



Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO SUDOESTE DA BAHIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA
BIODIVERSIDADE E CONSERVAÇÃO

DIVERSIDADE GENÉTICA EM POPULAÇÕES DE *Lignobrycon myersi* (CHARACIFORMES, CHARACIDAE), UTILIZANDO MARCADORES MOLECULARES

Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação

LISIANNE DE SOUZA OLIVEIRA

JEQUIÉ – BA
2017



LISIANNE DE SOUZA OLIVEIRA

Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação

DIVERSIDADE GENÉTICA EM POPULAÇÕES DE *Lignobrycon myersi* (CHARACIFORMES, CHARACIDAE), UTILIZANDO MARCADORES MOLECULARES



Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação

Dissertação de mestrado apresentada ao programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, para obtenção do título de Mestre em Genética, Biodiversidade e Conservação.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Luiz Souza Carneiro
Coorientadores: Prof. Dr. Paulo Roberto Antunes de Mello Affonso e Prof. Dr. Marcelo Cervini



JEQUIÉ – BA

2017

Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação



Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação



O48d Oliveira, Lisianne de Souza.

Diversidade genética em populações de *Lignobrycon myersi* (CHARACIFORMES, CHARACIDAE) utilizando marcadores moleculares / Lisianne de Souza Oliveira. - Jequié, 2017.

48f.

(Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia - UESB, sob orientação do Prof. Dr. Paulo Luiz Souza Carneiro e Coorientadores Prof. Dr. Paulo Roberto Antunes de Mello Affonso e Prof. Dr. Marcelo Cervini)

Rafaella Cândia Portela de Sousa - CRB 5/1710. Bibliotecária – UESB - Jequié

Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação



UNIVERSIDADE ESTADUAL DO SUDOESTE DA BAHIA - UESB
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA, BIODIVERSIDADE E
CONSERVAÇÃO

Campus Jequié-BA

DECLARAÇÃO DE APROVAÇÃO

Genética

vação

Título: “Diversidade genética em populações de *Lignobrycon myersi* (Characiformes, Characidae), utilizando marcadores moleculares”.

Autor (a): Lisianne de Souza Oliveira

Orientador (a): Prof. Dr. Paulo Luiz Souza Carneiro

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de MESTRE EM GENÉTICA, BIODIVERSIDADE E CONSERVAÇÃO ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: GENÉTICA, BIODIVERSIDADE E CONSERVAÇÃO, pela Banca Examinadora:

Prof. Dr. Paulo Luiz Souza Carneiro – UESB / Jequié

Prof. Dr. Marcelo Cervini - UESB / Jequié

Genética

vação

Dr. Jamille de Araújo Bitencourt – UESB / Jequié

Data de realização: 30 de agosto de 2017.

Avenida José Moreira Sobrinho, s/n – Jequezinho – Jequié/BA – CEP 45.206-190.
Telefones: (0**73) 3528-9725 – E-mail: ppggbc@uesb.edu.br





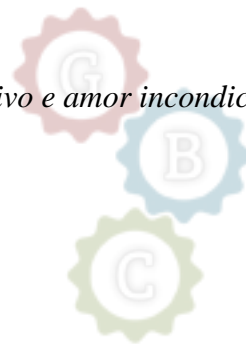
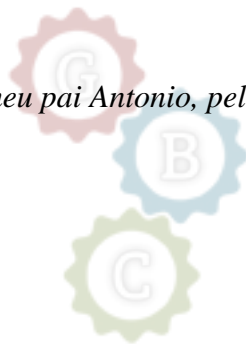
Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação



Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação



Ao meu pai Antonio, pelo incentivo e amor incondicional!



Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação



AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, pelo amor e proteção em todos os momentos de minha vida.

À Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB) e ao Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação (PPGGBC) pelo apoio.

À CAPES/FAPESB pela concessão da bolsa de estudos e apoio financeiro à pesquisa.

Ao Dr. Paulo Luiz Souza Carneiro, pela orientação, compreensão, confiança e pela disposição em sempre ajudar.

Ao Dr. Paulo Affonso e Dr. Marcelo Cervini pela oportunidade, pelo exemplo de profissionalismo e por toda a confiança.

À Dra. Jamille Araújo Bitencourt pelas inúmeras contribuições nos momentos de desespero.

Aos professores do PPGGBC por todo conhecimento transmitido.

Aos colegas e amigos dos laboratórios de Biologia Molecular e Citogenética, pela convivência agradável, ajuda, carinho, boas risadas, comilanças e por todo o conhecimento transmitido.

Aos colegas da turma 2015, em especial a Sâmela, Renata, Rúbia, Tainá, Alexandre, João Leno pelas inúmeras contribuições nas análises, coletas, dentre outras.

Aos meus amigos conquistados na UESB para toda a vida: Lari, Nino e Leiye.

Aos meus queridos familiares: Antonio, Rose, Vando, Gui, Tarcísio, Willian e Lu por todo amor, apoio e confiança. Vocês são meus tesouros!

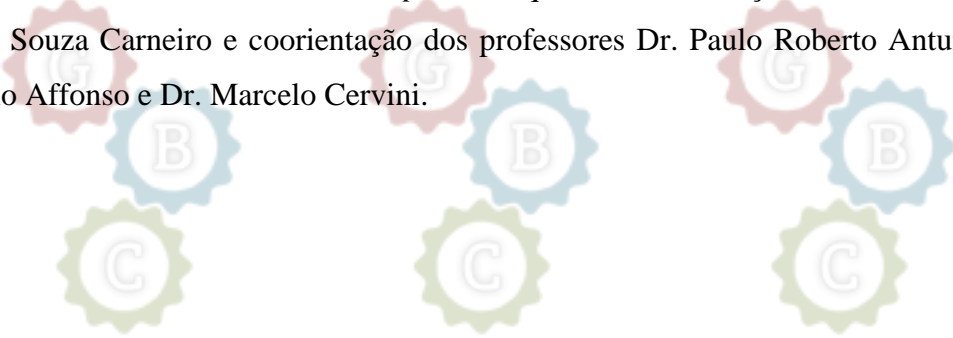
À Wendel, pelo incentivo constante, compreensão e carinho. Obrigada por vivenciar cada momento do mestrado comigo e tornar a minha jornada mais fácil.

Enfim, a todos que me apoiaram e torceram por mim meus sinceros agradecimentos.



BIOGRAFIA

Lisianne de Souza Oliveira, filha de Antonio de Souza Costa e Senhora Benício de Oliveira (*in memoriam*), nasceu em 13 de maio de 1988, na cidade de Jaguaquara, Bahia, Brasil. Em 2010, ingressou no curso de Bacharelado em Ciências Biológicas com ênfase em Genética, da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, *campus* de Jequié. Durante a graduação, foi bolsista de iniciação científica FAPESB (2013-2014) e desenvolveu trabalhos na área de Biologia molecular, sob a orientação da Profa. Dra. Ana Karina de Francisco (UESB). Em dezembro de 2014 concluiu o curso de graduação, no ano seguinte, ingressou no curso de mestrado pelo Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação, da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, *campus* de Jequié sob a orientação do Prof. Dr. Paulo Luiz Souza Carneiro e coorientação dos professores Dr. Paulo Roberto Antunes de Mello Affonso e Dr. Marcelo Cervini.





RESUMO

As bacias hidrográficas brasileiras apresentam ictiofauna bem diversa, sendo verificado alto número de espécies endêmicas. *Lignobrycon myersi* (Miranda Ribeiro, 1956) conhecida popularmente como piaba facão, é uma espécie endêmica dos rios do sul da Bahia e possui poucos dados biológicos. Além disso, tem o status de espécie ameaçada de extinção. Assim, objetivou-se avaliar a diversidade genética em populações de *Lignobrycon myersi*, por meio do marcador nuclear ISSR e mitocondrial D-loop e confirmar a identificação molecular da espécie via gene mitocondrial 16S rRNA. Foram utilizados 79 indivíduos pertencentes às bacias hidrográficas dos rios de Contas, Almada e Cachoeira. As sequências do 16S, pela técnica de DNA *barcode*, mostrou divergência genética intrapopulacional variando de 0 a 0,13% e a interpopulacional de 0 a 0,08%. A árvore consenso evidenciou a formação de três grupos com altos valores de *bootstrap* ($\geq 97\%$). Na análise via ISSR, onze *primers* foram utilizados, apresentando 66,58% de loci polimórficos e diversidade genética média moderada (H_e) de 0,230. A análise de agrupamento mostrou a população de Cachoeira em um grupo a parte. Os genes 16S e D-loop evidenciaram maior diversidade haplotípica e de sítios polimórficos, levando ao mesmo agrupamento do ISSR. Já os níveis de estruturação, foram bem maiores que via ISSR ($F_{ST} = 0,88$), assim como a maior variabilidade entre das populações. Todos os marcadores (ISSR, 16S rRNA e D-loop) revelaram que a população de *L. myersi* do rio Cachoeira deve ser gerenciada separadamente, uma vez que representa uma unidade evolutiva única sob influência de fatores evolutivos distintos. Em vez disso, as populações de Almada e Contas compreendem uma única unidade evolutiva que pode ser gerenciada em conjunto, apesar do seu isolamento geográfico.

Palavras-chave: Piaba facão, marcador molecular, conservação, DNA *barcode*

Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação

Genética, Biodiversidade e Conservação



Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação

Genética, Biodiversidade e Conservação



ABSTRACT

The Brazilian hydrographic basins comprise a very diversified ichthyofauna, with a high number of endemic species. *Lignobrycon myersi* (Miranda Ribeiro, 1956), popularly known as “piaba facão”, is an endemic and poorly known species from rivers in Southern Bahia. Moreover, this species is referred as threatened to extinction. Therefore, the goal of this study was to evaluate the genetic diversity in populations of *Lignobrycon myersi* based on ISSR and D-loop markers as well as to confirm the molecular identification of this species using the 16S rRNA gene. A total of 79 specimens from Contas, Almada, and Cachoeira River basins were analyzed. The 16S sequences (DNA barcode) revealed intraspecific genetic divergence from 0 to 0,13% and interspecific distance from 0 to 0.08%. The consensus tree revealed the formation of three groups with high bootstrap values ($\geq 97\%$). The ISSR based on 11 primers resulted in 66.58% of polymorphic loci and a moderate genetic diversity (H_e) of 0.230. The cluster analysis placed the population from Cachoeira River apart from the others. Both 16S and D-loop indicated higher levels of haplotype diversity and polymorphic sites, resulting in the same groups observed using ISSR. On the other hand, the structuring levels and the interpopulation differences were higher in D-loop markers ($F_{ST} = 0.88$). All markers (ISSR, 16S rRNA, and D-loop) revealed that the population of *L. myersi* from Cachoeira River should be managed separately, once it represents a unique evolutionary unit under influence of distinct evolutionary influences. Instead, the populations from Almada and Contas comprise a single evolutionary unit that can be managed together in spite of their geographic isolation.

Keywords: Piaba facão, molecular markers, conservation, DNA *barcode*


LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Mapa da Região Hidrográfica do Atlântico Leste. Fonte: MMA 2006. 15
- Figura 2.** Exemplar de *Lignobrycon myersi*. Fonte: acervo pessoal de Silvia Brito. 18
- Figura 3.** Imagem de gel de agarose 0,8% revelando o DNA total extraído de amostras de *L. myersi* (presença de bandas nítidas de 1 a 5) e DNA degradado (6 a 12). 24
- Figura 4.** Eletroforese em gel de agarose 1,2% utilizando o primer UBC810 em amostras de *L. myersi* e ladder de 50 pb (L). 28
- Figura 5.** Rede de haplótipos baseada em sequências de 16S rRNA de populações da espécie *L. myersi*. Cada círculo representa um haplótipo e seu tamanho representa sua frequência. As linhas representam as relações entre os haplótipos que diferem em uma mutação e traços nas linhas representam mutações adicionais. As cores representam as localidades. 32
- Figura 6.** Análise de agrupamento via UPGMA, obtida por meio das distâncias genéticas (Nei, 1972) entre as populações de *Lignobrycon myersi* utilizando-se 11 primers ISSR. 35
- Figura 7.** Rede de haplótipos baseada em sequências D-loop de populações da espécie *L. myersi*. Cada círculo representa um haplótipo e seu tamanho representa sua frequência. As linhas representam as relações entre os haplótipos que diferem em uma mutação e traços 37
- Figura 8.** Análise Bayesiana das populações de *L. myersi* com primers ISSR realizada pelo Structure. K1 representa as populações Almada e Cachoeira, K2 a população Lomanto e K3 Porto alegre. 38
- Figura 9.** Análise Bayesiana das populações de *L. myersi* utilizando sequências de D-loop realizada pelo BAPS. K1 representa a população Cachoeira, K2 a população Almada e K3 Lomanto e Porto alegre. 38



LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Caracterização dos pontos de coleta.....	23
Tabela 2. Número de sequências utilizadas par cada marcador por ponto de coleta.....	25
Tabela 3. Características dos primers ISSR utilizados para o estudo de diversidade em <i>Lignobrycon myersi</i>	27
Tabela 4. Distâncias genéticas intrapopulacionais (D) de <i>Lignobrycon myersi</i> a partir do modelo K2P.....	30
Tabela 5. Distâncias genéticas interpopulacionais de <i>Lignobrycon myersi</i> a partir do modelo K2P.....	30
Tabela 6. Distância genética das sequências de 16S entre gêneros com base no modelo K2P.....	30
Tabela 7. Diversidade genética em populações <i>Lignobrycon myersi</i> por meio de 11 primers ISSR.....	33
Tabela 8. Análise de variância molecular (AMOVA) e índice de fixação valores (F_{ST}) obtidos a partir de 11 primers ISSR em populações de <i>Lignobrycon myersi</i>	34
Tabela 9. Estimativas de identidade (diagonal inferior) e distância genética de Nei (1972) (diagonal superior), entre as populações da espécie <i>Lignobrycon myersi</i>	34
Tabela 10. Estatísticas populacionais de <i>Lignobrycon myersi</i> . N=número de indivíduos; P=sítios polimórficos; Nh= número de haplótipos; Hd=diversidade haplotípica; π = diversidade nucleotídica.....	37





LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

AMOVA – Análise de variância molecular

F_{ST} - Índice de fixação populacional

BAPS - Bayesian Analysis of Population Structure

H_E - Heterozigidade esperada

GenBank – *Genoma Bank*

BHRA- Bacia Hidrográfica do rio Almada

ISSR- *Inter Simple Sequence Reaction*

BHRC- bacia hidrográfica do rio Cachoeira

K2P- Kimura dois parâmetros

BLAST - *Basic Alignment Search Tool*

ML – Máxima verossimilhança

CHESF- Companhia Hidroelétrica do São Francisco

$MgCl_2$ - Cloreto de magnésio

COI- Citocromo C Oxidase subunidade I

mtDNA- DNA Mitocondrial

D- loop - *Displacement-loop*

NJ- *Neighbor Joining*

PAST - *PALaeontological STATistics*

DNA- Ácido Desoxirribonucleico

PCR - Reação em Cadeia da Polimerase

DNASP - DNA Sequence Polymorphism

UBC -University of British Columbia

dNTP- desoxirribonucleotídeo trifosfatado

UPGMA- *Unweighted Pair Group Method with Arithmetical Average*

EDTA- Ácido etilendiamino tetraacético

SPAR - *Single Primer Amplification Reaction*



SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
2. REVISÃO DE LITERATURA	15
2.1- Caracterização da área de estudo.....	15
2.2 <i>Lignobrycon myersi</i> : uma espécie ameaçada.....	17
2.3 Marcadores moleculares.....	19
3. OBJETIVOS	22
3.1 Objetivo Geral	22
3.2 Objetivos Específicos.....	22
4. METODOLOGIA	23
4.1 Áreas de estudo e coletas	23
4.2 Extrações de DNA.....	23
.....	24
4.3 Análises Moleculares.....	24
4.3.1 16S rRNA e D-loop.....	24
4.3.1 ISSR	26
5. REULTADOS e DISCUSSÃO	29
5.1 16S rRNA.....	29
5.2 ISSR e D-loop	33
5.3 Considerações gerais.....	39
6.CONCLUSÕES	41
7. REFERÊNCIAS	42

1. INTRODUÇÃO

As bacias hidrográficas do Atlântico Leste, incluindo a bacia hidrográfica do rio Almada, rio de Contas e rio Cachoeira apresentam elevada biodiversidade e ictiofauna bem diversa, compostas por várias espécies de pequeno a médio porte e caracterizadas por um elevado grau de endemismo, no entanto, estudos apontam alto grau de degradação de algumas dessas bacias hidrográficas por conta de ações humanas.

Os principais motivos que contribuem para a situação de ameaçada da piaba facão advêm de ações antrópicas como, poluição do ambiente aquático, introdução de espécies exóticas, assim como a pesca para comercialização sob a forma de petisco. Sendo assim, estudos genéticos, visando acessar a diversidade e a estrutura genética desta espécie, são fundamentais para as ações de manejo e conservação.

Estudos apontam o status de ameaçada de *Lignobrycon myersi*, espécie com distribuição geográfica restrita e endêmica dos rios do Sul da Bahia. É conhecida popularmente por piaba facão, caracídeo de pequeno porte com a região ventral do corpo bem peculiar em formato de quilha. Esta espécie pertence à ordem Characiformes e família Characidae, bem representativa em número de espécies na ordem citada. Esses peixes possuem hábitos alimentares variados. Podem ser herbívoros, carnívoros, onívoros e exploram uma variedade de habitats.

Atualmente, os marcadores nucleares e mitocondriais são bastante utilizados para estudos de conservação, filogenéticos, estudos de diversidade genética, identificação de espécies, dentre outras finalidades.

Assumindo a importância de identificar e conhecer a diversidade de espécies, como passo inicial para o desenvolvimento de estudos mais elaborados, objetivou-se confirmar a identificação molecular, estimar a diversidade genética e analisar a ocorrência de estruturação populacional nos grupos, utilizando para tal finalidade o gene 16S rRNA, o marcador mitocondrial D-loop e nuclear ISSR.

A utilização combinada de duas ou mais classes de marcadores moleculares permite comparar a eficiência das técnicas, bem como minimizar as limitações existentes. Dessa forma, as informações obtidas nesse trabalho darão suporte para o desenvolvimento de medidas apropriadas de manejo e conservação da espécie e de forma adicional os dados poderão contribuir para o desenvolvimento de pesquisas subsequentes.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1- Caracterização da área de estudo

A elevada diversidade de peixes dulcícolas do Brasil está relacionada à presença de grandes sistemas hidrográficos, como a Bacia Hidrográfica do Atlântico Leste (Figura 1). A bacia hidrográfica do rio de Contas, juntamente com os rios Itapicuru, Paraguaçu, Pardo, Vaza Barris e Jequitinhonha, compõem o conjunto de bacias do Atlântico Leste localizado no estado da Bahia. Entre os rios integrantes da bacia Atlântico Leste, o principal deles é o rio de Contas, o qual nasce na Chapada Diamantina e desagua no Oceano Atlântico na cidade de Itacaré, litoral da Bahia. Sua área de drenagem ultrapassa 55. 000 km² com 75% de inserção no bioma Caatinga (Severi *et al.*, 2010).

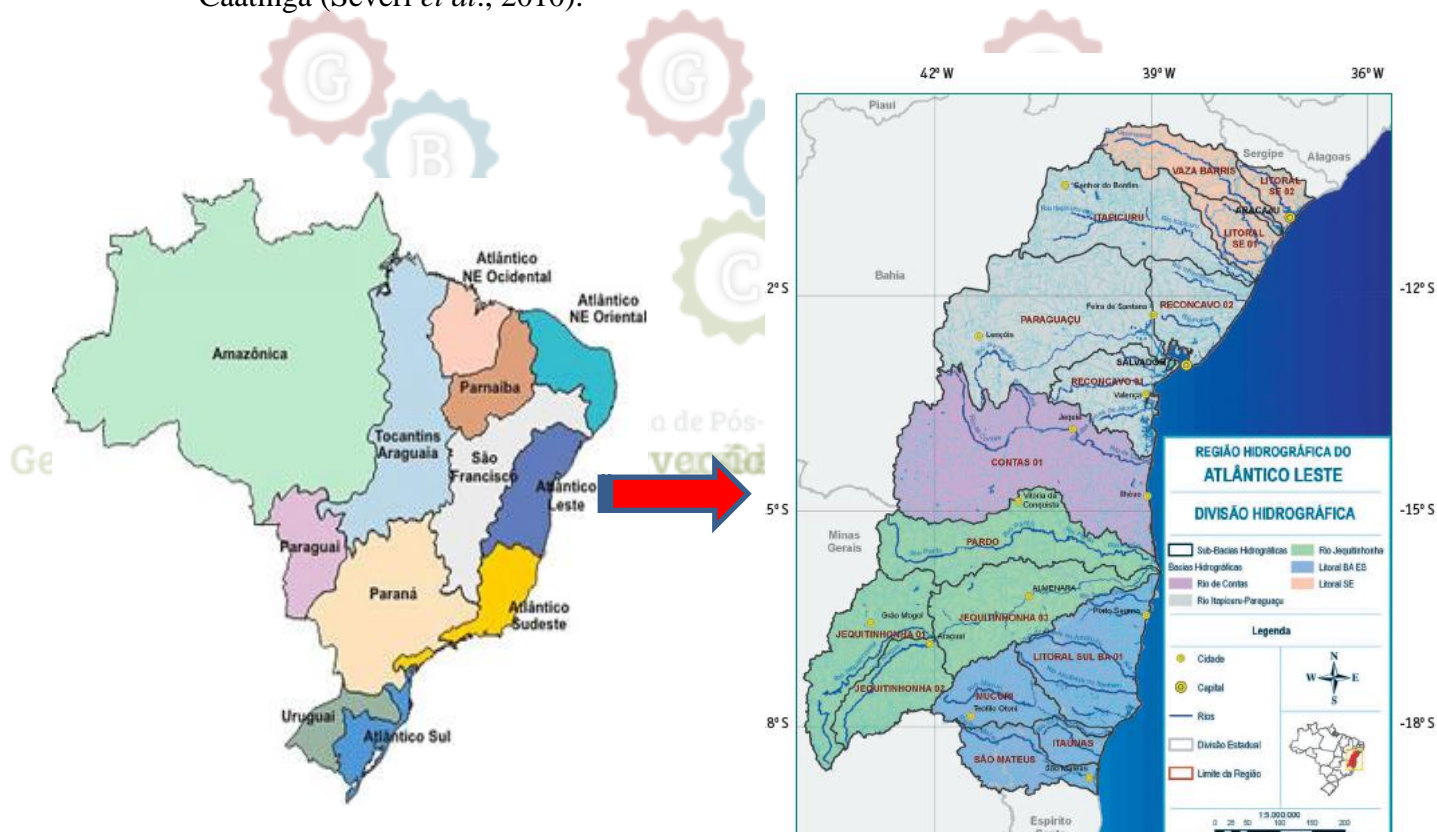


Figura 1. Mapa da Região Hidrográfica do Atlântico Leste. Fonte: MMA 2006.

A bacia do rio de Contas apresenta regiões classificadas em Alto, Médio e Baixo Contas, com características bem distintas e predomínio dos biomas Caatinga, Mata Atlântica e Mangue, respectivamente. Nos trechos superior e médio o clima semiárido prevalece, caracterizado por baixa precipitação anual. À medida que se

aproxima a região litorânea no Baixo Contas, o clima fica mais ameno passando do Subúmido para o Úmido com incidência de maior precipitação. No Médio Contas se localizam os reservatórios Funil e da Barragem de Pedras, este último situado a montante da cidade de Jequié, tendo como finalidade inicial o controle das cheias, sendo posteriormente operado pela Companhia Hidroelétrica do São Francisco (CHESF), para geração de energia. (MMA, 2006; Santos *et al.*, 2014; INEMA, 2017)

Outra importante bacia hidrográfica é a do rio Almada (BHRA), que tem o rio principal que nomeia a bacia. Localizada no Sul do Estado da Bahia, a BHRA tem extensão de 138 km desde a nascente na Serra do Chuchu, município de Almadina, até a foz, no município de Ilhéus, sendo uma bacia marginal que abrange uma área de 1.575 km². Em sua extensão são verificados três domínios climáticos: tropical úmido, clima de monção e tropical com estação seca. O bioma Mata Atlântica predomina nessa bacia, além de restingas e manguezais. A BHRA está limitada ao norte e a oeste com a Bacia do rio de Contas, ao sul com a Bacia do rio Cachoeira e a leste com o Oceano Atlântico (Farias-Filho, 2003; Franco *et al.*, 2011).

Nos entornos da BHRA verificam-se alguns conflitos ambientais, tais como: falta de saneamento básico em cidades e povoados ribeirinhos, a formação de pastagem, a erosão costeira e a pressão das atividades turísticas. No entanto, o total de áreas antropizadas corresponde a aproximadamente 24% da área total da BHRA, enquanto que o somatório das áreas de floresta, cabruca, gramíneas e áreas de manguezais somam 73,7% (Gomes *et al.*, 2012).

Por sua vez, a bacia hidrográfica do rio Cachoeira (BHRC) está situada no sudoeste da Bahia originando-se nas nascentes do rio Colônia. Este rio, após extensão de cerca de 100 km, passando pelos municípios de Itororó, Itapetinga e Itaju do Colônia encontra-se com o rio Salgado no município de Itapé e recebe a nomenclatura de rio Cachoeira (Nacif *et al.*, 2003). Está limitada ao norte pelas bacias dos rios de Contas e Almada; ao sul pelas bacias dos rios Pardo e Una; a oeste pela bacia do rio Pardo e a leste pelo Oceano Atlântico. Ao longo da bacia, o rio Cachoeira possui um forte declínio, com isso o encontro das águas no trecho final das planícies é responsável pelas intensas inundações nas cidades de Ilhéus e Itabuna (MMA, 2006).

O padrão do relevo na BHRC é diversificado, com presença de serra, depressão, planície e a precipitação pluviométrica é bem variável com valores máximos que chegam a 2.000 mm e mínimos de 800 mm anuais. Essa bacia agrupa

os principais municípios da região Sul da Bahia (Itabuna e Ilhéus) e devido as suas características naturais representa um sistema agroecológico (Nacif *et al.*, 2003). De fato, a bacia do Rio Cachoeira é submetida a maior pressão urbana, agrícola, pecuária e o predomínio de pastagens em substituição à vegetação original contribuem para a situação de impactada da BHRC (De Paula *et al.*, 2012).

Estudos demonstram que as drenagens costeiras do leste do Brasil representam regiões de interesse devido ao seu elevado nível de endemismo e ictiofauna diversa (Cetra *et al.*, 2010; Vari *et al.*, 2010; Zanata & Camalier, 2014). Algumas espécies são consideradas endêmicas da bacia do rio de Contas ou de distribuição restrita a bacia do Atlântico leste, destacando-se as espécies: *Lignobrycon myersi*, *Hemipsilichthys bahianus*, *Apareiodon itapicuruenis* e *Parotocinclus jimi* (Severi *et al.*, 2010). A degradação ambiental gerada em consequência das atividades antrópicas representa um grande risco à perda da biodiversidade ictiofaunística da região, pois as alterações ambientais produzidas levam a destruição de habitats e ao desaparecimento das espécies (Cetra *et al.*, 2010).

2.2 *Lignobrycon myersi*: uma espécie ameaçada

A ordem Characiformes é considerada a mais numerosa e diversa da região neotropical, contém pelo menos 24 famílias, cerca de 2300 espécies incluídas em 520 gêneros (Nelson *et al.*, 2016). Entre as famílias destacam-se: Distichodontidae, Citharinidae, Parodontidae, Curimatidae, Prochilodontidae, Anostomidae, Chilodontidae, Crenuchidae, Hemiodontidae, Alestiidae, Gasteropelecidae, Acestrorhynchidae, Erythrinidae, Lebiasinidae, Ctenolucidae, Hepsetidae e Characidae (Reis *et al.*, 2003).

A família Characidae engloba a maior parte dos peixes brasileiros dulcícolas. Ela é representada por cerca de 1.300 espécies e constitui um componente importante dos ecossistemas de água doce neotropical (Nelson *et al.*, 2016). Entre as espécies dulcícolas pertencentes à família Characidae encontra-se *Lignobrycon myersi* (MIRANDA RIBEIRO, 1956).

Segundo Malabarba (1998), acredita-se que *Lignobrycon myersi* (Figura 2) é grupo-irmão de todas as espécies de “sardinhas” do gênero *Triportheus*. Conhecida popularmente como piaba-facão, faca ou canivete, *L. myersi* é uma espécie endêmica do estado da Bahia com poucos dados biológicos. Esse Characiforme de pequeno

porte possui a região anterior e ventral do corpo em formato de quilha, origem de seus nomes populares (Castro & Vari, 1990).

A ocorrência da piaba-facão foi relatada inicialmente apenas na bacia hidrográfica do rio Almada. Logo após a espécie foi encontrada na bacia do rio de Contas e, recentemente, alguns espécimes foram coletados na bacia do rio Cachoeira (Castro & Vari, 1990; Castro & Jucá-Chagas, 2008; Camelier & Zanata, 2014). A destruição de habitats, introdução de espécies exóticas, poluição e a comercialização como um aperitivo local junto com outros characídeos morfologicamente semelhantes, contribuíram para inclusão da piaba facão na Lista da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção, na categoria vulnerável (Machado *et al.*, 2005).

A remoção de grande parte da vegetação, assim como a introdução da espécie *Astronotus cf. ocellatus* na bacia do rio Almada foram fatores que podem ter exercido ações bem deletérias para as populações da piaba-facão nesta bacia hidrográfica (Castro & Jucá-Chagas, 2008). De forma adicional, espécies introduzidas no reservatório da Barragem de Pedra, tais como *Plagioscion squamosissimus*, *Prochilodus costatus* e *Astronotus ocellatus* provocaram impacto na composição e abundância da ictiofauna local (Conceição *et al.*, 2006).



Figura 2. Exemplar de *Lignobrycon myersi*. Fonte: acervo pessoal de Silvia Brito.

Estudos genéticos com *L. myersi* são reduzidos, sendo que as primeiras informações genéticas disponíveis para a espécie foram obtidas por Oliveira *et al.* (2011) em estudo investigativo sobre as relações filogenéticas na família Characidae.

Logo após, Rodrigues *et al.* (2016) realizaram a identificação molecular da piaba facão por meio do gene Citocromo C Oxidase Subunidade I (COI).

2.3 Marcadores moleculares

O avanço na biologia molecular junto ao surgimento da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e utilização de diversos tipos de marcadores aumentou a eficiência de detecção de polimorfismos proporcionando redução no tempo, custo e execução dos experimentos (Matolli & Passos-Bueno, 2012). Entre os marcadores moleculares disponíveis para avaliar a diversidade populacional, os marcadores ISSR (*Inter Simple Sequence Repeats*) não necessitam de informação inicial do genoma do organismo em estudo. Além disso, trata-se de uma técnica com pequenos custos e reproduzível quando comparada com outros marcadores dominantes (Liu & Wendel, 2001). Essa técnica também conhecida como SPAR (*Single Primer Amplification Reaction*), foi proposta em 1994 por Gupta *et al.* e consiste na utilização de único *primer* com repetições de di ou trinucleotídeos (Matolli & Passos-Bueno, 2012). O marcador ISSR se mostrou informativo em estudos com vários organismos, tais como plantas (Simplicio *et al.*, 2015), caprinos e ovinos (Askari *et al.*, 2011), peixes (Casu *et al.*, 2009 ; Saad *et al.*, 2012), entre outros. Em 2008, Pamponet *et al.* utilizaram uma múltipla abordagem (dados morfológicos, cariotípicos e moleculares) para obter informações sobre a diversidade genética em populações de *Astyanax aff. Bimaculatus*. Os dados moleculares, com o marcador ISSR, revelaram estruturação populacional e maior nível de divergência entre as populações da bacia do rio Contas do que entre as bacias Contas e Recôncavo Sul.

Assim como os marcadores nucleares, os marcadores mitocondriais apresentam características peculiares, as quais têm despertado o interesse dos pesquisadores para usá-los em estudos envolvendo estrutura populacional, relações filogenéticas, em resoluções de incertezas taxonômicas, aspectos biológicos e evolutivos de vários organismos. O DNA mitocondrial (mtDNA) apresenta, entre outras, as vantagens de ser pequeno, possuir maior taxa evolutiva (alta taxa de substituição de nucleotídeos), estar presente em muitas cópias por célula quando comparado ao DNA nuclear, além de possuir organização gênica bem conservada em alguns grupos taxonômicos distintos, como anfíbios, peixes ósseos e cartilagosos, mamíferos e outros vertebrados. (Arias *et al.*, 2003; Yang *et al.*, 2014). Entre os marcadores que podem

ser utilizados nas abordagens citadas estão os genes mitocondriais Citocromo C Oxidase Subunidade I (COI), 16S rRNA, Citocromo B (CityB) e a região controle (D-loop).

Além dos 37 genes que compõem a molécula de mtDNA, existe uma região não codificadora que em vertebrados e equinodermos é conhecida como D-loop (*Displacement-loop*) e em invertebrados é destacada como uma região rica adenina e timina (AT). Essa região apresenta função regulatória, pois contém o controle da replicação e transcrição do genoma e acredita-se que pode ocorrer até 10 vezes mais mutações em suas sequências do que nas sequências do DNA nuclear, por isso conhecida também como região hipervariável (Avice, 1994). Tem-se utilizado com sucesso a região controle (D-loop) para estudos populacionais em peixes. Iervolino *et al.* (2010), em estudo de variabilidade genética com a espécie *Piaractus mesopotamicus*, observaram 27 haplótipos diferentes, além de alta diversidade nucleotídica e haplotípica em todos locais amostrados. Em contrapartida, Camargo *et al.* (2016) com *Carcharhinus longimanus*, espécie de tubarão ameaçada de extinção, verificaram que a variabilidade genética encontrada estava abaixo da média para outros tubarões, ainda que esse animal seja considerado altamente migrador levando a moderada estruturação populacional.

O gene COI foi proposto Herbert *et al.* (2003) como um marcador padrão de identificação molecular e tem sido bem eficiente em alguns estudos, a exemplo do trabalho de identificação molecular de *Lignobrycon myersi* realizado por Rodrigues *et al.* (2016). Nesse trabalho, foram utilizados indivíduos provenientes do rio de Contas, Almada e Cachoeira. Outras espécies de peixes foram incluídas para testar a eficiência de identificação molecular, obtendo-se sequências de COI de boa qualidade e eficazes para discriminar amostras de *L. myersi*. Além disso, as análises realizadas sugeriram que as populações das bacias dos rios de Contas e Almada compreendem uma única linhagem evolutiva e os espécimes do rio Cachoeira eram geneticamente diferenciados. No entanto, para alguns grupos a exemplo os anfíbios, em que o gene COI varia muito, é necessário o uso de marcadores alternativos e mais conservados, como 16S rRNA (Vences *et al.*, 2005). Os genes 16S rRNA e 12S rRNA fazem parte da maior subunidade ribossomal do mtDNA, estando entre os mais conservados.

Outros genes mitocondriais, a exemplo do Cityb, 18S rRNA e 16S rRNA tem sido utilizados para os estudos filogenéticos e de identificação molecular em peixes,

atuando dessa maneira como complementares ao COI (Maretto *et al.*, 2007; Zhang & Hanner, 2012; Sarri *et al.*, 2014). O gene 16S rRNA foi bem resolutivo em estudos filogenéticos (Hilsdorf *et al.*, 2008; Liang *et al.*, 2012; Santos *et al.*, 2013) e de identificação de espécies (Yang *et al.*, 2014). Zhang & Hanner, (2012) utilizaram o DNA barcode para identificação de espécies em peixes marinhos da China, observando que o gene 16S rRNA, 18S rRNA e citocromo b (cytb) foram eficazes e complementares ao COI. Em 2014, Sarri *et al.* utilizaram iniciadores universais de 16S e obtiveram sucesso na identificação de mamíferos, peixes, aves, répteis e outros grupos de animais.



3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar a diversidade genética em populações da piaba-facão *Lignobrycon myersi*, a fim de contribuir com informações para conservação da espécie.

3.2 Objetivos Específicos

- Testar a eficiência do gene mitocondrial 16S rRNA na identificação molecular e estimar a diversidade genética de espécimes de *L. myersi*.
- Determinar os níveis de diversidade e diferenciação genética em populações de *Lignobrycon myersi* nas bacias do rio de Contas, Almada e Cachoeira a partir de marcadores ISSR;
- Amplificar fragmentos da região controle do genoma mitocondrial (D-loop) e estimar a diversidade genética nas populações de *L. myersi* estudadas;

4. METODOLOGIA

4.1 Áreas de estudo e coletas

Os exemplares foram coletados em três bacias englobando cinco localidades (Tabela 1).

Tabela 1. Caracterização dos pontos de coleta.

Bacias	Local de coleta	Sigla	N	Latitude	Longitude
Contas	Prainha do Lomanto	LOM	50	-13.8575	-40.0836
Contas	Porto Alegre	PAL	12	-13.4411	-40.4308
Almada	Rio do Braço	ALM	15	-14.6758	-39.2641
Cachoeira	Rio Salgado	CCH	02	-14.8600	-39.5202
Cachoeira	Rio Cachoeira	CCH	04	---	---

N= número de amostras

O número total de indivíduos da espécie *Lignobrycon myersi* utilizado nesse trabalho foi 83. Do total, 15 pertencendo à localidade do rio do Braço, 62 coletados nos pontos do rio de Contas da Pedra e seis coletados no rio Cachoeira. A quantidade reduzida de espécimes para o estudo em alguns pontos de coleta está relacionada ao status de espécie endêmica e listada no Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção, assim como a dificuldade na captura dos espécimes.

4.2 Extrações de DNA

A extração do DNA genômico foi realizada a partir de fragmentos do músculo dos espécimes, usando o kit Wizard® *Genomic DNA purification* (Promega) conforme instruções do fabricante. A avaliação da integridade do DNA extraído ocorreu por meio de eletroforese em gel de agarose 0,8% (Figura 3). As amostras foram coradas com azul de bromofenol e GelRed (*Biotium*) e visualizadas sob a incidência de raios UV, utilizando sistema de fotodocumentação *L-PIX EX* (*Loccus Biotecnologia*).

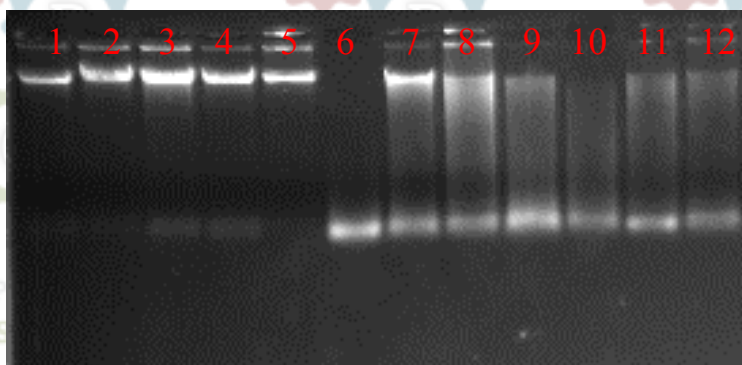


Figura 3. Imagem de gel de agarose 0,8% revelando o DNA total extraído de amostras de *L. myersi* (presença de bandas nítidas de 1 a 5) e DNA degradado (6 a 12).

4.3 Análises Moleculares

4.3.1 16S rRNA e D-loop

Os fragmentos da região controle do mtDNA (D-loop) e do gene 16S rRNA foram amplificados por PCR, utilizando os seguintes pares de *primers*:

1-D-LOOP: **H3010** (5' - CTTCAGTGTTATGCTTTATTTAAGCTAC - 3') + **L2910** (5' - CTA ACTCCCAAAGCTAGTATTC - 3') (Iervolino *et al.*, 2010).

2-16S: **L1987**(5' - GCCTCGCCTGTTTACCAAAAAC- 3') + **H2609** (5' - CCGGTCTGAACTCAGATCACG - 3') (Palumbi, 1996).

O quadro abaixo ilustra as condições, assim como as quantidades e os reagentes utilizados nas reações de PCR para os genes 16S e D-loop.

Reagentes	V (μL)	CI	Programa de amplificação
Buffer	1,5	10 x	Ciclo inicial de 95 °C por 5 minutos, 30 ciclos com desnaturação a 94°C por 40 segundos, anelamento do <i>primer</i> à temperatura específica por 40 segundos, extensão a 72°C por 1 minuto e 30 segundos e extensão final a 72°C por 7 minutos.
dNTP	2,4	1,25 mM	
<i>Primers</i>	0,6	10 pmol	
H ₂ O <i>milli-Q</i>	8,2	*	
<i>Taq</i> polimerase	0,12	5U	
MgCl ₂	0,6	50 mM	
DNA	1,0	50 ng	

V (μL) = volume; CI = concentração inicial do reagente.

Após a amplificação, as amostras foram coradas com azul de bromofenol, GelRed e submetidas a eletroforese em gel de agarose 1,0%. Os fragmentos foram visualizados sob a incidência de raios UV e fotodocumentados utilizando sistema de fotodocumentação *L-PIX EX (Loccus Biotecnologia)*.

Os produtos das PCR foram purificados para subsequente sequenciamento da região de interesse. Esse processo foi realizado utilizando polietileno-glicol (PEG), seguido de uma lavagem com etanol 80%. Posteriormente as amostras foram submetidas às reações de sequenciamento nas quais utilizou-se o método dideoxinucleotídeos terminais (Sanger *et al.*, 1977), com reagentes do Kit *Big Dye Terminator v 3.1 Cycle Sequencing (Applied Biosystems/Life Technologies)*, de acordo com as orientações do fabricante. A leitura das amostras foi realizada em sequenciador automático ABI 3500 (*Applied Biosystems/Life Technologies*).

As sequências *forward* e *reverse* obtidas foram editadas e alinhadas com o auxílio do software *BioEdit Sequence Alignment Editor* (Hall, 1999) e os contigs foram montados utilizando o programa *DNA Baser Sequence Assembler v.4.16* e a seguir alinhados com o programa *ClustalW*, implementado no *BioEdit*. A comparação e confirmação das regiões sequenciadas foram verificadas no NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) através do BLAST (*Basic Alignment Search Tool*). O número de sequências utilizadas para cada marcador está discriminado na Tabela 2.

Tabela 2. Número de sequências utilizadas par cada marcador por ponto de coleta

Bacias	Local de coleta	Sigla	D-LOOP N	16S N
Contas	Prainha do Lomanto	LOM	11	50
Contas	Porto Alegre	PAL	01	12
Almada	Rio do Braço	ALM	07	15
Cachoeira	Rio Salgado	CCH	02	02
Cachoeira	Rio Cachoeira	CCH	04	04

Os níveis de diversidade intra e interespecífica, assim como a construção da árvore segundo o algoritmo de agrupamento *Neighbor Joining* (NJ), conforme o modelo de substituição nucleotídica Kimura-2-parâmetros, K2P (Kimura, 1980) com 1000 réplicas de *bootstrap* foram realizados no software *Mega v 6.0* (Tamura *et al.*,

2013). Como grupos externos, foram incluídas sequências de *Astyanax fasciatus* (1268, 1269 - Mutum-BA; 1413 - Contas-BA) e três espécies do gênero *Triportheus* obtidas do GenBank (*T. angulatus* - AY788082; *T. pantanensis* - GQ368200; *T. orinocensis* - HQ171253).

A plataforma Cipres foi utilizada para obtenção das árvores baseadas na Máxima Verossimilhança e Inferência Bayesiana (BI) através do RaxML-HPC BlackBox e MrBayes on XSEDE respectivamente. O modelo evolutivo TIM2+G foi selecionado por meio do programa jModelTest v 3.7 (Posada, 2008), segundo o critério de informação de seleção de BIC (Critério Bayesiano de Schwarz) para análise por Inferência Bayesiana. As árvores obtidas foram visualizadas e editadas no FigTree v. 1.4.2.

Os índices de diversidades haplotípicas (h) e nucleotídicas (π) foram calculados no programa Dnasp v 5.10 (Rozas *et al.*, 2003) e no Arlequin (Excoffier *et al.*, 2007) foi realizada a AMOVA. Essa análise fornece o valor do índice de fixação, o qual é utilizado para verificar o nível de diferenciação genética interpopulacional. Segundo os critérios propostos por Wright (1978), os valores de divergência podem ser classificados em: baixa (entre 0,00 e 0,05); moderada (0,05 e 0,15); alta (0,15 e 0,25); maior que 0,25, muito alta. A significância do teste foi verificada pelo método de permutação aleatória com 1.000 permutações. O software Bayesian Analysis of Population Structure (BAPS) foi utilizado para análise de estrutura populacional, o qual determina o número provável de populações (K).

O programa *Population Analysis with Reticulate Trees* (Leigh & Bryant, 2015), foi utilizado para obter as redes de haplótipos.

4.3.1 ISSR

Inicialmente foram testados 23 *primers* ISSR da série UBC (*University of British Columbia*) dos quais 11 foram usados por apresentarem bandas polimórficas, reproduzíveis e de boa resolução (Tabela 3). O número total de indivíduos utilizados nessa análise foi 47, sendo 15 pertencentes a população Almada, 6 da população Cachoeira, 15 da população Lomanto e 11 da população Porto Alegre.

Tabela 3. Características dos *primers* ISSR utilizados para o estudo de diversidade em *Lignobrycon myersi*.

Primer	Sequência	N	Ta(°C)
UBC810	GAGAGAGAGAGAGAGAT	9	53
UBC811	GAGAGAGAGAGAGAGAC	7	53
UBC812	GAGAGAGAGAGAGAGAA	12	52
UBC823	TCTCTCTCTCTCTCC	7	53
UBC825	ACACACACACACACT	11	53
UBC835	AGAGAGAGAGAGAGA GYC	14	53
UBC841	GAGAGAGAGAGAGAGAYC	9	53
UBC843	CTCTCTCTCTCTCTRA	7	55
UBC859	TGTGTGTGTGTGTGRC	8	54
UBC864	ATGATGATGATGATGATG	6	52
UBC884	HBHAGAGAGAGAGAGAG	10	54

N= número de *loci* obtido para cada *primer*; Ta (°C) = temperatura de anelamento do *primer*; R= (A ou G) e Y = (C ou T).

As reações de PCR-ISSR foram submetidas ao termociclador *Veriti® 96 Thermal Cycler (Applied Biosystems)*, para uma reação com volume final de 25 µL contendo: 1,0 µL de cada primer a 20 µM; 2,5 µL de Buffer a 10x; 2,0 µL de dNTP a 2,5mM; 2 µL de MgCl₂ a 50mM; 16,4 µL de água *milli-Q*; 0,12 µL de Taq polimerase a 5U e por fim 1 µL do DNA genômico extraído. O programa de amplificação foi composto por ciclo inicial de 94 °C por três minutos, 40 ciclos com desnaturação a 92°C por 60 segundos, anelamento do *primer* por dois minutos sob temperatura específica para cada loco, extensão a 72°C por dois minutos e extensão final a 72°C por sete minutos.

Após a amplificação, as amostras foram coradas com GelRed® e submetidas a eletroforese em gel de agarose a 1,2% em tampão TBE 1x , 110 V por quatro horas (Figura 4) . O marcador de peso molecular de 1000 pb foi utilizado para determinar o tamanho dos fragmentos de *ISSR*, que foram visualizados sob a incidência de raios UV e fotodocumentados utilizando sistema de fotodocumentação *L-PIX EX (Loccus Biotecnologia)*.

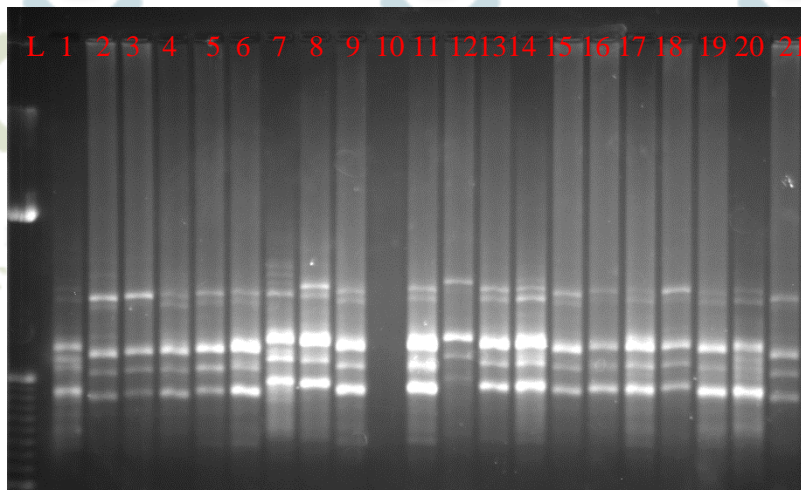


Figura 4. Eletroforese em gel de agarose 1,2% utilizando o primer UBC810 em amostras de *L. myersi* e ladder de 50 pb (L).

Foi construída uma matriz de dados binários a partir da observação das imagens dos géis de ISSR, em que avaliado o padrão de bandas gerado atribuiu-se os valores 1 e 2 para a presença e ausência do fragmento, respectivamente. A análise de variância molecular (AMOVA), que permite avaliar o percentual de variação genética intra e interpopulacionais, o percentual de loci polimórficos, a heterozigosidade esperada (H_E), foram obtidos por meio do software GenAlEx. As distâncias genéticas entre as populações foram calculadas de acordo com estatística de Nei (1972).

Com o auxílio do software Structure 2.3 (Falush *et al.* 2007) executou-se o modelo de agrupamento Bayesiano ajustando o número de populações K para variar de 1 a 4, com 10 interações independentes para cada. Foram usados Burn-in e MCMC (*Markov Chain Monte Carlo*) de 10^6 e 10^5 interações respectivamente. Após ajustes do programa para marcadores dominantes, determinou-se o modelo com mistura, e assumiu-se que as frequências alélicas são correlacionadas entre as populações. Os resultados obtidos do Structure foram analisados via Structure Harvester Web v. 0.6.9 de acordo com os parâmetros de Evanno *et al.* (2005) para determinar o provável número de grupos.

Foram realizadas análises de agrupamento via UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetical Average*) com 1000 permutações no programa PAST v. 2.16 (Hammer *et al.*, 2001).

O teste de Mantel foi aplicado para determinar a relação entre distância genética e distância geográfica, para tal utilizou-se o programa Isolation By Distance Web Service v. 3.23 (Jensen *et al.*, 2005) com 10.000 permutações.

5. RESULTADOS e DISCUSSÃO

5.1 16S rRNA

Foram geradas 83 sequências de 16S rRNA com 503 pb. O número de espécimes por localidade variou de seis a 46. Para a construção da árvore de *Neighbor-Joining*, Máxima Verossimilhança e Inferência Bayesiana foram adicionadas seis sequências, três de *Astyanax fasciatus* e três de espécies do gênero *Triportheus*. Perfazendo um total de 89 sequências e apresentou cinco sítios variáveis.

A divergência genética intrapopulacional variou de 0 a 0,13% (Tabela 4) com maior valor para população Cachoeira (0,13%) e a divergência interpopulacional variou de 0 a 0,4% (Tabela 5). A distância intraespecífica variou de 0 (*Astyanax*) a 0,08% (*L. myersi*). Esses valores corroboram com os resultados encontrados por Rodrigues *et al.* (2016), em estudo de identificação molecular de *Lignobrycon myersi*, utilizando o gene Citocromo C Oxidase Subunidade I (COI), em que os valores da distância interpopulacional foram próximos (0,5 a 1,3%). A distância interespecífica variou de 4,9% (*T. angulatus* e *T. nematurus*) a 24,6% (*A. fasciatus* e *T. guentheri*). Entretanto, a divergência intraespecífica chegou a valores maiores 0 (*T. nematurus*), até 0,5% (*A. fasciatus*), provavelmente em função do número de espécies utilizadas como grupo externo.

O gene Citocromo C Oxidase Subunidade I (COI) e os valores encontrados com o 16S rRNA foram eficientes na identificação de *Lignobrycon myersi*, dado a grande diversidade interespecífica em relação a intraespecífica. Para a identificação de espécies com o gene COI, considera-se que os valores mínimos de divergência entre as espécies deva ser, ao menos, 10 vezes maior do que a variação intraespecífica. Vários estudos mostram a eficiência do gene 16S na identificação molecular de várias espécies (Zhang *et al.*, 2012; Sarri *et al.*, 2014 e Yang *et al.*, 2014). Quraishia *et al.* (2015), utilizaram sequências dos genes 16S e 12S para

identificação molecular de peixes marinhos na Malásia, mostrando que no mesmo gênero, algumas espécies apresentaram-se mais distantes geneticamente.

Tabela 4. Distâncias genéticas intrapopulacionais (D) de *Lignobrycon myersi* a partir do modelo K2P.

Populações	D
Cachoeira	0,0013
Almada	0,0011
Lomanto	0,0001
Porto Alegre	0,0000

Tabela 5. Distâncias genéticas interpopulacionais de *Lignobrycon myersi* a partir do modelo K2P.

	CCH	ALM	LOM	PAL
CCH	-----			
ALM	0,004	-----		
LOM	0,003	0,001	-----	
PAL	0,003	0,001	0,000	-----

A distância genética entre gêneros variou de 9,1% a 15,1%, com valor máximo de divergência entre *Astyanax* e *Triportheus* (Tabela 6). Esse resultado pode estar relacionado com a remoção do gênero *Triportheus* da família Characidae, sendo alocado na família (Triportheidae), segundo análises filogenéticas de Oliveira *et al.* (2011). Esse estudo filogenético realizado a partir de sequências de dois genes mitocondriais e três nucleares também propõe que os gêneros *Agoniates*, *Clupeacharax*, *Engraulisoma* e *Lignobrycon* pertençam à família Triportheidae.

Tabela 6. Distância genética das sequências de 16S entre gêneros com base no modelo K2P.

Gênero	1	2
(1) <i>Lignobrycon</i> n= 83	-----	
(2) <i>Astyanax</i> n=3	0,139	-----
(3) <i>Triportheus</i> n=3	0,091	0,151
Média	0,127	

A árvore consenso baseada nas análises por Máxima Verossimilhança (ML), Inferência Bayesiana (IB) e *Neighbor-Joining* (NJ) com 1000 réplicas de *bootstrap*, gerou três grupos com altos valores de suporte: *Lignobrycon* (100%), *Triportheus* (97%) e *Astyanax* (100%). Além disso, a análise 16S rRNA permitiu separar o grupo composto pela população de *L. myersi* do rio Cachoeira (93% de bootstrap; probabilidade *a posteriori* = 0,74) (Figura 5).

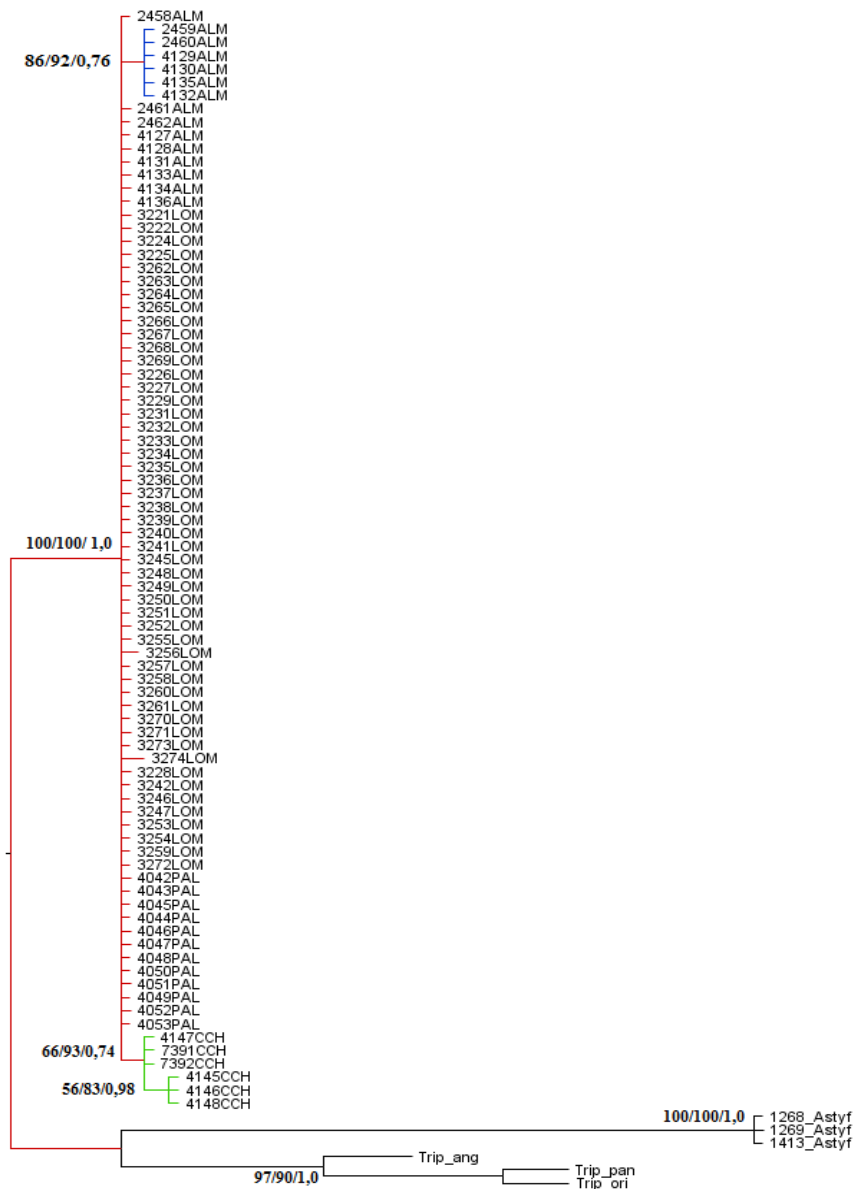


Figura 5. Árvore consenso baseada em NJ, ML e BI das sequências do 16S rRNA. Os valores de suporte estão representados pelos métodos NJ, ML e BI, respectivamente.

Outros estudos de identificação de espécies da ictiofauna Neotropical também detectaram alta divergência genética ($> 2\%$) dentro de um táxon, a exemplo dos trabalhos realizados por Pereira *et al.* (2013) e Gomes *et al.* (2015), em que confirmam a existência de espécies crípticas. De fato, a divergência genética de *L. myersi* nas amostras do rio Cachoeira, encontra-se abaixo da referência (2%), no entanto, no estudo de Rodrigues *et al.* (2016) e na rede de haplótipos (Figura 5) sugere-se a estruturação da população. Em Cachoeira foram encontrados indivíduos com diferenças genéticas acentuadas (dois haplótipos exclusivos), com diversidade haplotípica (h) de 0,3181 e nucleotídica (π) igual a 0,00082.

Foi possível observar três grupos, sendo que o maior deles reuniu amostras das populações Lomanto (LOM), Porto Alegre (PAL) e alguns indivíduos Almada (ALM). O segundo engloba alguns indivíduos da população Almada e o terceiro os dois haplótipos de Cachoeira (CCH). Rodrigues *et al.* (2016), também encontraram resultado semelhante com o gene COI para a mesma espécie, evidenciando diferenças dos indivíduos da população Cachoeira das demais. Os autores afirmam a estruturação dessa população e sugerem o manejo desse grupo como única unidade evolutiva.

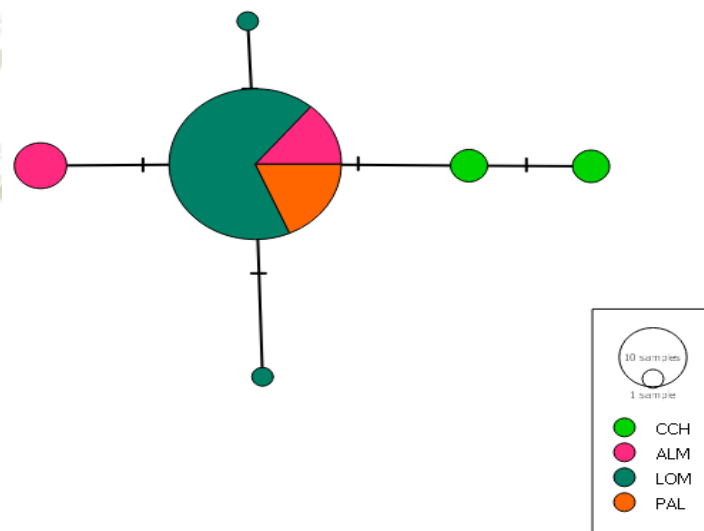


Figura 5. Rede de haplótipos baseada em sequências de 16S rRNA de populações da espécie *L. myersi*. Cada círculo representa um haplótipo e seu tamanho representa sua frequência. As linhas representam as relações entre os haplótipos que diferem em uma mutação e traços nas linhas representam mutações adicionais. As cores representam as localidades.

A alta variação genética entre as populações (66,03%), a baixa variação dentro das mesmas (33,97%) e o alto índice de fixação F_{ST} (0,66) ($p < 0,05$), confirmam a estruturação genética.

5.2 ISSR e D-loop

Os onze iniciadores escolhidos geraram número total de 101 *loci*, dos quais 66,58% foram polimórficos. O polimorfismo dentro de cada população variou de 59,41% para a população Cachoeira a 72,28% para a população Porto Alegre (Tabela 7). Resultado semelhante foi obtido por Li *et al.* (2013), em estudo de diversidade genética com a espécie *Monopterus albus*, em que utilizaram 12 iniciadores ISSR e encontraram 110 *loci* com percentual de *loci* polimórficos de 54% a 71%. Os valores de heterozigosidade esperada (H_E) variaram de 0,212 (Cachoeira) a 0,259 (Porto Alegre), com média de 0,230, revelando uma moderada diversidade genética para as quatro populações analisadas.

Tabela 7. Diversidade genética em populações *Lignobrycon myersi* por meio de 11 primers ISSR.

População	N	P(%)	H_E
ALM	15	64,36	0,222
CCH	06	59,41	0,212
LOM	15	70,30	0,235
PAL	11	72,28	0,259
Média/total	47	66,58	0,230

N= tamanho da amostra; P (%) = percentual de polimorfismo; H_E = heterozigosidade esperada; ALM= População bacia do rio Almada; CCH= População bacia rio Cachoeira; LOM= População Praia do Lomanto; PAL= População Porto Alegre.

O nível de divergência molecular foi realizado por meio da análise de variância molecular (AMOVA). A variação genética dentro das populações (76% da variação total) foi maior que entre as populações (24%), resultado diferindo do obtido via gene 16S. Benevides *et al.* (2014) também encontraram maior variação intrapopulacional em estudo de variação genética com populações de *Epinephelus itajara* usando o gene CO1. O valor do índice de fixação encontrado foi 0,245 ($p < 0,05$), resultado que indica a existência de estruturação moderada entre as populações (Tabela 8), fato confirmado pela análise de estrutura populacional por Inferência Bayesiana, em que verificou-se compartilhamento de alelos (Figura 8).

Tabela 8. Análise de variância molecular (AMOVA) e índice de fixação valores (F_{ST}) obtidos a partir de 11 *primers* ISSR em populações de *Lignobrycon myersi*.

Fonte de Variação	Desvio Padrão	Soma dos quadrados	Quadrados médios	Estimativa de Variação	%
Entre populações	3	236,730	78,910	5,463	24
Dentro de populações	43	724,270	16,843	16,843	76
Total	46	961,000		22,306	100
Índice de fixação	F_{ST}	0,245			

Os resultados via ISSR, para as populações Almada (ALM), Cachoeira (CCH), Lomanto (LOM) e Porto Alegre (PAL), revelaram distâncias genéticas que variaram de 0,116 a 0,260. A maior distância foi entre as populações CCH e PAL (0,260). Em oposição, o menor valor ocorreu entre as populações ALM e CCH (Tabela 9). A partir do dendrograma obtido pelo método UPGMA e construído com os valores de distância genética de Nei pode-se verificar a formação de 2 grupos com valor de suporte 100%, um composto pelas populações ALM e CCH e o segundo pelas populações de LOM e PAL (Figura 6). Isso evidencia que outros fatores podem estar exercendo influência na distância genética entre as populações, visto que o teste de Mantel não mostrou correlação significativa entre a distância geográfica e a distância genética ($r = 0.6705$, $p > 0,05$).

Tabela 9. Estimativas de identidade (diagonal inferior) e distância genética de Nei (1972) (diagonal superior), entre as populações da espécie *Lignobrycon myersi*.

População	ALM	CCH	LOM	PAL
ALM	-----	0,116	0,125	0,153
CCH	0,890	-----	0,174	0,260
LOM	0,883	0,840	-----	0,137
PAL	0,858	0,771	0,872	-----

Áreas de Mata Atlântica na Bahia serviram como importante refúgio durante as glaciações do Pleistoceno (Carnaval & Moritz 2008; Batalha-Filho & Miyaki, 2014), parte desse refúgio engloba algumas das áreas estudadas como trechos do rio de Contas e pode ter resultado em maior permanência das populações e acúmulo de divergências genéticas, assim como verificado para outras espécies de peixes. Estudo

citogenético com a espécie *Callichthys callichthys*, relatou de forma inédita a ocorrência de um macrocromossomo metacêntrico B eucromático e padrões exclusivos de Regiões Organizadoras de Nucléolo (RON), em populações localizadas nos limites de Mata Atlântica e semiárido baianos (Almeida *et al.*, 2013). Em suma, os elementos do clima, relevo e vegetação da Bacia Hidrográfica do rio Cachoeira (BHRC) também podem ter contribuído para o aumento da distância genética entre as populações Cachoeira e Porto Alegre verificada no dendrograma. Entre esses pode-se citar a precipitação pluviométrica da BHRC, que consiste em excessos hídricos em oposição a déficits anuais em alguns municípios. Em relação à vegetação ocorre o predomínio de restinga, mata higrófila, mata mesoxerófila, dentre outras. Contudo, as unidades geomorfológicas são distintas com presença de depressão, mares de morro, serras e planícies (Nacif *et al.*, 2003).

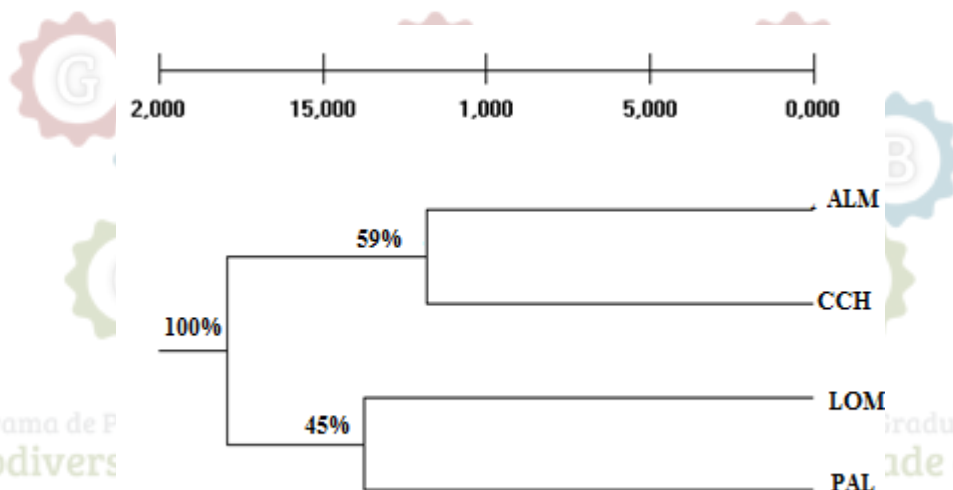


Figura 6. Análise de agrupamento via UPGMA, obtida por meio das distâncias genéticas (Nei, 1972) entre as populações de *Lignobrycon myersi* utilizando-se 11 primers ISSR.

Embora marcadores dominantes sejam considerados menos informativos, o uso de marcadores ISSR pode ser uma boa estratégia para a análise preliminar da diversidade genética, uma vez que é uma técnica de baixo custo e não requer informação prévia sobre o genoma do organismo a ser estudado. Esses tem sido eficientes na avaliação da diversidade genética em espécies de peixes, como *Monopterus albus*, (Li *et al.*, 2013), *Epinephelus itajara* (Benevides *et al.*, 2014),

Arapaima gigas (Vitorino *et al.*, 2015). Pomponet *et al.* (2008), analisaram populações de *Astyanax aff. bimaculatus* por meio de análises morfológicas, citogenéticas e uso de marcadores RAPD, ISSR. Apesar da alta semelhança morfológica e citogenética entre as populações estudadas, os dados moleculares revelaram uma estrutura populacional significativa ($F_{st} = 0,1868$).

Foram geradas 25 seqüências do gene D-loop com 810 pares de bases, compondo o alinhamento total com número de sítios polimórficos igual a 53. Encontrou-se 12 haplótipos (Figura 7), níveis de diversidade haplotípica ($h = 0,880$) e diversidade nucleotídica ($\pi = 0,025$), com as maiores diversidades encontradas na população Cachoeira ($h = 0,8670$ $\pi = 0,0065$) e Almada ($h = 0,8570$ $\pi = 0,0020$) (Tabela 10). O número de haplótipos encontrados usando o gene D-loop foi o dobro da quantidade encontrada com o 16S rRNA. Tal resultado pode ser atribuído à variabilidade do gene em estudo, sendo que o D-loop apresenta maior taxa de variação (Avice, 1994).

Camargo *et al.* (2016), em estudo de variabilidade genética com a espécie *Carcharhinus longimanus*, também encontraram 12 haplótipos e os maiores valores de diversidade em duas localidades: no Atlântico Sudoeste ($Hd = 0,8000$, $\pi = 0,00184$) e no Meso Atlântico ($Hd = 0,7571$, $\pi = 0,00192$). Os resultados indicaram a existência de duas populações de tubarões geneticamente distintas e demograficamente independentes. De modo semelhante, Iervolino *et al.* (2010), em estudo populacional da espécie *Piaractus mesopotamicus*, encontraram alta diversidade haplotípica ($Hd = 0,840$) e a diversidade nucleotídica foi de 0,052 a 0,010. Foi sugerido que essa alta diversidade estava relacionada ao grande tamanho efetivo populacional.

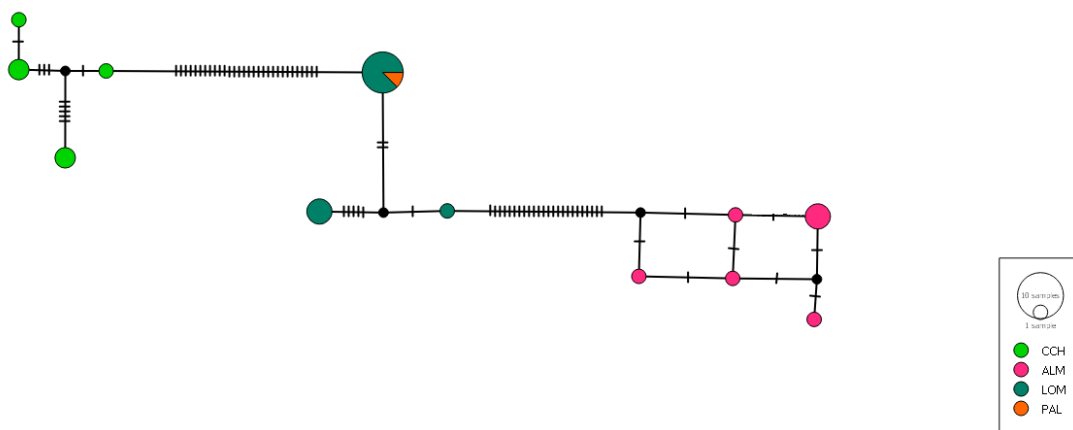


Figura 7. Rede de haplótipos baseada em sequências D-loop de populações da espécie *L. myersi*. Cada círculo representa um haplótipo e seu tamanho representa sua frequência. As linhas representam as relações entre os haplótipos que diferem em uma mutação e traços

Tabela 10. Estatísticas populacionais de *Lignobrycon myersi*. N=número de indivíduos; P=sítios polimórficos; Nh= número de haplótipos; Hd=diversidade haplotípica; π = diversidade nucleotídica.

Populações	N	P	Nh	Hd	π
Almada	07	04	05	0,857	0,0020
Lomanto	11	08	03	0,564	0,0040
Porto Alegre	01	n/c	n/c	n/c	n/c
Cachoeira	06	10	04	0,867	0,0065

A análise de variância molecular (AMOVA) das sequências de D-loop revelou (88,97%) da variação genética entre as populações e (11,03%) dentro das populações. O F_{ST} encontrado foi 0,88 e altamente significativo ($p < 0,0001$). Esse valor é indicativo de diferenciação genética alta e consequentemente elevada estruturação. A mesma análise feita com gene 16S rRNA e o resultado foi semelhante, com maior variação genética entre as populações. Em oposição a esses resultados a AMOVA realizada com os dados de ISSR demonstrou maior variação dentro das populações. Alta estruturação e reduzida variabilidade dentro das populações podem levar ao endocruzamento, que consiste no acasalamento de indivíduos aparentados e tem como consequências a redução da heterozigosidade, fixação de alelos, dentre outros fatores que implicam na diminuição da diversidade genética (Hartl & Clark, 2010). Em estudo de diversidade genética na espécie *Arapaima gigas*, Vitorino *et al.* (2015) encontraram alta porcentagem de loci polimórficos (98,21%), no entanto os baixos valores de heterozigosidade esperados e a dissimilaridade intrapopulacional indicaram perda de diversidade genética, como consequência da endogamia.

Tal diferença no resultado pode-se atribuir às distintas características dos marcadores utilizados. Entretanto, o uso do ISSR foi importante por ser um marcador nuclear, que levou ao mesmo agrupamento e evidenciou estruturação. O teste de Mantel, via D-loop, não mostrou correlação significativa entre a distância geográfica

e a distância genética ($r = 0.4600$, $p > 0,05$), resultado similar a análise realizada com os dados de ISSR.

A análise da estrutura populacional por Inferência Bayesiana com ISSR, estimou um $K = 3$: K1 formado pelas populações ALM e CCH, K2 pela população Lomanto e K3 por Porto Alegre (Figura 8). Resultado que corrobora com a moderada estruturação via ISSR foi 0,245 ($p < 0,05$), o que evidencia pequeno compartilhamento de alelos entre os grupos K1, K2 e K3. Já a análise via D-loop levou ao mesmo número de grupos, entretanto sem compartilhamento de alelos: K1 formado pela população CCH, K2 por ALM e K3 pela população LOM e um único indivíduo PAL (Figura 9).

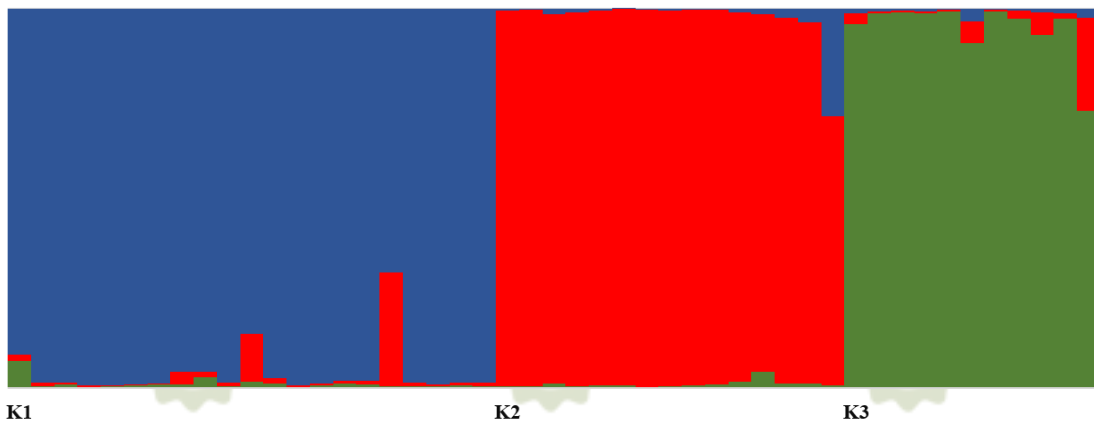


Figura 8. Análise Bayesiana das populações de *L. myersi* com *primers* ISSR realizada pelo Structure. K1 representa as populações Almada e Cachoeira, K2 a população Lomanto e K3 Porto Alegre.

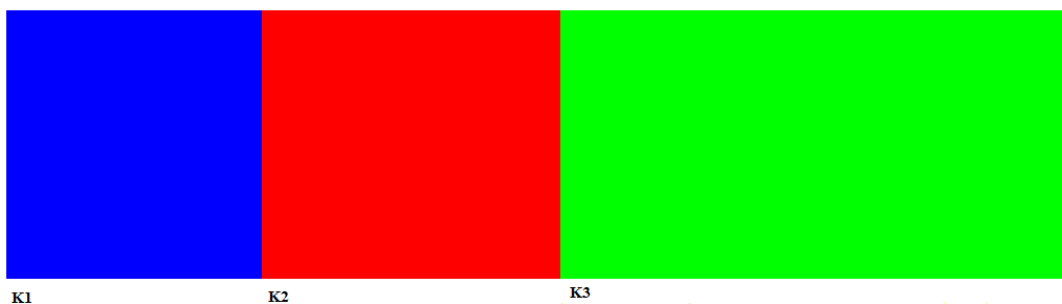


Figura 9. Análise Bayesiana das populações de *L. myersi* utilizando sequências de D-loop realizada pelo BAPS. K1 representa a população Cachoeira, K2 a população Almada e K3 Lomanto e Porto Alegre.

5.3 Considerações gerais

Com o uso do ISSR foram encontrados valores medianos de heterosigiosidade esperada e de loci polimórficos, a análise de agrupamento mostrou a população de Cachoeira em um grupo à parte e moderada estruturação. Já as técnicas com os genes 16S e D-loop evidenciaram diversidade haplotípica, maior quantidade de sítios polimórficos, maior estruturação, a maior parte da variabilidade estava entre as populações e com baixos níveis de variabilidade dentro. Entretanto, apresentaram o mesmo agrupamento do marcador nuclear ISSR. As diferenças observadas podem estar relacionadas às características dos marcadores genéticos. De fato, os marcadores dominantes são menos informativos (Matioli & Passos-Bueno, 2012), já os métodos de detecção de polimorfismos baseados no sequenciamento de DNA, que atualmente tornaram-se uma técnica rápida, com custos reduzidos são mais informativos (Zhang & Hanner, 2012).

O uso de técnicas que utilizam DNA nuclear e mitocondrial é importante no estudo de populações, tornando os trabalhos mais resolutivos. Como exemplo tem a avaliação da diversidade genética de quatro populações de *Arapaima* da bacia do Araguaia-Tocantins (Vitorino *et al.*, 2015), via marcador ISSR e o gene COI. Verificaram que ISSRs foram eficientes para determinar a diversidade genética dessa espécie, revelando que as populações estão estruturadas e com baixa diversidade e o gene COI confirmou que os espécimes pertencem à *Arapaima gigas*. Outro estudo de variabilidade genética foi realizado por Gwak e Nakayama, (2011) com a espécie *Gadus macrocephalus*, utilizando marcadores microssatélites e D-loop. A análise via mtDNA revelou uma baixa variabilidade, mas diferenciação significativa entre três das cinco populações e a análise por microssatélites também revelou polimorfismo moderado nessas populações.

Todas as técnicas utilizadas (ISSR, 16S rRNA e D-loop) mostraram a população de *L. myersi* do rio Cachoeira como um grupo a ser manejado separadamente. Já as populações de Almada, Porto Alegre e Lomanto, que compõem um único grupo, podem ser manejadas como única unidade evolutiva, apesar do isolamento geográfico entre algumas dessas populações. Isso evidencia que bacias próximas não necessariamente são semelhantes e devem ser submetidas a diferentes estratégias de conservação.

A população do rio Cachoeira merece atenção especial no aspecto da conservação, pois é um grupo que está sujeito a ação de diferentes fatores evolutivos. As pequenas populações ou aquelas que têm reduzido tamanho efetivo estão mais propensas à extinção, podendo perder ou fixar alelos por deriva genética, sofrer com endogamia e como consequência perder diversidade genética. Essa perda ou diminuição da diversidade reflete negativamente na capacidade das populações em se adaptarem às mudanças ambientais (Frankham *et al.*, 2008).

Antes de iniciar o manejo das populações naturais é importante o conhecimento de suas condições. Para tal, os estudos genéticos tem dado grande contribuição em detectar reduções da variabilidade genética, descobrir os efeitos causados pelo endocruzamento, resolver incertezas taxonômicas, assim como delinear unidades de manejo distintas dentro das espécies. Uma das primeiras estratégias no manejo de espécies é tentar reverter o declínio populacional identificando e removendo suas causas. Remoção da vegetação, introdução de espécies exóticas na bacia do rio Almada e no reservatório da Barragem de Pedras pode ter contribuído para o declínio da piaba facão (Castro & Jucá-Chagas, 2008; Conceição *et al.*, 2006). Adicionalmente, a intensa atividade pecuária e agrícola com a lavoura cacaueteira, tem promovido grande impacto nos entornos da Bacia Hidrográfica do rio Cachoeira (Souza *et al.*, 2009).

Outra estratégia eficiente pra recuperar populações pequenas e de baixa diversidade é a introdução de indivíduos de outras populações, o que permite melhorar a potencial reprodutivo e restaurar a diversidade genética (Frankham *et al.*, 2008). Entretanto, essa medida não é aplicável para a espécie *Lignobrycon myersi*, pois a população Cachoeira é considerada unidade evolutiva distinta das demais. As medidas a serem tomadas incluem o controle da pesca, pois a piaba facão ainda é apreciada como peixe local, redução de poluentes no meio e a restauração do habitat. Adicionalmente, essas estratégias devem ser acompanhadas por políticas de educação ambiental para despertar o interesse da população sobre a biodiversidade local.

6. CONCLUSÕES

Os marcadores nucleares e mitocondriais foram importantes para avaliação da diversidade genética e identificação molecular de *Lignobrycon myersi*. As análises com 16S e D-loop evidenciaram maior diversidade haplotípica e quantidade de sítios polimórficos, levando ao mesmo agrupamento do ISSR, entretanto com maior estruturação e maior variabilidade entre populações, em contraste com a maior variabilidade dentro, via ISSR.

A população do rio Cachoeira merece atenção especial no aspecto da conservação e deve ser manejado separadamente em função de suas peculiaridades. Já as populações Almada, Porto Alegre e Lomanto, que compõe um único grupo, podem ser manejadas juntas, apesar da distância geográfica entre algumas dessas populações. Isso evidencia que bacias próximas não necessariamente são semelhantes e devem ser submetidas a diferentes estratégias de conservação.

7. REFERÊNCIAS

AFFONSO, PRAM.; GALETTI JR., PM. 2007. Genetic diversity of three ornamental reef fishes (Families Pomacanthidae and Chaetodontidae) from the Brazilian coast. *Brazilian Journal of Biology*, vol. 67, no.4, p. 925-933.

AKAIKE, H. 1973. Information Theory and an Extension of the Maximum Likelihood Principle. In: *Second International Symposium on Information Theory* (Petrov BN, Csaki F). Budapest, Akademiai Kiado, p. 267-281.

ALMEIDA JS, AFFONSO PRAM, DINIZ D, CARNEIRO PL, DIAS AL. 2013. Chromosomal variation in the tropical armoured catfish *Callichthys callichthys* (Siluriformes, Callichthyidae): implications for conservation and taxonomy in a species complex from a Brazilian hotspot. *Zebrafish*, vol. 10, p. 451-458.

ARIAS, MC.; FRANCISCO, FO.; SILCESTRE, D. 2003 In: *Apoidea Neotropical: Homenagem aos 90 anos de Jesus Santiago Moure* (MELO, GA & Alves dos Santos, I), Ed.UNESC, p. 305-309.

ASKARI, N.; ABADI, MM; BAGHIZADEH, A. 2011. ISSR markers for assessing DNA polymorphism and genetic characterization of cattle, goat and sheep populations. *Iranian Journal of Biotechnology*, vol. 9, p. 222-229.

BATALHA-FILHO, H; MIYAKI, CY. 2014. Processos evolutivos na Amazônia e na Mata Atlântica. *FRONTEIRAS: Journal of Social, Technological and Environmental Science*, vol. 3, no.2, p. 34-44.

BENEVIDES, EA.; VALLINOTO, MNS.; FETTER FILHO, AFH.; SOUZA, JRB.; SILVA-OLIVEIRA, G.; FREITAS, MO.; FERREIRA, BP.; HOSTIM-SILVA, M.; BERTONCINI, AA.; BLANCHARD, F.; TORRES, RA. 2014. When physical oceanography meets population genetics: the case study of the genetic/evolutionary discontinuity in the endangered goliath grouper (*Epinephelus itajara*; Perciformes: Epinephelidae) with comments on the conservation of the species. *Biochemical Systematics and Ecology*, vol. 56, p. 255-266.

CAMALIER, P & ZANATA, AM. 2014. Biogeography of freshwater fishes from the Northeastern Mata Atlântica freshwater ecoregion: distribution, endemism, and area relationships. *Neotropical Ichthyology*, vol. 12, no. 4, p. 683-698.

CAMARGO, SM.; COELHO, R.; CHAPMAN, D.; HOWEY-JORDAN, L.; BROOKS, EJ.; FERNANDO, D.; MENDES, NJ.; HAZIN, FHV.; OLIVEIRA, C.; SANTOS, MN.; FORESTI, F.; MENDONÇA, FF. 2016. Structure and Genetic Variability of the Oceanic Whitetip Shark, *Carcharhinus longimanus*, determined using Mitochondrial DNA. *Plos One*, p. 1-11.

CARNAVAL, AC.;MORITZ, C. 2008. Historical climate modeling predicts patterns of current biodiversity in the Brazilian Atlantic Forest. *Journal of Biogeography*, vol. 35, p. 1187-1201.

CASTRO, RMC & VARI, RP. 1990. *Moojenichthys* Miranda-Ribeiro (Pisces: Ostariophysi: Characidae), a Phylogenetic reappraisal and redescription. Proceedings of the Biological Society of Washington, vol. 103, no. 3, p. 525-542.

CASTRO, RMC. & JUCÁ-CHAGAS, R. 2008. *Lignobrycon myersi* (Miranda-Ribeiro, 1956). In: Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção. Ministério do Meio Ambiente, Ed. Brasília, DF, vol. 2, p. 75-77.

CASU, M.; LAI, T.; CURINI-GALLETTI, M.; RUIU, A.; PAIS, A. 2009. Identification of Mediterranean *Diplodus* spp. and *Dentex dentex* (Sparidae) by means of DNA Inter-Simple Sequence Repeat (ISSR) markers. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, vol. 368, p. 147–152.

CETRA, M.; SARMENTO-SOARES, LM & MARTINS-PINHEIRO, RF. 2010. Peixes de riachos e novas Unidades de Conservação no sul da Bahia. Pan-American Journal of Aquatic Sciences, vol. 5, no. 1, p. 11-21.

CONCEIÇÃO CM.; JUCÁ-CHAGAS, R.; SILVA, DM.; CALÓ, CFF.; SAMPAIO, FAC.; OLIVEIRA, MSP.; NASCIMENTO, LS.; TRINDADE, MEJ.; BOCCARDO, L.; NOVAES, MJ. 2006. Composição e abundância das espécies introduzidas no Rio de Contas, BA. In: Resumos do VII Congresso Internacional sobre Manejo de Fauna Silvestre na Amazônia e América Latina. Ilhéus, p. 79.

EVANNO, G.; REGNAUT, S.; GOUDET, J. 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. Molecular Ecology, vol. 14, p. 2611-2620.

EXCOFFIER, L.; LAVAL, G.; SCHNEIDER, S. 2007. Arlequin. An integrated software package for population genetics data analysis. Evolutionary Bioinformatics, v. 3.11.

FALUSH, D.; STEPHENS, M.; PRITCHARD, JK. 2007. Inference of population structure using multilocus genotype data: dominant markers and null alleles. Molecular Ecology Notes, vol.7, no. 4, p. 574-578.

FARIAS-FILHO, A F. 2003. Planejamento da Bacia Hidrográfica do Rio Almada-Sul da Bahia com Ênfase no Meio Físico. Ilhéus: Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC). Dissertação de Mestrado em Desenvolvimento Regional e Meio Ambiente). 74 p.

FRANKHAM, R.; BALLOU, JD.; BRISCOE, DA. 2008. Fundamentos de genética da conservação. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética. 262p.

FRANCO, GB.; SOUZA, CMP; BETIM, LS.; MARQUES, EAG.; GOMES, RL.; CHAGAS, CS. 2011. Diagnóstico ambiental da bacia hidrográfica do rio Almada (BA). Revista Geografia, vol. 20, no. 3, p. 71-94.

GOMES, LC.; PESSALI, TC.; SALES, NG.; POMPEU, PS.; CARVALHO, DC. 2015. Integrative taxonomy detects cryptic and overlooked fish species in a Neotropical river basin. Genetica, vol. 143, no. 5, p. 581–588.

GOMES, RL.; MORAES, MEB.; MOREAU, MAS.; MOREAU, MS.; FRANCO, GB & MARQUES, EAG. 2012. Aspectos físico-ambientais e de uso e ocupação do solo da bacia hidrográfica do rio Almada-BA. Boletim de Geografia, vol. 30, no. 2, p. 45-57.

GUPTA, M.; CHYI, YS.; ROMERO-SEVERSON, J.; OWEN, JL. 1994. Amplification of DNA markers from evolutionarily diverse genomes using single primers of simple sequence repeats. Theoretical and Applied Genetics vol. 89, p. 998-1006.

GWAK, WS .; NAKAYAMA, K. 2011. Genetic variation and population structure of the Pacific cod *Gadus macrocephalus* in Korean waters revealed by mtDNA and msDNA markers. Fish Science, vol. 77, p. 945-952.

HALL, T. A. 1999. Bioedit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucleic Acids Symposium Series, vol. 41, p. 95-98.

HAMMER, O.; HARPER, DAT. & RYAN, PD. 2001. PAST: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. Paleontologia Eletrônica, vol. 4, p. 9.

HARTL, D.; CLARK, AG. , 2010. Princípios de Genética de Populações. 4 ed. Porto Alegre: Artmed. 659p.

HEBERT, PDN.; CYWINSKA, A.; BALL, SL.; WAARD JR. 2003. Biological identifications through DNA barcodes. Proceedings of the Royal Society, vol. 270, p. 313-322.

HILSDORF, AWS.; OLIVEIRA, C.; LIMA, FCT.; MATSUMOTO, CK. 2008. A phylogenetic analysis of *Brycon* and *Henochilus* (Characiformes, Characidae, Bryconinae) based on the mitochondrial gene 16S rRNA. Genetics and Molecular Biology, vol. 31, no. 1, p. 366-371.

IERVOLINO, F.; RESENDE, EK .; HILSDORF, AWS. 2010. The lack of genetic differentiation of pacu (*Piaractus mesopotamicus*) populations in the Upper-Paraguay Basin revealed by the mitochondrial DNA D-loop region: Implications for fishery management. Fisheries Research, vol. 101, p. 27–31.

INSTITUTO DO MEIO AMBIENTE E RECURSOS HÍDRICOS (INEMA). 2017. Disponível em < <http://www.inema.ba.gov.br/> > Acesso em 25 de julho de 2017.

JENSEN, J.; BOHONAK, AJ.; KELLEY, ST. 2005. Isolation by distance, web service. Bio Med Central Genetics, vol. 6, no. 13. v.3.23 <http://ibdws.sdsu.edu/>

KIMURA, M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. Journal of Molecular Evolution .vol.16, p. 11-120

LEIGH, J.W., & BRYANT, D. 2015. PopART: full-feature software for haplotype network construction. *Methods in Ecology and Evolution*, vol. 6, p. 1110–1116.

LI, W.; SUN, WX.; FAN, J.; ZHANG, CC. 2013. Genetic diversity of wild and cultured swamp eel (*Monopterus albus*) populations from central China revealed by ISSR markers. *Biologia*, vol. 68, no. 4, p. 727- 732.

LIANG, R.; ZHUO, X.; YANG, G.; LUO, D.; ZHONG, S.; ZOU, J. 2012. Molecular phylogenetic relationships of family Haemulidae (Perciformes: Percoidae) and the related species based on mitochondrial and nuclear genes. *Mitochondrial DNA*, vol. 23, no. 4, p. 264–277.

LIU, B. & WENDEL, JF. 2001. Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphisms as a genetic marker system in cotton. *Molecular Ecology Notes*, vol. 1, p. 205-208.

LUI, RL.; BLANCO, DR.; MARGARIDO, VP.; CAMPOS, SKG. ; GOMES, VN.; PRIOLI, AJ.; MOREIRA-FILHO, O. 2012. A recent transposition of river involving Paraná and São Francisco basins: Effects on the genetic variability and structure of the neotropical fish *Parauchenipterus galeatus* (Siluriformes, Auchenipteridae). *Mitochondrial DNA*, vol. 23, no. 5, p. 388-395.

MACHADO, ABM.; MARTINS, CS.; DRUMMOND, GM. 2005. Lista da fauna brasileira ameaçada de extinção. Belo Horizonte: Fundação Biodiversitas.

MALABARBA, MCLS. 1998. Phylogeny of fossil Characiformes and paleobiogeography of the Tremembé Formation, São Paulo, Brasil. p. 69-84. In: MALABARBA, LR.; REIS, RE.; VARI, RP.; LUCENA, ZM. & LUCENA, CA. (ed). *Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes*. Porto Alegre: Edipucrs, p. 603.

MARETTO, F; REFFO, E; DALVIT, C; BARCACCIA, G; MANTOVA, R. 2007 Finding 16S rRNA gene-based SNPs for the genetic traceability of commercial species belonging to Gadiformes. *Italian Journal of Animal Science*, no.6, p. 161–163.

MATIOLI, SR & PASSOS-BUENO, MRS. 2012. Métodos baseados e PCR para análise de polimorfismos de ácidos nucleicos. In: MATIOLI, SR & FERNANDES, FMC. *Biologia Molecular e Evolução*. Ribeirão Preto: Holos Editora. p. 181-190.

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE (MMA). 2006. Caderno da região hidrográfica Atlântico Leste. Brasília: Secretaria de Recursos Hídricos. 156 p.

NACIF, PGS. 2000. Ambientes naturais da bacia hidrográfica do Rio Cachoeira. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa. Tese de Doutorado Departamento de Solos da UFV. 119 p.

NEI, M. 1972. Genetic Distance Between Populations. *American Naturalist*, vol.106, p. 283-292.

NELSON, JS.; GRANDE, TC.; WILSON, MVH. 2016. *Fishes of the World*. John Wiley & Sons, Inc., New York, 752p.

OLIVEIRA, C.; AVELINO, GS.; ABE TK.; MARIGUELA, TC.; BENINE, RC.; ORTÍ, G.; VARI, RP.; CASTRO, RMC. 2011. Phylogenetic relationships within the speciose Family Characidae (Teleostei: Ostariophysi: Characiformes) based on multilocus analysis and extensive ingroup sampling. *BMC Evolutionary Biology*, vol. 11, p. 275.

PALUMBI, SR. 1996. Nucleic acids II: the polymerase chain reaction. In: Hills D, Moritz C, Mable B, eds. *Molecular Systematics*. Massachusetts: Sinauer Associates, p. 205–248.

PAZZA, R.; KAVALCO, KF.; PRIOLI, SMAP.; PRIOLI, AJ.; BERTOLLO, LAC. 2007. Chromosome polymorphism in *Astyanax fasciatus* (Teleostei, Characidae). 3: Analysis of the RAPD and ISSR molecular markers. *Biochemical Systematics and Ecology*, vol. 35, p. 843-851.

PEREIRA, LHG.; HANNER, R.; FORESTI, F.; OLIVEIRA, C. 2013. Can DNA barcoding accurately discriminate mega diverse Neotropical freshwater fish fauna? *BioMed Central Genetics*, vol. 14, no. 20, p. 1-14.

POSADA, D. 2008. jModelTest: Phylogenetic Model Averaging. *Molecular Biology and Evolution*, vol. 25, p. 1253-1256.

PRIMACK, RB.; RODRIGUES, E. 2001. *Biologia da conservação*. Londrina: Planta. 327p.

QURAIISHIA, SF.; PANNEERCHELVAM, S.; ZAINUDDIN, Z .; RASHID, NA. 2015. Molecular Characterization of Malaysian Marine Fish Species using Partial Sequence of Mitochondrial DNA 12S and 16S rRNA Markers. *Sains Malaysiana*, vol. 44, no. 8, p. 1119-1123.

REIS, RE.; KULLANDER, SO.; FERRARIS- JUNIOR, CJ. 2003. Check list of the freshwater fishes of South and Central America. Porto Alegre: Edipurcs.

RODRIGUES, R.; SCHNEIDER, H.; SANTOS, S.; VALLINOTO, M. & SAMPAIO, I. 2008. Low levels of genetic diversity in a heavily exploited marine fish (*Cynoscion scoupa* Sciaenidae) of the Brazilian north coast depicted from mitochondrial DNA sequences. *Genetics and Molecular Biology*, vol. 31, p. 487-492.

RODRIGUES, AS. 2014. Análise genética da piaba-facão *Lignobrycon myersi* (Osteichthyes, Characiformes), espécie ameaçada do Estado da Bahia. Jequié: Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia. Dissertação de Mestrado em Genética, Biodiversidade e Conservação. 92 p.

RODRIGUES, AS.; BRANDÃO, JHSG.; BITENCOURT, JÁ.; JUCÁ-CHAGAS, R.; SAMPAIO, I.; SCHNEIDER, H.; AFFONSO, PRAM. Molecular Identification and Traceability of Illegal Trading in *Lignobrycon myersi* (Teleostei: Characiformes), a Threatened Brazilian Fish Species, Using DNA Barcode. Hindawi Publishing Corporation, p. 1-7.

ROZAS, R. 2003. DnaSP DNA polymorphism analysis by the coalescent and other methods. *Bioinformatics*. vol.19, p. 2496-2497.

SAAD, YM.; RASHED, MA.; ATTA, AH.; AHMED, NE. 2012. Genetic diversity among some *Tilapia* species based on ISSR markers. *Life Science Journal*, vol. 9, no. 4, p. 4841-4846.

SANGER, F.; NICHLEN, S. & COULSON, AR. 1977. DNA Sequencing with chain-termination inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. vol. 74, p. 5463-5468.

SANTOS, S.; GOMES, MF.; FERREIRA, ARS.; SAMPAIO, I.; SCHNEIDER, H. 2013. Molecular phylogeny of the western South Atlantic Sciaenidae based on mitochondrial and nuclear data. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, vol. 66, p. 423-428.

SANTOS, VV.; BARROS, ICL.; JÚNIOR, AMM.; SEVERI, W.; MAGALHÃES, KM. 2014. Samambaias aquáticas da bacia do rio de Contas, Bahia, Brasil. *Neotropical Biology and Conservation*, vol. 9, no. 1, p. 42-48.

SARRI, C.; STAMATIS, C.; SARAFIDOU, T.; GALARA, I.; GODOSOPOULOS, V.; KOLOVOS, M.; LIAKOU, C.; TASTSOGLU, S.; MAMURIS, Z. 2014. A new set of 16S rRNA universal primers for identification of animal species. *Food Control*, vol. 43, p. 35-41..

SEVERI, W.; EL-DEIR, ACA.; FÉLIX, RTS.; ARAÚJO, IMS.; LUZ, SCS .; NETO, AVC.; COSTA, BDF .; CHAGAS, RJ.; BARRETTO, MG. 2010. Composição e abundância da ictiofauna na área de influência dos reservatórios da Pedra e Funil, Bacia do Rio de Contas, Bahia. *In: Moura, A N. et al. Reservatórios do Nordeste do Brasil: Biodiversidade, ecologia e manejo*. Bauru: Nuppea. p. 541-572.

SIMPLICIO, RR.; WALDSCHMIDT, AM.; AMORIM, MB.; ALMEIDA, BS.; PEREIRA, DG. 2015. Genetic diversity and structure in natural populations of *Maytenus truncata* Reis, 1861, a medicinal plant vulnerable to extractivism in Bahia State, Brazil. *Genetic and Molecular Research*, vol. 14, no 4, p. 18241-18248.

SOUZA, CMP.; SILVA, KFMC.; MOREAU, AMSS.; FONTES, EO.; MOREAU, MS.; GÓES, LM. 2009. Zoneamento Agroecológico da Bacia Hidrográfica do rio Colônia-Bahia. *Revista de Ciências Ambientais*, v.3, no. 2, p. 49 – 66.

TAMURA, K.; STECHER, G.; PETERSON, D.; FILIPSKI, A.; KUMAR, S. 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, vol. 30, p. 2725-2729.

VARI, RP.; ZANATA, AM.; CAMELIER, P. 2010. New Species of *Cyphocharax* (Ostariophysi: Characiformes: Curimatidae) from the Rio de Contas Drainage, Bahia, Brazil. *Copeia*, no. 3, p. 382-387.

VENCES, M.; THOMAS, M.; BONETT, RM.; VIEITES, DR.2005. Deciphering amphibian diversity through DNA barcoding: chances and challenges. Philosophical Transactions Royal Society B, vol. 360, p. 1859–1868.

VITORINO, CA.; OLIVEIRA, RCC.; MARGARIDO, VP.; VENERE, PC. 2015. Genetic diversity of *Arapaima gigas* (Schinz, 1822) (Osteoglossiformes: Arapaimidae) in the Araguaia-Tocantins basin estimated by ISSR marker. Neotropical Ichthyology, vol.13, no. 3, p. 557-568.

YANG, L.; TAN, Z.; WANG, D.; XUE, L.; GUAN, M.; HUANG, T.; LI, R. 2014. Species identification through mitochondrial rRNA genetic analysis. Scientific Reports, vol. 4, no. 4089, p. 1-11

WRIGHT, S. 1978. Evolution and the Genetics of Populations, Variability Within Among Natural Populations. Chicago, vol. 4, University of Chicago Press.

ZHANG, J & HANNER, R. 2012. Molecular Approach to the Identification of Fish in the South China Sea. PlosOne, vol. 7, no. 2, p. 1-9.

