; AZEVEDO, M. A.; FIALHO, C. B. Reproductive biology of *Bryconamericus iheringii* (Ostariophysi: Characidae) from rio Vacacaí, RS, Brazil. **Neotropical Ichthyology**, v. 2, n. 4, p. 209-215, 2004.

LANGANI, F. *et al.* *Bryconamericus turiuba*, a new species from the upper rio Paraná system (Ostariophysi: Characiformes). **Copeia**, v. 2005, n. 2, p. 386-392, 2005.

LIBRADO, P.; ROZAS, J. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. **Bioinformatics**, v. 25, n. 11, p. 1451-1452, 2009.

LIMA, F. C. T. *et al.* Genera *Incertae Sedis* in Characidae. *In*: REIS, R. E.; KULLANDER, S. O.; FERRARIS-JR, C. J. (Eds.). **Check List of Freshwater Fishes of South and Central America**. Porto Alegre: EDIPUCRS, 2003. p. 106-169.

MARTINS, C. *et al.* Mitochondrial DNA variation in wild populations of *Leporinus elongatus* from the Paraná River basin. **Genetics and Molecular Biology**, v. 26, n. 1, p. 33-38, 2003.

MCCUSKER, M. R.; BENTZEN, P. Positive relationships between genetic diversity and abundance in fishes. **Molecular Ecology**, v. 19, n. 22, p. 4852-4862, 2010.

MEYER, A. *et al.* Monophyletic origin of Lake Victoria cichlid fishes suggested by mitochondrial DNA sequences. **Nature**, v. 347, n. 6293, p. 550-553, 1990.

MEYER, J. L. *et al.* The Contribution of Headwater Streams to Biodiversity in River Networks. **Journal of the American Water Resources Association (JAWRA)**, v. 43, n. 1, p. 86-103, 2007.

NEI, M. **Molecular Evolutionary Genetics**. New York: Columbia University Press, 1987.

ORICOLLI, M. C. G.; BENNEMANN, S. T. Dieta de *Bryconamericus iheringii* (Ostariophysi: Characidae) em riachos da bacia do rio Tibagi, Estado do Paraná. **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, v. 28, n. 1, p. 59-63, 2006.

OTA, R. R. *et al.* Peixes da planície de inundação do alto rio Paraná e áreas adjacentes: revised, annotated and updated. **Neotropical Ichthyology**, v. 16, n. 2, e170094, 2018.

PEREIRA, M. C. B.; SCROCCARO, J. L. Bacias hidrográficas do Paraná. **Série histórica**. Curitiba: SEMA, 2010.

PRIOLI, S. M. A. P. *et al.* Identification of *Astyanax altiparanae* (Teleostei, Characidae) in the Iguazu River, Brazil, based on mitochondrial DNA and RAPD markers. **Genetics and Molecular Biology**, v. 25, n. 4, p. 421-430, 2002.

REED, D. H.; FRANKHAM, R. Correlation between fitness and genetic diversity. **Conservation biology**, v. 17, n. 1, p. 230-237, 2003.

REIS, K. V. **Efeitos de barreiras geomorfológicas na estrutura populacional de *Astyanax xavante* Garutti & Venere, 2009 (Characidae): bases genéticas e morfológicas para a conservação**. 2012. Dissertação (Mestrado em Ecologia e Conservação da Biodiversidade) – Instituto de Biociências, Universidade Federal de Mato Grosso, Cuiabá, 2012.

REIS, R. E. *et al.* Fish biodiversity and conservation in South America. **Journal of fish biology**, v. 89, n. 1, p. 12-47, 2016.

RICHARDSON, J. S. Biological Diversity in Headwater Streams. **Water**, v. 11, n. 2, p. 366, 2019.

SCHNEIDER, C. H. **Análise da variabilidade genética do peixe ornamental *Carnegiella strigata* (Characiformes, Gasteropelecidae) de três rios de água preta da Amazônia Central**. 2007. Dissertação (Mestrado em Genética, Conservação e Biologia Evolutiva) – Programa Integrado de Pós-Graduação em Biologia Tropical e Recursos Naturais do convênio INPA/UFAM, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2007.

SECRETARIA ESTADUAL DE EDUCAÇÃO DO ESTADO DO PARANÁ. **Mapa de uso do solo do Estado do Paraná**. Paraná, 2007. 1 mapa, color. Escala 1:80.000. Disponível em: <http://www.geografia.seed.pr.gov.br/modules/galeria/detalhe.php?foto=1573&evento=8>. Acesso em: 09 dez. 2019.

SERRA, E. **Colonização, uso da terra e conflitos rurais no Paraná**. 12º Encuentro de Geógrafos de América Latina, Montevideu, v. 1, p. 1-26, 2009.

SHAW, E. A. *et al.* Importance of partial barriers and temporal variation in flow when modelling connectivity in fragmented river systems. **Ecological engineering**, v. 91, p. 515-528, 2016.



SHIBATTA O. A. *et al.* Diversidade e distribuição de peixes na bacia do rio Tibagi. *In:* MEDRI, M. E. *et al.* (eds.). **A bacia do rio Tibagi**. Londrina: UEL, 2002. p. 403-424.

SILVA, R. G. **Análise da estrutura genética populacional do curimatá (*Prochilodus lineatus*, Characiformes: Prochilodontidae) na região da bacia do Rio Grande, SP**. 2006. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

SIVASUNDAR, A.; BERMINGHAM, E.; ORTÍ, G. Population structure and biogeography of migratory freshwater fishes (*Prochilodus*: Characiformes) in major South American rivers. **Molecular ecology**, v. 10, n. 2, p. 407-417, 2001.

SLATKIN, M.; HUDSON, R. R. Pairwise comparisons of mitochondrial DNA sequences in stable and exponentially growing populations. **Genetics**, v. 129, n. 2, p. 555-562, 1991.

SOUCHAUD, S. Dinámica de la agricultura de exportación paraguaya y el complejo de la soja: una organización del territorio al estilo brasileño. *In:* FOGEL; RAMÓN; MARCIAL RIQUELME. **Enclave sojero, merma de soberanía y pobreza**, Asunción: Centro de Estudios Rurales Interdisciplinarios, 2005. p. 15-34.

TABERLET, P. The use of mitochondrial DNA control region sequencing in conservation genetics. *In:* SMITH, T. B.; WAYNE, R. K. **Molecular Genetic Approaches in Conservation**. New York: Oxford University Press, 1996. p. 125-142.

TAMURA, K. *et al.* MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. **Molecular biology and evolution**, v. 30, n. 12, p. 2725-2729, 2013.

TATSUMI, F. L. **Revisão taxonômica de *Bryconamericus iheringii* (Boulenger, 1887) (Characiformes, Characidae)**. 2006. Dissertação (Mestrado em Biologia Animal) – Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, 2006.

TEMPLETON, A. R. Using phylogeographic analyses of gene trees to test species status and processes. **Molecular Ecology**, v. 10, n. 3, p. 779-791, 2001.

TERÊNCIO, M. L. **Estimativa da variabilidade genética da região controle do DNA mitocondrial de *Nannostomus eques* (Characiformes, Lebiasinidae) da bacia do rio Negro**. 2009. Dissertação (Mestrado em Genética, Conservação e Biologia Evolutiva) – Programa Integrado de Pós-Graduação em Biologia Tropical e Recursos Naturais do convênio INPA/UFAM, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2009.

TOWNSEND, C. R.; BEGON, M.; HARPER, J. P. **Fundamentos em ecologia**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.

VITULE, J. R. S.; SKÓRA, F.; ABILHOA, V. Homogenization of freshwater fish faunas after the elimination of a natural barrier by a dam in Neotropics. **Diversity and Distributions**, v. 18, n. 2, p. 111-120, 2012.

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

WRIGHT, S. **Evolution and the Genetics of Populations. Vol. 4. Variability within and among Natural Populations**. Chicago: University of Chicago Press, 1978.