



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AQUICULTURA E RECURSOS
AQUÁTICOS TROPICAIS - PPG AqRAT

SÁVIO LUCAS DE MATOS GUERREIRO

**Diversidade genética de populações selvagens de *Brycon melanopterus* (Cope, 1871)
da bacia Amazônica**

BELÉM
2019

SÁVIO LUCAS DE MATOS GUERREIRO

**Diversidade genética de populações selvagens de *Brycon melanopterus* (Cope, 1871)
da bacia Amazônica**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Aquicultura e Recursos Aquáticos Tropicais da Universidade Federal Rural da Amazônia.

Área de concentração: Recursos Aquáticos Tropicais

Orientador: Prof. Dr. Igor Guerreiro Hamoy

BELÉM

2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Bibliotecas da Universidade Federal Rural da Amazônia
Gerada automaticamente mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- G934d Guerreiro, Sávio Lucas de Matos
Diversidade genética de populações selvagens de *Brycon melanopterus* (Cope, 1871) da bacia Amazônica / Sávio Lucas de Matos Guerreiro. - 2019.
60 f. : il. color.
- Dissertação (Mestrado) - Programa de PÓS-GRADUAÇÃO em Aquicultura e Recursos Aquáticos Tropicais (PPGARAT), Campus Universitário de Belém, Universidade Federal Rural da Amazônia, Belém, 2019.
Orientador: Prof. Dr. Igor Guerreiro Hamoy
1. Jatuarana. 2. Estrutura Genética. 3. D-loop. I. Hamoy, Igor Guerreiro , *orient.* II. Título

CDD 333.91009811



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AQUICULTURA E RECURSOS
AQUÁTICOS TROPICAIS - PPG AqRAT

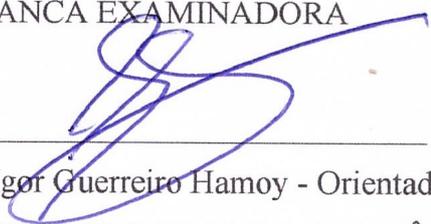
SÁVIO LUCAS DE MATOS GUERREIRO

DIVERSIDADE GENÉTICA DE POPULAÇÕES NATURAIS DE *Brycon*
***melanopterus* (COPE, 1871) DA BACIA AMAZÔNICA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal Rural da Amazônia, como parte das exigências do Curso de Mestrado em Aquicultura e Recursos Aquáticos Tropicais: Área de concentração Recursos Aquáticos Tropicais.

Aprovado em 29 de abril de 2019

BANCA EXAMINADORA



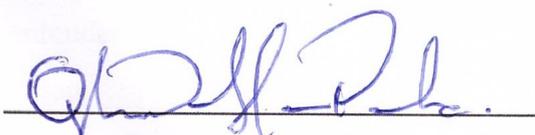
Prof^o. Dr Igor Guerreiro Hamoy - Orientador

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA - UFRA



Prof^o Dr. Alex Sandro Schierholt – 1^o Examinador

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA - UFRA



Prof^o Dr. Glauber David Almeida Palheta – 2^o Examinador

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA - UFRA



Prof^o Dr. Marcelo Andrade – 3^o Examinador

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ - UFPA

AGRADECIMENTO

A Deus, por ter me dado sabedoria quando foi necessário e me proporcionar oportunidades de aprendizado.

Ao meu orientador Dr. Igor Guerreiro Hamoy, pelas oportunidades concedidas, por confiar no meu trabalho como mestrando, bem como as contribuições de cunho científico e pela oportunidade de realização deste trabalho.

À Universidade Federal Rural da Amazônia, pelo apoio logístico.

Aos Amigos do Laboratório de Genética Aplicada - LGA, Alex Ribeiro, André Sá, Paola Gomes, Kaio Barros, Diego Tuloza, Debora Sayumi, Kilber Filho

À Paola Gomes, por sua paciência e disponibilidade quando havia dúvidas imediatamente me ajudava a resolvê-las.

Ao Programa de Pós-Graduação em Aquicultura e Recurso Aquáticos Tropicais pela concessão de auxílio para minhas coletas

À CAPES, pela concessão de bolsas de estudo no período de desenvolvimento do trabalho.

Ao Dr. Sidney Santos e Dra. Ândrea Santos por autorizar parte da execução deste trabalho no Laboratório de Genética Humana e Médica

À equipe do Laboratório de Genética Humana e Médica – LGHM, por todo conhecimento repassado.

Ao Professor Guilherme que me prestou o devido apoio quando estive em Tabatinga, o meu muito obrigado.

Aos meus pais Mário Guerreiro Filho e Lucinda Guerreiro, por abdicar muitos momentos de convivência para que eu pudesse desenvolver este trabalho, e por todo o apoio dado.

À minha maninha Anna Klara Guerreiro, por toda força dada mesmo que distante geograficamente.

À Duane Azevedo, por entender os momentos de ausência, pela força, companheirismo e por torcer pelo meu sucesso.

Aos meus familiares que gentilmente me concederam abrigo enquanto estava em período de coleta, vocês foram fundamentais para o sucesso deste trabalho.

À Associação de Pescadores de Óbidos no nome de meu tio Osvaldo, que me proporcionou momentos de aprendizagem, ajuda nas coletas e abrigo para os momentos de coleta, sou muito grato por isso.

Aos meus tios Heiraldo e Zinoca que me auxiliaram na estadia em Manaus meus sinceros agradecimentos. E aos meus primos Helder, Héber, Heiraldinho e Angélica por todo apoio e atenção proporcionada.

Aos meus tios e primos de Óbidos que fizeram uma força tarefa em busca da jatuarana e que me auxiliaram em toda essa empreitada, não citarei nomes, porém guardo uma boa lembrança e gratidão por toda a ajuda proporcionada.

Ao meu primo Gabriel Guerreiro e à Suzane Costa que gentilmente me receberam em Santarém e me proporcionaram todo suporte e tempo necessário para efetuar minhas coletas, meu muito obrigado.

Agradeço a todos aqueles que de forma direta e indireta contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO

A composição da fauna de água doce brasileira é particularmente muito diversa e muitas das espécies de peixes que a compoem não são encontradas naturalmente fora da América do Sul, principalmente quando se trata de Amazônia. Essa diversidade abrange um número elevado de estoques naturais e estes vem sofrendo com a captura desordenada. A espécie *Brycon melanopterus*, conhecida como jatuarana, matrinxã no Brasil e Sabalo negro e yamú na Colômbia, é uma espécie de peixe amazônico com grande importância comercial, seja pela apreciação de sua carne pelo mercado consumidor ou até como uma das espécies de comportamento agressivo quando capturada por praticantes da pesca esportiva. Esta espécie ocorre principalmente na região da Amazônia central onde existe uma intensa exploração dos estoques naturais. Este estudo tem como objetivo caracterizar geneticamente as populações selvagens de *B. melanopterus* na bacia amazônica. As amostragens foram realizadas em afluentes da bacia amazônica próximo aos municípios de Santarém e Óbidos situados no estado do Pará, Laranjal do Jari localizado no estado do Amapá, Manaus e Tefé localizados no estado do Amazonas e Letícia localizado no departamento Amazonas na Colômbia. Os exemplares coletados foram armazenados para realizar a extração de DNA com posterior amplificação da região controle (D-Loop) do genoma mitocondrial (mtDNA) e sequenciamento. As populações em estudo mostraram-se estruturadas geneticamente, seus índices de diversidade genética são considerados elevados quando comparados com outros trabalhos utilizando a região *D-loop* do mtDNA, ocorreu uma elevada diferenciação genética entre as amostras oriundas de Letícia e Laranjal do Jari, locais extremos de captura, suportado pelos resultados de F_{ST} e árvore de haplótipos. Portanto, o presente trabalho proporcionou informações suficientes para indicar que a variabilidade genética para esta espécie está elevada quando comparada com outros estudos e um padrão não homogêneo de diferenciação entre os locais amostrados. O estudo aponta indícios para que as políticas de manejo e conservação da *B. melanopterus* devem considerar a existência de pelo menos duas unidades evolutivas coexistindo nos tributários da bacia amazônica, oferecendo perspectivas para a utilização de diferentes marcadores moleculares que venham corroborar com as informações obtidas.

Palavras-Chave: Jatuarana, Estrutura genética, D-loop

ABSTRACT

The composition of the Brazilian freshwater fauna is particularly very diverse and many of the fish species that are not found naturally outside of South America, especially when it comes to the Amazon. This diversity cover a large number of natural stocks and these have been suffering from the disorderly catch of fishery resources. The species *Brycon melanopterus*, known as jatuarana and matrinxã in Brazil and as Sabalo Negro in Colombia, is a species of Amazonian fish of great commercial importance, either by the appreciation of its meat by the consumer market or even as one of the species of aggressive behavior when captured by sport fisherman. This species occurs mainly in the central Amazon region where there is intense exploitation of natural stocks. This study aims to characterize genetically the wild populations of *B. melanopterus* in the Amazon basin. Sampling for this study were conducted in tributaries of the Amazon basin near the municipalities of Santarém and Óbidos located in Para State, Laranjal do Jari located in the state of Amapá, Manaus and Tefé located in the state of Amazonas and Leticia located in the Amazonas department in Colombia. The specimens were collected and stored to perform DNA extraction, amplification of the control region (D-Loop) of the mitochondrial genome (mtDNA) and subsequent sequencing. The populations studied were genetically structured, and the genetic diversity indexes were considered high when compared to other studies using the mtDNA D-loop region, in addition, they were found in natural populations of other species of *Brycon* genus. corroborates with the data obtained in this work. There was a population structure between Leticia and Laranjal do Jari, extreme capture locations, supported by F_{ST} results and haplotype tree. Therefore, the present work provided sufficient information to indicate that the genetic variability for this species is high when compared to other studies and a non homogeneous pattern of differentiation between the sampled sites. The study indicates indications that the management and conservation policies of *B. melanopterus* should consider the existence of at least two evolutionary units coexisting in the tributaries of the Amazon basin, offering perspectives for the use of different molecular markers that corroborate with the information obtained.

Keywords: Jatuarana, genetic structure, D-loop

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

mtDNA- DNA mitocondrial

Hap- Haplótipo

Dh- Diversidade haplotípica

JAR- Laranjal do Jari

STM- Santarém

OBD- Óbidos

MAO- Manaus

TFF- Tefé

LET- Letícia

AP- Amapá

PA- Pará

AM- Amazonas

AM-CO – Departamento Amazonas – Colômbia

AMOVA – Análise Molecular de Variância

F_{ST} - Índice de Fixação Interpopulacional

N – Número de amostras

SUMÁRIO

RESUMO	7
ABSTRACT	8
1. CONTEXTUALIZAÇÃO.....	11
1.1 OBJETIVOS.....	13
1.1.1 Objetivo geral.....	13
1.1.2 Objetivos específicos.....	13
1.2 REVISÃO DE LITERATURA	14
1.2.1 Hierarquia taxonômica	14
1.2.2 Biologia da espécie.....	14
1.2.3 Captura por pesca.....	17
1.2.4 Aquicultura.....	18
1.2.5 Genética da conservação de recursos pesqueiros	19
1.2.6 Marcadores moleculares.....	20
1.2.7 DNA mitocondrial.....	21
1.2.8 Filogeografia	23
1.2.9 Variáveis de diversidade genética	24
1.2.10 Índices de estrutura populacional.....	25
1.2.11 Estudos genéticos com o gênero <i>Brycon</i>	25
2 DIVERSIDADE GENÉTICA DE POPULAÇÕES NATURAIS DE <i>Brycon</i> <i>melanopterus</i> (COPE, 1871) DA BACIA AMAZÔNICA.....	29
2.1 INTRODUÇÃO	30
2.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	32
2.2.1 Obtenção das amostras	32
2.2.2 Extração e mensuração do DNA genômico	33
2.2.3 Amplificação e Sequenciamento do marcador molecular	33
2.2.4 Análise estatística.....	34
2.3 RESULTADOS.....	36
2.4 DISCUSSÃO	42
2.5 CONCLUSÃO	46
REFERÊNCIAS	47
ANEXO	56

1. CONTEXTUALIZAÇÃO

A pesca no Brasil é uma atividade muito importante para alguns estados brasileiros, especificamente na região amazônica esta atividade é realizada de forma mais intensa. Logo, os estoques pesqueiros tendem a sofrer uma pressão sobre pesca muito elevada. A *Brycon melanopterus* (COPE, 1871) é uma espécie de grande importância econômica para a região, está entre os dez peixes mais capturados na região amazônica. Diante da diversidade tanto de espécies quanto de populações dos organismos na região amazônica se faz necessários estudos para a genética da conservação das espécies que habitam este importante ecossistema (LOPES et al., 2016; ARDURA et al., 2013; SILVA e BRAGA, 2016).

Brycon melanopterus é uma espécie muito apreciada em alguns estados brasileiros e nos países vizinhos tais como Peru, Colômbia e Equador, esta espécie é mais abundante na região central da Amazônia, um importante recurso para a economia dos três países. Apesar de sua produção estar quase que totalmente atrelada à pesca extrativa, *B. melanopterus* possui protocolos para cultivo e este é extremamente promissor devido a algumas características peculiares da espécie como a aceitabilidade a rações industrializadas, alto rendimento e precocidade ao tamanho comercial, entretanto, apresenta algumas limitações relacionadas a protocolo de reprodução isto faz com que seja pouco cultivada, pois a disponibilidade de forma jovem é restrita e de elevado custo em comparação as demais espécies cultivadas no mercado (LIMA, 2017; BRANDÃO, 2005).

Recentemente os estudos com as espécies do gênero *Brycon* têm se intensificado devido à grande importância que a piscicultura tem para o incremento de proteína animal, com isso se faz necessário realizar o estudo com animais em ambiente natural. A estimativa de variabilidade genética natural se faz necessária, pois de forma natural os animais realizam grandes migrações e desta forma a população tende a realizar mistura de material genético e com isso a manutenção da variabilidade genética alta. Estas são informações importantes para a conservação da espécie e também é um importante recurso para futuros estudos de melhoramento genético (BRANDÃO, 2005; ASHIKAGA et al, 2015; BARROSO, 2003).

Este trabalho estimou a variabilidade genética das populações naturais de *B. melanopterus*, além disso, verificou a estruturação populacional. Para alcançar esses resultados foi necessária a padronização para as técnicas de biologia molecular para a espécie, pois não há estudos prévios que fomentassem essas informações, tais como o sequenciamento da região *D-loop* do genoma mitocondrial e com os dados resultantes desse procedimento foi realizada a estimativa do nível de variabilidade genética em populações naturais presentes na bacia Amazônica da espécie em estudo.

Em outras regiões brasileiras as espécies de *Brycon* começaram a ser estudadas a fim de verificar a situação dos estoques naturais e assim obter dados de variabilidade genética e corroborar com dados de dinâmica populacional e entender melhor a influência da pesca, a influência antrópica e entre outros fatores que podem alterar a variabilidade genética. A variabilidade genética é uma importante variável devido ser um dos indicativos da sobrevivência de uma espécie a médio e longo prazo. Se a troca de genes entre estas tem sido limitada em uma determinada população que esteja sofrendo pesca predatória, a possibilidade de sua recuperação genética pela migração é pequena e a chance de colapso da pesca em determinada região geográfica pode ocorrer (HILSDORF et al., 2006; ARRUDA et al., 2019; FERREIRA et al., 2019).

Portanto, uma forma de contornar esta situação é fomentar os estudos de populações naturais das espécies que possuem captura pela pesca utilizando as ferramentas biotecnológicas, com isso avaliando as variáveis genéticas para identificar a situação dos estoques pesqueiros da espécie em estudo, pois esta pode apresentar indícios de depauperação da variabilidade genética, fator que pode ser determinante para a sobrevivência das espécies. Por isso, o presente estudo foi o primeiro relato de aferição da variabilidade da espécie *B. melanopterus* dessa forma pode-se observar por outra ótica a situação dos estoques pesqueiros e como se comporta em relação às demais espécies, que em algumas já se constatou baixas de variabilidade genética devido a uma serie de influencias, sejam elas antrópicas ou ambientais. (ASHIKAGA et al., 2015; LOPERA-BARRERO, 2014; SANCHES, 2012).

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo geral

- Avaliar a variabilidade genética em populações naturais de *B. melanopterus*, na bacia Amazônica.

1.1.2 Objetivos específicos

- Sequenciar a região *D-loop* do genoma mitocondrial da espécie *B. melanopterus*;
- Aferir o nível de variabilidade genética em populações naturais de *B. melanopterus* presentes na bacia Amazônica;
- Verificar a existência de diferenças em termos de diversidade genética entre as populações naturais de *B. melanopterus*;
- Avaliar o nível de estruturação genética das populações naturais de *B. melanopterus*

1.2 REVISÃO DE LITERATURA

1.2.1 Hierarquia taxonômica

REINO: Animalia

FILO: Chordata

SUPERCLASSE: Actinopterygii

CLASSE: Teleostei

ORDEM: Characiformes

FAMÍLIA: Characidae

GÊNERO: *Brycon* Müller and Troschel, 1844

ESPÉCIE: *Brycon melanopterus* (Cope, 1872)

Fonte: itis.gov; LIMA, 2017

1.2.2 Biologia da espécie

Dentre as espécies compatíveis com as atividades aquícolas, aquelas pertencentes à ordem Characiformes tem se destacado. Nesta ordem, há pelo menos 1.674 espécies recentes válidas e distribuídas em 270 gêneros (NELSON, 2006).

Lima (2017) fez relatos que a espécie *B. melanopterus*, possui ocorrência na Amazônia brasileira, e é utilizada como espécie alvo para piscicultura, sendo facilmente confundida com a *Brycon amazonicus*, por suas semelhanças morfológicas.

Santos (2006) descreve que a espécie *B. melanopterus* possui um porte relativamente grande, esta espécie é descrita em literatura alcançando cerca de 45 cm, tendo em seu conjunto de características morfológicas a presença de dentes multicuspidados em 3 a 4 fileiras na maxila superior, sendo a principal dentição formada por dentes robustos e atrás se tem a ocorrência de dentes cônicos, esta espécie possui uma mancha negra que inicia-se na altura das nadadeiras ventrais e segue em direção ao pedúnculo caudal, subindo diagonalmente para o lóbulo superior da nadadeira caudal, característica marcante na espécie que pode ser constatado na figura 1 (SANTOS, 2006).

Figura 01- Exemplar de *Brycon melanopterus*.



Fonte: Adaptado de Francisco Castro-Lima

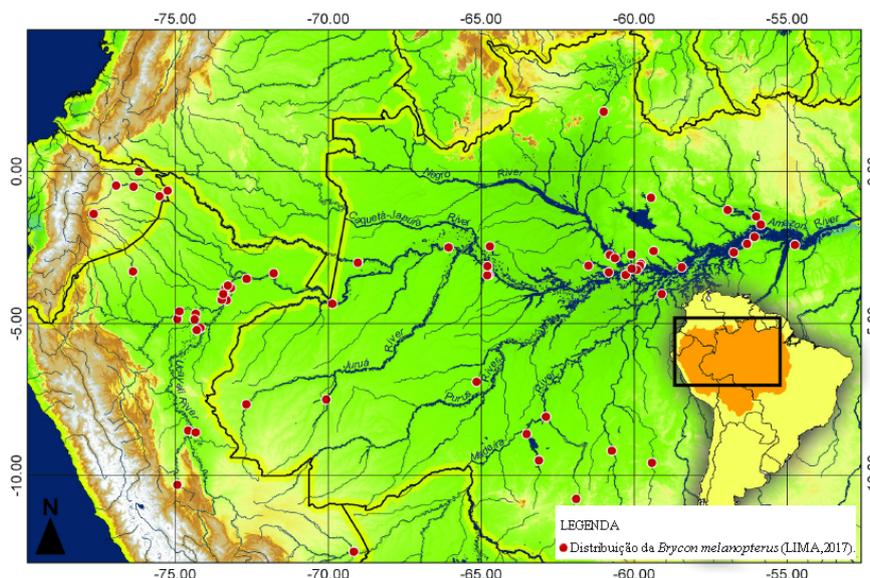
Além das considerações morfológicas realizadas por Santos (2006) pode-se destacar a diagnose realizada por Lima (2017), no qual mostra a diferença entre a *B. melanopterus* e as demais espécies do gênero *Brycon*. A espécie *B. melanopterus* pode ser diferenciada da maioria das espécies de *Brycon* pela presença de uma faixa preta que se estende desde o lóbulo superior da nadadeira caudal até a base da nadadeira anal, torna a *B. melanopterus* diferente das demais espécies de *Brycon*, com a exceção das espécies *Brycon falcatus* e *Brycon amazonicus* que são similares. Para realizar a diferenciação entre a espécies *B. melanopterus* e *B. amazonicus* observa-se no exemplar se este apresenta listras longitudinais retas formadas por uma série de pigmentações que ficam situadas na porção médio distal das escamas, se houver tais características pode-se considerar este um exemplar de *B. amazonicus*. A *B. melanopterus* chega a se assemelhar mais ainda com a *B. falcatus*, pois ambas as espécies possuem um polimorfismo muito elevado, no entanto, a *B. falcatus* possui uma faixa sólida escura oblíqua, apresentada em formato de V ou de forma crescente na nadadeira caudal, além disso a *B. melanopterus* tende a ser um peixe mais alongado, fatores que possibilitam uma distinção melhor das espécies citadas (LIMA, 2017)

A alimentação da *B. melanopterus* é caracterizada como a de um peixe onívoro, definido a partir de estudos nos quais revelaram a presença de frutos, sementes e insetos no conteúdo estomacal dos peixes estudados (PIZANGO-PAIMA et al., 2001). Em sua fase larval a *B. melanopterus* possui uma alimentação baseada em zooplâncton, tais como rotíferos e cladóceros e, principalmente, de larvas de outras espécies de peixes (LEITE E ARAÚJO-LIMA, 2002). Nas fases seguintes passam a se alimentar de pequenas sementes, frutos e flores, sendo que há uma preferência por sementes e frutos, tais como a

Pouteria gonphiiifolia, que foi um dos maiores percentuais de sementes e a *Ficus* sp. foi o mais importante fruto identificado. Segundo Correa & Winnimiller (2018), esta espécie possui alimentação voltada em sua maior parte para artrópodes aquáticos, resultado obtido a partir de análises isotópicas, no qual se caracterizou que além de diversos itens vegetais, os artrópodes representam grande parte da alimentação de *B. melanopterus*. As sementes, alimento importante para as larvas de *B. melanopterus*, são mais abundantes em períodos que ocorre o *match*, no qual as enchentes coincidem com a frutificação e o crescimento das larvas (PIZANGO-PAIMA et al., 2001; BALDISSEROTO E GOMES, 2013).

A distribuição da *B. melanopterus* está compreendida no oeste da Amazônia, principalmente nas bacias do rio Amazonas / Solimões a montante do rio Ucayali no Peru, Rio Napo no Equador, rio Caquetá na Colombia, em afluentes do rio Madeira no Brasil a montante do rio Madre de Dios no Peru e no rio Negro como se pode observar na figura 02 (LIMA, 2017). A espécie está situada no rio Negro em sua parte inferior e superior, usando esse trajeto para migrações reprodutivas para o rio Amazonas e Solimões, comparado com os hábitos da espécie *Colossoma macropomum* (BORGES, 1986; LIMA, 2017).

Figura 02- Mapa da América do Sul situando as localidades de registro da *Brycon melanopterus* (pontos vermelhos)



Fonte: Adaptado de Lima (2017)

1.2.3 Captura por pesca

A pesca é uma das atividades mais tradicionais na Amazônia, sendo a principal fonte de proteína de baixo custo para populações ribeirinhas, fornecendo produto de alto valor nutritivo em comparação a outros tipos de proteína animal (SANTOS E SANTOS, 2005).

Apesar da elevada riqueza de espécies, estimada entre 1.500 a 3.000 espécies, apenas 100 delas são exploradas para a pescaria comercial, (BATISTA E PETRERE JR, 2003) destacando-se os peixes de escama (Characiformes) cujos principais representantes nos desembarques são: curimatã (*Prochilodus nigricans*), jaraqui (*Semaprochilodus* spp.), jatuarana, matrinxã (*Brycon amazonicus*) e o tambaqui (*Colossoma macropomum*) (BATISTA E PETRERE JR, 2003; CARDOSO E FREITAS, 2007; GONÇALVES E BATISTA, 2008).

A pesca de *B. melanopterus* fica situada nas regiões da Amazônia central, onde os registros de desembarque pesqueiros são mais frequentes, isso ocorre devido a sua distribuição geográfica, esta possui distribuição em alguns tributários de águas claras e pretas, sendo encontrada em quase todos os tributários amazônicos, especialmente a região central (BARTHEM E GOULDING, 2007).

Em literatura específica para o desembarque pesqueiro na região, foi descrito no período de 2009 a 2010 que a *B. melanopterus* estava entre as cinquenta espécies mais capturadas no estado do Amazonas, onde há melhor apreciação da espécie em questão (ALCÂNTARA et al., 2015).

1.2.4 Aquicultura

Quando se trata de aquicultura pode-se ter como referencia a *Food and Agriculture Organization of the United Nations-FAO* (Organização das nações Unidas para Alimentação e Agricultura), esta define aquicultura como o cultivo de organismos aquáticos, tais como: peixes, crustáceos, moluscos e plantas aquáticas. A aquicultura engloba todos os meios de cultivo aquático, sendo eles: marinho, doce e estuarino, em condições de cultivo controlado (FAO, 2014).

Em sua ultima publicação sobre a situação da pesca e aquicultura a nível mundial, a *Food and Agriculture Organization of the United Nations* registrou que a produção aquícola teve um aumento significativo nos últimos vinte anos, fazendo com que a aquicultura a nível mundial tenha grande crescimento devido à estagnação das pescarias na década de 1980, no qual a demanda por este gênero alimentício começa a entrar em déficit, tendo a aquicultura como um novo método de complementação deste recurso (FAO, 2016).

O pescado proveniente de rio e do mar está cada vez mais escasso, por tais motivos a utilização da aquicultura (em especial a piscicultura) tem-se destacado no contexto nacional, experimentando crescimentos exponenciais (FAO, 2016). Em praticamente todo o Brasil, o número de produtores se multiplica, os empreendimentos crescem e as empresas do setor aquícola projetam taxas de crescimento bastante expressivas (KUBITZA, 2015).

A espécie *B. melanopterus* tem contribuído de forma positiva para a propagação da piscicultura, pois estudos de reprodução tem sido implementados e testados, a fim de dominar a tecnologia de reprodução desta espécie, além disso, tentar controlar o canibalismo nas primeiras fases da larvicultura, no qual há uma perda elevada por canibalismo nas primeiras 36 horas pós-eclosão (ARIAS, 2006; HONCZARYK E INOUE, 2009).

Quando comparada com a espécie de melhor performance zootécnica cultivada no Brasil, a tilápia *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758), *B. melanopterus* possui performance equivalente a este exótico que está presente em grande parte das pisciculturas do Brasil. *Brycon melanopterus* possui um desenvolvimento rápido e não sofre interferência da densidade de estocagem, tais características que oferecem

condições para o uso desta espécie em estruturas de tanque-rede (IZEL E MELO, 2004; BRANDÃO et al., 2005).

1.2.5 Genética da conservação de recursos pesqueiros

A variabilidade genética, também conhecida como diversidade molecular pode ser definida, de forma mais simplificada como a quantificação de variação genética entre indivíduos (REED e FRANKHAM, 2003; FRANKHAM; BALLOUID; BRISCOE, 2008). O nível de variabilidade genética é a propulsora para a mudança evolutiva, pois permite que populações evoluam em resposta as mudanças ambientais (HAMOY et al., 2018).

Em recursos pesqueiros a variabilidade genética pode ser entendida como a somatória de diversidade de espécies com a diversidade dentro e entre espécies, o que é um importante componente de biodiversidade (HILSDORF et al., 2006). A variabilidade genética usualmente mensurada pelo número de alelos ou pela heterozigosidade (diversidade genética) de um marcador molecular em uma população. A variabilidade dentro de uma população é resultado de um balanço entre processo mutacionais, deriva genética e seleção natural (JUANES; PEREZ; GARCÍAS-VASQUEZ, 2007). Dentre estes o processo de mutação gera variações genéticas enquanto a deriva genética é responsável por diminuir a variação genética, o que acarreta na diferenciação interpopulacional e o estabelecimento do fluxo gênico é o que leva a homogeneidade das populações. A seleção natural também pode atuar na redução da diversidade molecular com a fixação de alelos vantajosos. Entretanto, a diversidade molecular não é influenciada somente pela deriva genética, mutação e seleção natural, pode ser influenciada por eventos históricos (HANFLING E BRANDL, 1998).

A redução e a fragmentação de habitat incrementam a ocorrência de deriva genética e reduzem o fluxo gênico entre populações, conseqüentemente, diminuem a variabilidade genética, podendo levar a diferenciação populacional (TEMPLETON, 2001). Espécies que vem sofrendo drásticas reduções no tamanho de suas populações, ou seja, o efeito *bottleneck*, apresentam grandes perdas na sua variabilidade genética e estão mais propensas à extinção (CORNUET E LUIKART, 1996).

As preocupações e ações referentes aos impactos sobre a biodiversidade nos ecossistemas aquáticos estão muito mais direcionadas para a percepção do

desaparecimento de uma dada espécie do que à diminuição da variabilidade genética da mesma. A depauperação da variabilidade genética dentro e entre populações pode ser um componente decisivo para a sobrevivência de uma espécie a médio e longo prazo (SOLÉ-CAVA, 2001).

O grau de diferenciação genética em organismos aquáticos depende de vários fatores que levam as populações à homogeneidade ou à heterogeneidade genética. O estudo do fluxo gênico entre as populações revela sua estrutura genética, ou seja, o quanto as populações podem estar em conexões genéticas ou isoladas ao longo de suas histórias evolutivas recentes (HILSDORF et al., 2006).

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

O desmatamento, a construção de barragens, o assoreamento e a poluição têm sido apontadas como os principais agentes do esgotamento das populações de peixes. A resiliência das populações de peixes em relação a esses distúrbios depende da adaptação das espécies, a qual é influenciada pelo nível de variabilidade genética e pela ocorrência de refúgios (PIORSKI, 2008). Lancaster e Belyea (1997) definem refúgio como o lugar no qual os efeitos negativos dos distúrbios são menos impactantes do que na sua área circundante. Por conseguinte, o refúgio pode desempenhar um papel central na estrutura das comunidades aquáticas (MAGOULICK E KOBZA, 2003).

1.2.6 Marcadores moleculares

Sabe-se que as espécies não são geneticamente iguais e sim estruturadas em grupos de indivíduos geneticamente semelhantes, podendo estas serem isoladas devido a dispersão de indivíduos de um grupo (BALLOUX E LUGON-MOULIN, 2002; LAIKRE et al., 2005). Vários mecanismos promovem o isolamento de populações, dentre eles pode-se citar separação geográfica, dispersão dos indivíduos e comportamento de filopatria (COUNCIL, 1996).

A distribuição de variação genética dentro e entre populações é caracterizada pelo termo “estrutura genética populacional” de uma espécie (LAIKRE et al., 2005) em que a identificação desta variação é possível pelo advento das técnicas de identificação morfológicas e moleculares. Entre as técnicas moleculares mais indicadas para a utilização em estudos filogeográficos e de genética de populações são as de sequenciamento de segmentos do DNA mitocondrial, tais como a região D-Loop (THUESEN et al., 2008).

A utilização de ferramentas para a identificação genética e conhecimentos acerca da variabilidade dos estoques naturais de uma espécie são uma das exigências para que programas de melhoramento com ênfase na piscicultura requerem para a produção comercial ou para o repovoamento de populações naturais (CALCAGNOTTO E TOLEDO-FILHO, 2000). Para esta finalidade existe uma série de marcadores moleculares, que tem sido utilizado em alguns programas de melhoramento de peixes, tais como, DNA mitocondrial, RFLP, RAPD, AFLP, Microsatélites, SNP e marcadores EST (LIU E CORDES, 2004).

Para a realização de análises de variabilidade o DNA mitocondrial tem sido amplamente utilizado para se avaliar o grau de diferenciação genética entre populações, assim como permite a utilização para fins de caracterização da estrutura populacional, biogeografia e diversidade genética em vários organismos com por exemplo os peixes, pelo fato de que o DNAm possui herança predominantemente materna e com rápida taxa de substituição de bases (SIVASUNDAR et al., 2001).

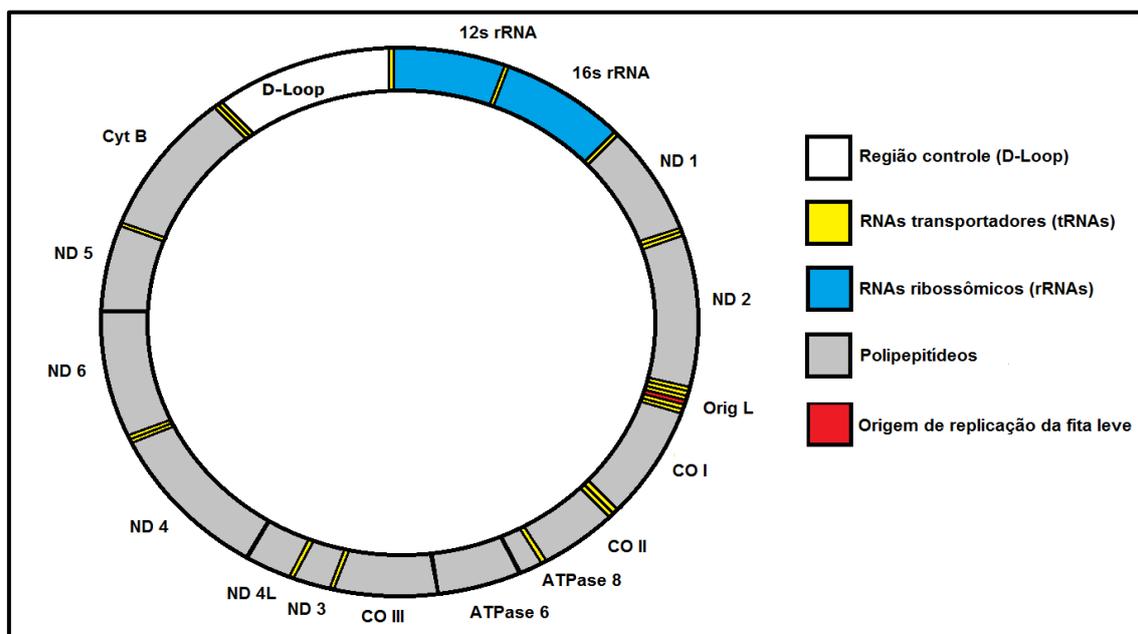
Pelo fato da herança materna atribuída ao DNA mitocondrial muitos dos genes localizados nessa região são altamente conservados no genoma mitocondrial, por muitas vezes podem ser utilizados para resolver as relações que medem períodos de tempo muito longos e são relevantes quando se considera filogeografia e importância taxonômica (OLSON et al., 2009).

1.2.7 DNA mitocondrial

A região denominada DNA mitocondrial nos vertebrados é uma molécula circular, possuindo de 16 a 20 quilobase com 13 genes codificadores de proteínas, sendo estes genes os que representam cerca de 90% do genoma mitocondrial, dois RNAs ribossômicos (12S e 16S rRNA), e 22 RNAs transportadores (tRNAs). Além desses 37

genes existe uma região conhecida como *D-loop* ou CR, pelas abreviaturas em inglês “displacement loop” e “control region” (Figura 3), respectivamente (AVISE, 1986; MEYER, 1993; AVISE, 2000).

Figura 3 - Desenho esquemático do genoma mitocondrial.



Fonte: Brown (2008)

A região controle é responsável pela regulação da replicação e da transcrição de todo o mtDNA e fica localizado entre os genes RNA transportadores prolina e fenilalanina. Este segmento é o mais utilizado em estudos populacionais. Estima-se que a sua taxa de evolução é de 2 a 5 vezes maior comparada aos demais genes mitocondriais codificadores de proteínas (AQUADRO E GREENBERG, 1983).

Na maioria dos animais o mtDNA é herdado por via materna, todas as mitocôndrias são carregadas pelo gameta feminino, tendo sido detectado transmissão de mtDNA através do espermatozoide em poucas espécies (BROWN, 2008).

Outra característica importante é que as células somáticas possuem centenas a milhares de mitocôndrias, cada uma com várias cópias de mtDNA. Geralmente existe um haplótipo mitocondrial dominante por cada indivíduo, característica denominada como homoplasmia, resultado provavelmente da fixação de mutações dentro de cada população intracelular de mtDNA por um processo análogo à deriva genética. Esta característica é fundamental nas análises filogeográficas onde as unidades de estudo são

os indivíduos. Apesar do extenso uso de filogenias baseadas no uso do mtDNA para a reconstrução de padrões filogeográficos, nos últimos 30 anos tem se intensificado o uso de mtDNA para estudos em filogeografia de peixes neotropicais (AVISE, 2009).

O DNA mitocondrial tem sido amplamente utilizado nas duas últimas décadas em estudos de características da estrutura genética de organismos aquáticos. Em relação a espécies de peixes amazônicos já existem alguns estudos publicados: dourada *Brachyplatystoma rousseauxii* Batista (2006), piramutaba *Brachyplatystoma vaillantii* Batista (2005), pirarucu *Arapaima gigas* Hrbek et al. (2007), tambaqui *Colossoma macropomum* Santos et al. (2007) Wu et al. (2016) Escobar et al. (2019) e o mapará *Hypophthalmus marginatus* Ochoa et al. (2015). Todas essas espécies apresentaram, nesses trabalhos, elevados índices de variabilidade genética.

1.2.8 Filogeografia

A filogeografia é uma ciência que lida com os arranjos espaciais das linhagens genéticas especialmente entre espécies estritamente relacionadas ou até entre a mesma espécie (AVISE et al., 1987).

Nas últimas três décadas pesquisadores têm utilizado os marcadores mitocondriais para a aferição da genealogia de espécies, podendo estimar um ancestral comum entre espécies, ou seja, realizar análises filogenéticas e saber quais ancestrais as espécies em estudos compartilhavam, o qual o DNA mitocondrial possui características favoráveis para tal análise. Entretanto, em vários levantamentos genéticos realizados em diferentes espécies, foi constatada a presença de alguns padrões em que a genealogia das espécies estava ligeiramente ligada à geografia em que foram coletadas, ou seja, havia uma influência da geografia com a filogenia das espécies, desta maneira surgiu o termo “filogeografia”, o qual leva em consideração as dimensões espaciais e temporais da microevolução (AVISE, 1987; AVISE, 2009).

Avise (2000) cita que foram realizadas muitas tentativas de calibrar o DNA mitocondrial para o uso na filogeografia, porém, havia uma dificuldade em padronizar o marcador, devido a uma exigência do estudo filogeográfico, o qual o marcador deve possuir rápida evolução, tal característica foi observada em roedores por Auffray et al. (1990), em tartarugas por Lamb et al. (1989); Avise et al. (1992), anfíbios por Wallis e

Arntz (1989) , tubarões por Martin et al. (1992) e outros peixes por Canatore et al. (1994).

Outro fator que preocupava sobre a utilização de DNA mitocondrial na filogeografia, esta estava relacionado à taxa de evolução de cada gene dentro do DNA mitocondrial, os 13 genes do DNA mitocondrial não possuíam uma variação alta entre eles, porém uma região descoberta chamada região controle, possui uma taxa de evolução extremamente elevada quando comparada aos 13 genes do DNA mitocondrial, o qual possui uma utilidade especial para as análises filogeográficas (AVISE, 2000).

A região controle torna-se utilizável na filogeografia pelo fato de que possui um ritmo extremamente elevado de substituição de nucleotídeos e alto nível de polimorfismo intraespecífico (MCMILLAN E PALUMBI, 1997).

1.2.9 Variáveis de diversidade genética

A diversidade genética está relacionada com a variação do material genético que existe entre indivíduos dentro de uma espécie ou entre espécies. Inferir a diversidade genética nos estudos de filogeografia e genética de populações é necessário para descrever padrões importantes sobre a dinâmica da espécie. (TURCHETTO-ZOLET et al., 2013)

Dados que são provenientes de genomas organelares, tem como base as estimativas das variáveis de diversidade genética por meio do número de haplótipos, diversidade haplotípica, diversidade nucleotídica e teste de neutralidade de Fu (REF).

Dentre essas variáveis podemos estimar o número de haplótipos que condiz com a quantidade de haplótipos (genes ou alelos em determinado *loci*), esta variável nos permite saber o número exato de haplótipos nas sequências em estudo, obtidas a partir da análise de populações de *B. melanopterus*. A diversidade haplotípica também é uma variável importante, pois é a probabilidade de ao retirar aleatoriamente dois alelos de uma amostra, estes serem diferentes (NEI, 1973), é uma variável importante devido descrever o número de haplótipos diferentes existentes neste trabalho em todas as sequências obtidas de *B. melanopterus* e para cada uma das populações do estudo. Quando se trata de diversidade nucleotídica é a variável no qual se estima o número de diferença por *locus* entre duas sequências retiradas ao acaso de uma amostra (AVISE et al., 1987).

1.2.10 Índices de estrutura populacional

A estruturação genética em uma determinada população consiste no padrão das variações genéticas nas populações, sejam elas nos alelos ou nos genótipos da espécie em estudo, isso pode ocorrer por mudanças na estrutura gênica em função do tempo. Para a mensuração destas mudanças na estrutura populacional, utilizam-se modelos matemáticos capazes de estimar uma série de padrões populacionais caracterizando populações distintas, seja por meio de alelos, haplótipos e entre outros(REF).

Dentre os padrões estudados para dados obtidos a partir de genomas organelares podemos estimar a distribuição da variabilidade genética dentro e entre populações inferidas por meio de uma análise de variância molecular, onde este índice pode nos revelar a avaliação da proporção da variabilidade genética inserida entre e dentro das populações, índice proposto por Excoffier et al. (1992).

Entre os índices de diferenciação populacional o F_{ST} é um dos mais utilizados para a diferenciação das populações por meio da escala de Wright (1978), em que a magnitude da diferenciação entre as populações é caracterizada como pequena se os valores de F_{ST} estiverem entre 0 e 0,05, moderada caso os valores estejam no intervalo de 0,05 a 0,15, grande quando os valores estiverem entre 0,15 e 0,25 e extensa para valores acima de 0,25 (WRIGHT, 1978).

A geração de haplótipos diferentes entre a análise das sequências geradas, oferecem subsídios para a construção de uma rede de haplótipos, no qual é demonstrada a interação dos diferentes locais de amostragem e as sequencias obtidas podendo inferir possibilidades de interação entre as populações em estudo.

1.2.11 Estudos genéticos com o gênero *Brycon*

Os estudos filogeográficos com peixes têm sido em sua grande maioria realizados em regiões temperadas, no hemisfério norte, principalmente nos Estados Unidos e Europa (BEHEREGARAY, 2008). Apesar da biodiversidade elevada as regiões neotropicais ainda possuem poucos estudos direcionados a filogeografia, pouco é

conhecido sobre os padrões determinantes da distribuição espacial e temporal das linhagens de inúmeras espécies. (ORREGO, 2012).

Devido à fisiologia dos peixes ser totalmente voltada para viver em ambientes aquáticos, estes se tornam organismos ideais para pesquisar o passado geológico e as modificações ambientais e por consequência desses fatores a tendência é que tais animais também se tornem diferentes, ou seja, uma maior diversidade dentro de uma espécie, fato que é bastante evidenciado aos eventos de capturas em cabeceiras de rios e na drenagem dos mesmos (LUNDBERG, 1993; BERMINGHAM E MARTIN, 1998).

Atualmente a filogeografia é atrelada a análise do DNA mitocondrial em espécies animais. Há aproximadamente duas década, este marcador foi utilizado para compreender como indivíduos de uma mesma espécie são genealogicamente ligados por meio de ancestrais em comum (AVISE, 2000).

Em relação aos trabalhos genéticos envolvendo o gênero *Brycon* podemos citar o trabalho de Barroso et al. (2003) em que foram desenvolvidos loci de microssatélites dinucleotídeos para *Brycon opalinus*, nos quais foram testados também 2 indivíduos das espécies *Brycon amazonicus*, *Brycon lundii*, *Brycon microlepis* e *Brycon orbgnyanus* podendo ser útil para outros estudos genéticos.

Rodriguez-Rodrigues et al. (2010) realizou um trabalho acerca da diversidade genética da *Brycon opalinus* utilizando os microssatélites desenvolvidos por Barroso (2003). Neste estudo foram utilizados 44 reprodutores (22 machos e 22 fêmeas) selecionados de um lote mantido em cativeiro, formados a partir de uma coleta no rio Paraná em que foi feita uma reprodução induzida e foi verificada uma distância genética entre os parentais e alevinos e nesse processo houve perda de variabilidade genética.

Panarari-Antunes et al. (2011) desenvolveu um estudo com a *Brycon orbgnyanus* em que usou marcadores mitocondriais desenvolvidos por Cronin et al. (1993) e (MEYER, 1993), com a finalidade de amplificar a região controle e inferir os haplótipos dessa espécie em ambiente natural e em animais criados em cativeiro. Neste estudo foram capturados 60 indivíduos provenientes do rio Paraná e de uma fazenda de engorda em Maringá. O autor obteve neste estudo um fragmento de aproximadamente 540pb correspondendo ao *D-loop* a região variável do DNA mitocondrial, que foi sequenciada e usada para as análises. A população proveniente do ambiente natural mostrou 19 sítios polimórficos exclusivos e 4 deleções exclusivas, além disso foi

verificado que a variabilidade nucleotídica é mais alta nos animais de ambiente natural, havendo uma diferenciação entre as populações naturais e cultivadas.

Utilizando marcadores microssatélites di, tri e tetranucleotídeos Sanches et al. (2012) caracterizou a variabilidade genética da *Brycon orthotaenia* utilizando 44 exemplares selvagens que foram coletados em três pontos à jusante de uma barragem do rio São Francisco, no Sudeste do Brasil. Neste estudo os autores identificaram uma diferenciação genética de populações em uma pequena área de amostragem. Os autores sugerem que há uma população em um dos pontos coletados e nos outros dois pontos formam outra população com uma mistura de várias populações.

Ashikaga et al. (2015) realizou coletas de *Brycon orbignyanus* em diferentes pontos do rio da prata, com a ajuda de marcadores microssatélites descrito por Barroso et al. (2003) e do *D-loop* desenvolvido por Sivasundar et al. (2001) e Ashikaga et al. (2015), conseguiu caracterizar geneticamente a espécie. O autor identificou que a heterozigosidade esperada era maior que a heterozigosidade observada em todos os grupos, o mesmo resultado foi observado com o marcador mitocondrial *D-loop* por meio dos valores de diversidade genética, bem como o número de haplótipos de cada grupo, que corrobora com outros autores devido a espécie em estudo ser ameaçada de extinção. Além disso, ambos marcadores se mostraram similares em relação a estrutura genética das populações estudadas pelos autores que revelaram uma alta semelhança entre as populações.

De Oliveira et al. (2017) capturou exemplares de *Brycon amazonicus* e testou microssatélites desenvolvidos para outra espécie de *Brycon*. As coletas ocorreram em Tabatinga, Tefé e lago Janauacá, sendo estes de ambiente natural e coletou mais três pontos provenientes de pisciculturas na região. Com a amplificação de 10 marcadores amplificados e polimórficos para *B. amazonicus* encontrou variabilidade genética alta nos pontos em que coletou animais selvagens, quando comparado com a variabilidade genética de outras espécies de *Brycon*, e as amostras provenientes de piscicultura apresentaram variabilidade genética similar, pelo fato da retirada de reprodutores ser em ambiente natural.

Okazaki et al. (2017) caracterizou geneticamente a espécie *Brycon hilarii* utilizando marcadores microssatélites desenvolvidos por Sanches e Galetti, 2006 e por Barroso, 2003. Neste estudo foram coletados em seis diferentes locais do rio Paraguai,

rio Cuiabá, rio Taquari e rio Miranda, totalizando 190 indivíduos. Os autores encontraram níveis consideráveis de variabilidade genética, em que nenhuma diferenciação foi observada entre as amostras coletadas, utilizando análises de variância molecular e estrutura genética observou um nível de diferenciação entre as populações, o que corroborou na estatística bayesiana sugerindo duas populações, com menor apoio para a descoberta de uma população panmítica.

Quando se trata da espécie *B. melanopterus* os estudos com variabilidade genética é necessária para as bases de um futuro melhoramento genético, foram iniciados estudos com a região Citocromo Oxidase Subunidade I, no qual fez parte de um estudo de identificação de espécies publicado por Ardura, 2010. Estima-se que as populações selvagens de *B. melanopterus* possuem alta variabilidade genética por ser uma espécie que realiza migração reprodutiva e realiza cruzamentos ao acaso, em posse desses dados o presente estudo pode fomentar o melhoramento genético da espécie. Logo, este apresenta os dados de diversidade genética e estrutura populacional para esta importante espécie para a aquicultura amazônica, estimando a atual situação da variabilidade genética e a estrutura da população natural da *B.melanopterus* baseado nos pontos de amostragem ao longo da bacia Amazônica.

2 DIVERSIDADE GENÉTICA DE POPULAÇÕES SELVAGENS DE *Brycon melanopterus* (COPE, 1871) DA BACIA AMAZÔNICA

2.1 INTRODUÇÃO

A *Brycon melanopterus* (Cope, 1871), é uma espécie conhecida como jatuarana e matrinhã no Brasil e na Colômbia possui nome comum de sábalô negro ou yamú, pertencente à ordem Characiformes e família Characidae. É um peixe amplamente distribuído na calha dos rios Amazonas e Madeira no Brasil, Ucayali no Peru e Napo no Equador (LIMA, 2017).

Brycon melanopterus possui distinção morfológicas quando comparada com outras espécies que possuem o mesmo nome comum, frequentemente confundida com a *Brycon amazonicus*, por possuir o mesmo nome comum em algumas regiões (LIMA, 2003; 2017).

Essa espécie nativa é uma de grande interesse para a piscicultura no Brasil, por apresentar crescimento relativamente rápido quando alimentado com ração artificial, esse onívoro é uma das espécies chave na atividade piscícola no norte do Brasil. Em condições de cativeiro, pode atingir o tamanho comercial para o mercado (1,5kg) em aproximadamente 10 meses (IZEL E MELO, 2004). Nos últimos três anos a produção de *B. melanopterus* teve um incremento na produção e se apresenta como uma forte candidata para a criação em tanques-redes e locais com ampla movimentação de água, o que a torna uma das espécies largamente utilizadas no norte brasileiro, principalmente no Amazonas, por haver uma abundância e disponibilidade de ambientes propícios ao cultivo em tanques redes, utilizando altas taxas de estocagem, aumentando a produtividade por área (BRANDÃO et al., 2005).

A caracterização da variabilidade genética se torna imprescindível para o estudo de populações naturais, uma vez que a variabilidade genética é uma importante variável para aferir a situação dentro das populações, principalmente quando são espécies que possuem alto nível de captura proveniente da pesca. A perda de variabilidade genética pode tornar uma população mais suscetível a extinção, por esta não apresentar níveis de variação genética que possam responder a prováveis pressões seletivas ocasionadas geralmente por mudanças no meio ambiente (HAMOY et. Al, 2018)

A utilização de marcadores moleculares tais como o sequenciamento da alça D (*D-Loop*) do DNA mitocondrial é amplamente utilizada para estudos filogeográficos, sendo esta uma ferramenta adequada para a avaliação preliminar da variabilidade

genética em populações naturais (AVISE, 2000). Onde não há descrição de uso desta ferramenta para a espécie *B. melanopterus* sendo este trabalho de extrema importância para estudos futuros.

Este trabalho investigou a estrutura genética e a diversidade genética nas populações selvagens de *B. melanopterus* na bacia Amazônica, a fim de estabelecer dados de variabilidade genética para orientar futuros programas de conservação e gerenciamento da espécie. Desta forma o estudo contribuiu para definir a variabilidade genética atual e a diferenciação populacional interespecífica de *B. melanopterus*, para avançar na compreensão genética desta espécie de peixe migratório na bacia Amazônica, bem como discutir pesquisas futuras para a conservação da espécie e seu uso sustentável

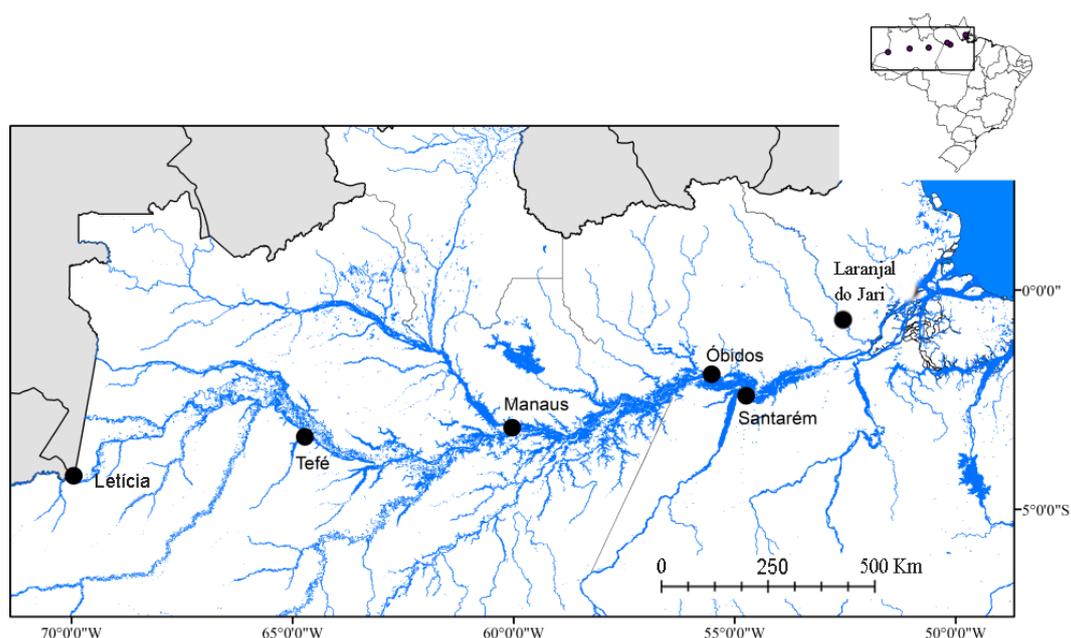
2.2 MATERIAL E MÉTODOS

2.2.1 Obtenção das amostras

Tendo em vista que uma análise filogeográfica necessita um amplo campo de coleta da espécie em estudo, a obtenção de amostras foi baseada em diversas viagens de campo para coleta de espécimes. Durante as amostragens em campo, os exemplares capturados tiveram uma amostra de tecido da nadadeira caudal retirada e colocadas em tubos eppendorf de 1,5ml devidamente etiquetados. O material testemunho foi fixado e etiquetado sendo depositado no setor de ictiologia do Museu Emilio Goeldi. Estas amostras foram acondicionadas em álcool (etanol PA) a uma concentração de 95%. O material foi coletado a partir de desembarque pesqueiro e identificados segundo Lima, 2017(Anexo).

As amostragens de *B. melanopterus* abrangem a calha principal da bacia do rio Amazonas. Foram obtidas amostras provenientes das bacias dos rios presentes nos municípios de Laranjal do Jari, Santarém, Óbidos, Manaus, Tefé e Letícia. Todos os indivíduos foram coletados com autorização do ICMBio, por meio do documento SISBIO N° 57471-2, bem como os procedimentos estão aprovados pela CEUA/UFRA sob numero de protocolo 036/2018.

Figura 4- Mapa identificando os locais de coleta das amostras de *B. melanopterus*



2.2.2 Extração e mensuração do DNA genômico

A extração do DNA foi realizada com o kit “*Wizard® Genomic DNA Purification Kit*”, da Promega. O protocolo de extração desse kit pode ser dividido em três etapas: a desnaturação da amostra, separação de proteínas e hidratação do DNA. A desnaturação das amostras foi realizada com a adição de EDTA e *Nuclei Lysis Solution* com proteinase K, Posterior a isso é realizado a degradação do RNA com a *RNase*, a separação de proteínas com *Protein Precipitation Solution*, realiza-se a precipitação do DNA com isopropanol e a purificação do DNA com etanol e por fim a hidratação com *Rehydration Solution*.

O produto da extração de DNA foi submetido a um processo de mensuração, o qual afere a qualidade do DNA por meio da absorbância e sua quantidade em ng/ μ l utilizando um espectrofotômetro de precisão BioDrop Duo.

2.2.3 Amplificação e Sequenciamento do marcador molecular

As amplificações de DNA mitocôndria foram realizadas por meio de reação de cadeia em polimerase (PCR). Tais reações utilizaram como reagentes *Taq DNA Polymerase* (native) 500U e *DNTP Mix*.

Os oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) deste trabalho foram desenvolvidos para a espécie *Brycon orbignyanus*, o *primer forward* utilizado foi o FFFT-F 5' GCC TAA GAG CAT CGG TCT TGT AA 3', descrito por Sivasundar et al. (2001) e o *primer reverse* foi o RCR1 5'CCT GAA GTA GGA ACC AGA TG-3', descrito por Ashikaga et al. (2015).

As reações de amplificação de PCR foram realizadas em termocicladores de 96 poços para tubos de 0,2ml da marca *Applied Biosystem*, modelo *Simpli amp* e *Applied Biosystem*, modelo 2720. O programa utilizado seguiu os seguintes passos: i) desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos; ii) 30 ciclos de amplificação seguindo os passos: a) desnaturação inicial a 95°C por um minuto; b) anelamento dos iniciadores nas temperaturas de 50, 54 e 56°C durante um minuto; c) extensão do fragmento durante um minuto a 72°C; iii) extensão final do fragmento a 72°C durante trinta minutos; iv) resfriar por cinco minutos a 10°C. Os resultados da amplificação de DNA foram observados em gel de agarose a 1% corados por *SYBR Safe DNA gel stain* (Invitrogen),

em transiluminador de led azul. A eletroforese foi realizada em cuba a 80 volts por trinta e cinco minutos em tampão TBE 1%.

Os resultados das ampliações considerados positivos foram submetidos a purificação usando o kit de purificação *GFX PCR DNA and gel band purification kit* (GE Healthcare), a reação foi realizada por meio de colunas filtrantes e centrifugação.

O sequenciamento foi efetuado usando sequenciador automático de capilar *Applied Biosystems 3130 Genetic Analyzer e BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit* (Applied Biosystem) no Laboratório de Genética Humana e Médica, do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará (<http://lghm.ufpa.br/>).

2.2.4 Análise estatística

As sequências obtidas foram alinhadas no programa Clustalw (THOMPSON et al., 1994) implementado no software BIOEDIT 7.2.6 Hall (1999) e editadas manualmente. Para a construção de banco de dados em vários formatos e foi necessário utilizar os softwares PAUP* versão 4.0a147 (SWOFFORD, 2003) para posteriormente exportar os bancos de dados para o formato MEGA e PHYLIP, para os demais formatos foram utilizados os softwares PGD Spider (LISCHER E EXCOFFIER, 2011) e DNA SP que também possui diversos formatos de saída.

-Variabilidade genética (índices de diversidade e diferenciação genética)

A análise da variabilidade genética da população foi realizada por meio da aferição da frequência de haplótipos da região controle, os índices de diversidade haplotípica e nucleotídica (NEI, 1987), foi aplicado também o teste de neutralidade F_S de Fu (FU, 1997) que foram realizadas no software DNASP v. 5.10.01 (ROZAS et al., 2003; LIBRADO E ROZAS, 2009).

Os testes de neutralidade seletiva de Tajima (D) (TAJIMA, 1989) e de Fu (F_S) (FU, 1997) foram estimados para cada agrupamento de localidades para verificar possíveis desvios da neutralidade na região genética avaliada nas populações, bem como para fazer inferências sobre a história populacional das mesmas. Valores de D e F_S significativamente negativos sugerem excesso de mutações recentes, seleção direcional recente ou efeito carona (FU, 1997). Valores significativamente positivos sugerem

seleção balanceadora, subdivisão populacional ou efeito gargalo de garrafa (TAJIMA, 1989).

As estimativas da diferenciação genética entre os pares de população foram obtidas por meio dos índices de fixação F_{ST} (WEIR E COCKERHAM, 1984). A fragmentação da variação genética dentro e entre as populações de *B. melanopterus* foi estimada por meio da Análise de Variância Molecular (AMOVA)(EXCOFFIER E LISCHER, 2010). Estas análises foram realizadas por meio do software Arlequin v. 3.5 (EXCOFFIER E LISCHER, 2010).

-Rede de haplótipos

O programa Network 5.0 (Fluxus Technology Ltd. <http://www.fluxus-engineering.com>) foi utilizado para a construção da rede de haplótipo utilizando dados da região *D-loop* do DNA mitocondrial baseada no algoritmo *median joining* (BANDELT et al., 1999)

2.3 RESULTADOS

O mtDNA foi amplificado com *primers* heterólogos para região *D-loop* de 99 indivíduos de *B. melanopterus* de seis diferentes áreas em que foram sequenciados, produzindo fragmentos parciais com tamanho médio de 600 pares de bases.

Os resultados do BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) indicaram homologias a partir de 62% com 2 outras espécies do mesmo gênero (*Brycon orbignyanus* e *Brycon* sp.) que possuem depósito de sequências da região controle (*D-loop*) na biblioteca pesquisada. A maior taxa de similaridade foi identificada com sequências parciais da região *D-loop* para a espécie *B. orbignyanus* (acima de 91% de identidade) da região sudeste do Brasil.

A partir do sequenciamento da região *D-loop* dos indivíduos foram constatados 42 haplótipos mitocondriais (Tabela 1) identificados nos grupos amostrais da pesquisa sendo que os haplótipos número 13 e 15 foram os mais frequentes, ocorrendo em 11 dos indivíduos distribuídos em três grupos distintos. Além disso, houve 29 casos de haplótipos únicos.

Tabela 1- Número de indivíduos por haplótipo e sua distribuição dentro dos grupos de *B. melanopterus*.
Lengenda: JAR- Laranjal do Jari, STM- Santarém, OBD- Óbidos, MAO- Manaus, TFF- Tefé e LET- Letícia.

Haplótipos	JAR	STM	OBD	MAO	TFF	LET
Hap 1	-	-	2	2	-	2
Hap 2	6	-	2	-	2	-
Hap 3	1	1	1	2	1	-
Hap 4	-	-	1	1	-	-
Hap 5	-	-	1	-	-	-
Hap 6	-	-	1	-	-	-
Hap 7	1	2	1	5	-	-
Hap 8	-	-	2	-	-	-
Hap 9	-	1	1	-	-	-
Hap 10	-	-	1	-	-	-
Hap 11	-	-	1	-	-	-
Hap 12	-	-	1	-	-	-

Hap 13	-	6	-	3	-	2
Hap 14	-	-	-	3	-	-
Hap 15	5	-	-	4	2	-
Hap 16	-	-	-	1	-	-
Hap 17	-	-	-	1	-	-
Hap 18	-	-	-	1	-	-
Hap 19	-	-	-	1	-	-
Hap 20	-	-	-	-	-	1
Hap 21	-	-	-	-	-	1
Hap 22	-	-	-	-	1	-
Hap 23	-	-	-	-	1	-
Hap 24	-	-	-	-	1	-
Hap 25	-	-	-	-	3	-
Hap 26	-	-	-	-	1	-
Hap 27	-	-	-	-	1	-
Hap 28	-	-	-	-	1	-
Hap 29	-	-	-	-	1	-
Hap 30	-	-	-	-	1	-
Hap 31	-	1	-	-	-	-
Hap 32	-	3	-	-	-	-
Hap 33	-	1	-	-	-	-
Hap 34	-	2	-	-	-	-
Hap 35	-	1	-	-	-	-
Hap 36	-	-	-	-	1	-
Hap 37	-	1	-	-	-	-
Hap 38	-	1	-	-	-	-
Hap 39	-	1	-	-	-	-
Hap 40	-	-	-	1	-	-
Hap 41	1	-	-	-	-	-
Hap 42	1	-	-	-	-	-

Com a análise realizada sob a tabela 2 foi possível mensurar que as amostras provenientes de Laranjal do Jari foram constatadas o menor número de haplótipos mitocondriais, bem como o número de sítios polimórficos (três e nove respectivamente)

enquanto as amostras obtidas em Tefé apresentaram os maiores valores para o número de haplótipos e sítios polimórficos (dez e oitenta e cinco, respectivamente).

Quando se trata de diversidade genica pode-se observar novamente na tabela 2 que os maiores valores para estas variáveis foram atrelados a amostras coletadas no município de Tefé com valores de 0.9487 +/- 0.0506, enquanto o menor valor de diversidade gênica está atrelado a amostras coletadas em Santarém. Os valores de diversidade nucleotídica se comportaram de forma diferente da diversidade gênica, apresentando os maiores valores para as amostras coletadas nos municípios de Letícia (0.278280 +/- 0.163251), enquanto os menores valores foram atrelados as coletas realizadas no município de Laranjal do Jari (0.010557 +/- 0.007528).

Tabela 2- Estimativas da diversidade genética dos seis grupos amostrais contemplando número amostral (N), Diversidade Nucleotídica, Diversidade haplotípica, Número de Haplótipos (Nh) e Número de Sítios Polimórficos dos grupos formados pelas amostras de *B. melanopterus*.

População	N	Diversidade Haplotípica	Número de Haplótipos	Nº de sítios polimórficos	Diversidade nucleotídica
Laranjal do Jari (AP)	20	0.8158 +/-	7	23	0.018453
		0.0496			+/-
Santarém(PA)	21	0.9048 +/-	12	61	0.011211
		0.0482			+/-
Óbidos(PA)	15	0.9333 +/-	12	99	0.188386
		0.0397			+/-
Manaus(AM)	20	0.9263 +/-	11	82	0.081473
		0.0338			+/-
Tefé(AM)	17	0.9632 +/-	13	92	0.126123
		0.0328			+/-
Letícia(AM-CO)	6	0.8667 +/-	4	91	0.219109
		0.1291			+/-
					0.112342
					0.271951
					0.159456

Os valores de neutralidade D de Tajima e Fs de Fu se apresentaram negativos e estatisticamente significativos, indicativo de um estado de expansão das populações como se pode verificar na Tabela 3.

Tabela 3- Valores de teste de neutralidade (D de Tajima e Fs de Fu) para os grupos de *B. melanopterus*. *P<0,05.

População	D de Tajima	Valor de P	Fs de Fu	Valor de P
Laranjal do Jari (AP)	-2.05032	0.00900*	-3.253	0.037*
Santarém (PA)	3.29980	1.00000	-0.779	0.230
Óbidos (PA)	-0.69482	0.26000	-1.368	0.203
Manaus (AM)	-0.42978	0.39000	-1.986	0.121
Tefé (AM)	1.36091	0.95100	1.432	0.282
Letícia (AM-CO)	0.76900	0.79200	1.602	0.832

Tabela - 4 Valores obtidos para os índices de Fixação Interpopulacional (F_{ST}) par a par para a espécie *B. melanopterus*. *P<0,05.

	JAR	STM	OBD	MAO	TFF	LET
JAR	0.00000					
STM	0.26156	0.00000				
OBD	0.06714	0.15460	0.00000			
MAO	0.06900	0.05937	0.02942	0.00000		
TFF	0.26787	0.04797	0.15167	0.07153	0.00000	
LET	0.40190	0.03000	0.16200	0.11725	0.03893	0.00000

Ao realizar a análise de F_{ST} par a par foi possível constatar quais grupos possuem uma proximidade e também constatar os grupos mais distantes entre si, verificando na tabela 4 podemos observar que o maior valor de F_{ST} foi determinado na comparação das amostras coletadas no município de Letícia e Laranjal do Jari (0,40190) e o menor valor foi entre as amostras coletadas no município de Óbidos e Manaus (0,02942).

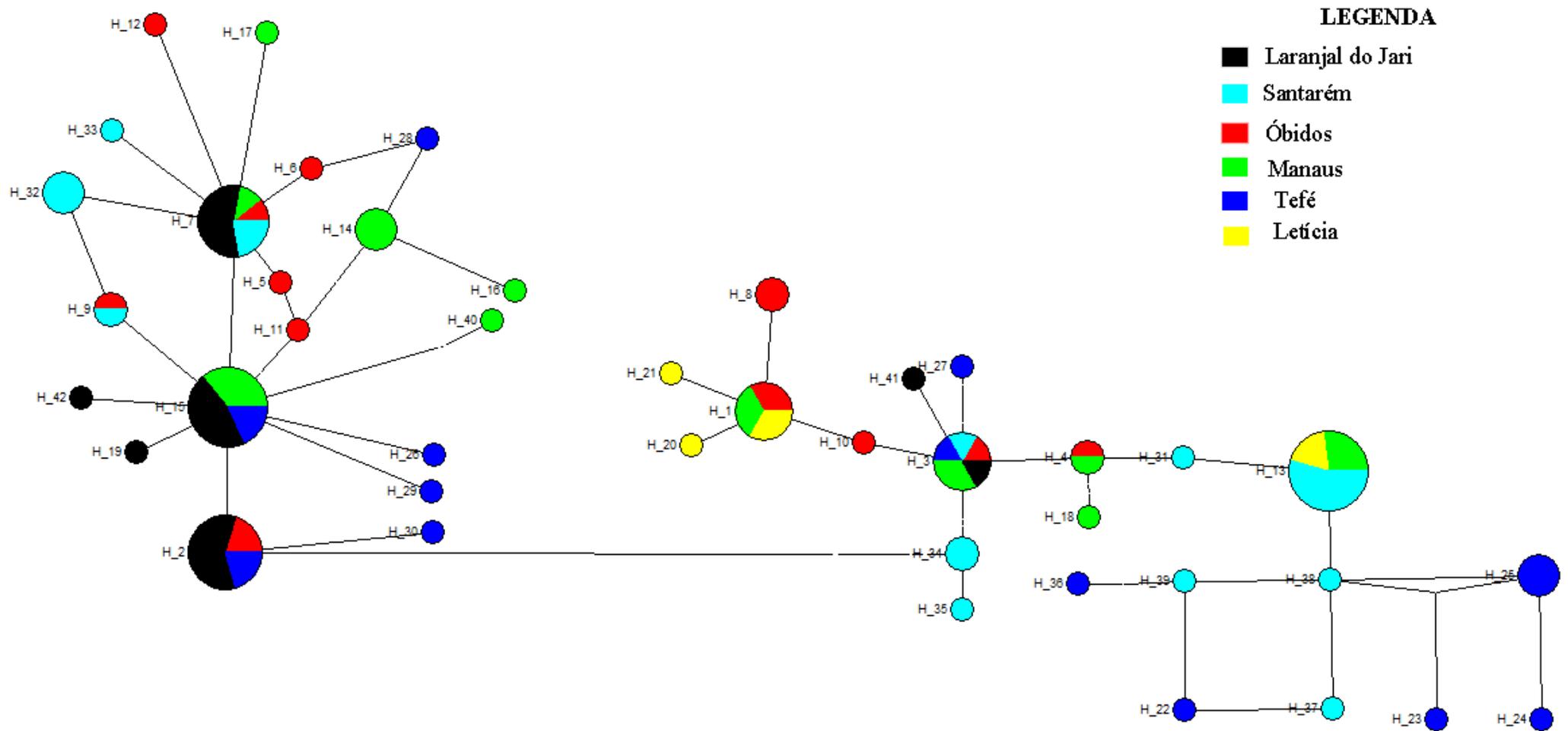
Tabela-5 Análise de Variância Molecular (AMOVA). *P< 0,05

Fonte de Variação	Soma dos quadrados	Componentes de variação	% de variação
Entre grupos	863,190	6,37577	8,41
Entre indivíduos dentro dos grupos	6460,386	69,46651	91,59
Total	7323,576	75,84228	

Segundo a análise de variância molecular (AMOVA) como apresentado na tabela 5 podemos identificar que a maior fonte de variação está contida dentro dos grupos amostrados com 91,59% de variação. Ainda nesta análise foi possível constatar por meio do F_{ST} para todos os grupos um valor de 0,084 sendo este valor suficiente para caracterizar uma estruturação genética entre os grupos segundo a escala de Wright (1978).

Assim como os dados obtidos pela AMOVA e as comparações de F_{ST} par a par podemos verificar a homogeneidade da rede de haplótipo havendo apenas uma pequena estruturação de populações referentes a um dos grupos que apresentou uma diferenciação populacional expressiva no qual podemos verificar na figura 5 em que a rede de haplótipos está colorida de acordo com o grupo que representa e o tamanho do ícone que representa os haplótipos está de acordo com a frequência em que este aparece nos dados obtidos a partir deste estudo.

Figura 5- Rede de haplótipos de *B. melanopterus* calculada pelo método Median Joining. Os círculos coloridos representam os haplótipos, sendo este de tamanho proporcional a frequência deste haplótipo.



2.4 DISCUSSÃO

Foi pesquisado a variabilidade genética em seis coleções de *B. melanopterus* ao longo da calha principal da bacia amazônica para acessar e caracterizar a estruturação genética e diversidade genética, bem como suas implicações no manejo pesqueiro e conservação. Os resultados desta pesquisa indicaram uma variabilidade genética considerável. Houve estruturação em dois grupos distintos onde Laranjal do Jari e Letícia divergiram e as amostras coletadas entre esses dois municípios não apresentaram padrão de variação. Resultados de F_{ST} , AMOVA, e análises de estrutura genética sugerem duas populações de *B. melanopterus* revelando duas unidades de reprodução.

Durante as análises foram constatados a presença de 42 haplótipos mitocondriais, para outros peixes migratórios de outros taxa porém da mesma região foram encontrados valores de 12 haplótipos para piranhas do gênero *Pygocentrus* (Mateussi et al., 2019), e fora da região de estudo foi estimado para *Brycon nattereei* a presença de cinco haplótipos, na região sudeste do Brasil (GALINDO et al., 2019). A partir destes dados foi possível verificar que havia a presença de haplótipos que são compartilhados entre as demais populações como ocorre em trabalhos realizados para as diferentes espécies de *Pygocentrus* (Mateussi et al., 2019).

A partir desses procedimentos foram descobertos os valores de diversidade genética (D_h) para as populações investigadas: Laranjal do Jari ($D_h=0,8158$), Santarém ($D_h=0,9048$), Óbidos ($D_h=0,9333$), Manaus ($D_h=0,9263$), Tefé ($D_h=0,9632$) e Letícia ($D_h=0,8667$). Esses dados quando comparados com estudos de populações selvagens de outras espécies de populações naturais de *Brycon*, estimados com os mesmos marcadores, apresentam-se semelhantes como podemos observar no trabalho de Ashikaga et al. (2015) que obteve dados de D_h média de 0,8301 para a espécie *Brycon orbignyianus*, também observado no trabalho de Galindo et al., 2019 valores de D_h média de 0,616 e para *Brycon falcatus* também na região amazônica apresentaram valores de D_h de 0.888. Os possíveis motivos pelos quais as populações naturais apresentam uma alta taxa genética se dão pelo fato de que estas possuem uma taxa de migração populacional elevada, heterogeneidade ambiental e características específicas a história de vida das espécies, favorecendo o rápido crescimento populacional (NEI, 1987). Segundo Oberdoff et al, 2019 existe a hipótese de estar ocorrendo a redução de riqueza de espécies no sentido oeste-leste, fazendo com que a taxa de dispersão dos animais seja maior para o fluxo acima do rio, esta inferência reflete diretamente a

diversidade nucleotídica obtida neste trabalho, observa-se um gradiente decrescente na diversidade nucleotídica à medida que analisamos pontos rio abaixo, corroborando com os estudos de diversidade de peixes de água doce estimado nas bacias amazônicas por meio da correlação com sua geomorfologia.

O menor valor encontrado para a diversidade nucleotídica nos estudos de Ashikaga, 2015 foi de 0 para os animais cultivados e para os de ambiente natural o menor foi de 0,05, Arruda, 2019 constatou diversidade nucleotídica para *Brycon falcatus* na região Amazônica de 0,074 e para *Brycon amazonicus* de 0,01, resultados que se aproximam com os dados obtidos no presente trabalho onde o menor dado foi de 0,01. Quando se compara estes resultados com os obtidos por Ferreira et al. (2016), Paixão et al. (2018) com estudos realizados com espécies de ambiente natural utilizando marcadores mitocondriais com a especificidade da região *D-loop* deste estudo podemos verificar os índices de variabilidade genética se aproximam também com os dados obtidos para o estudo com a espécie *B. melanopterus* em que para Ferreira, 2016 encontrou o menor dado de diversidade nucleotídica para a espécie *Prochilodus lineatus* de 0,01, corroborando com os dados apresentados neste estudo e Paixão et al. (2018) encontra valores mínimos para *Steindachneiridion scriptum* de até 0,007, Ferreira, 2019 descreve a diversidade nucleotídica para *Brycon nattereri* e encontra 0,0014, valores abaixo dos que foram encontrados para este estudo.

Quando comparados os dados de estrutura genética entre todos os grupos de amostra do presente trabalho podemos inferir que existe estruturação populacional pelos valores de F_{ST} entre algumas populações, estes demonstram pela escala de Wright que fala que para qualquer valor diferente da hipótese nula de panmixia, estimativas de F_{ST} entre (0 e 0,050) indicam baixo distanciamento genético; entre (0,050 e 0,150) moderado distanciamento genético; entre (0,150 e 0,25) alto distanciamento genético; e acima de 0,25 extenso distanciamento genético (WRIGHT, 1978). Neste estudo foi verificado que o F_{ST} par a par segundo a escala de Wright, os grupos Óbidos – Santarém, Óbidos – Manaus, Letícia – Tefé e Tefé – Santarém possuem baixa diferenciação populacional, as amostras entre Laranjal do Jari – Óbidos, Letícia – Óbidos, Tefé – Óbidos, Manaus – Laranjal do Jari, Manaus – Letícia, Manaus – Tefé e Manaus – Santarém de acordo com os valores de F_{ST} possui moderada diferenciação populacional, já os grupos Laranjal do Jari – Letícia, Laranjal do Jari – Tefé e Laranjal do Jari – Santarém tiveram valores de F_{ST} representando extensa diferenciação

populacional. Diversos fatores contribuem para a moderada e extensa diferenciação populacional, dentre eles o fator geográfico. Apesar da espécie *B. melanopterus* realizar grandes migrações, existem inúmeras variáveis ambientais que podem influenciar diretamente na diferenciação genética desses animais. Observa-se que os animais coletados no município de Laranjal do Jari foram caracterizados com extensa diferenciação populacional o que revela indícios de formação de dois estoques.

Assim como os dados obtidos pelo F_{ST} no qual há diferenciação populacional principalmente quando observamos os pontos de coletas mais extremos como Laranjal do Jari e Letícia, e entre estas localidades percebe-se tanto por meio do F_{ST} quanto pela rede de haplótipos que não há um padrão de diferenciação entre as populações localizadas entre Laranjal e Letícia, situações similares ocorreram nos trabalhos de Ferreira (2012) que encontrou diferenciação entre espécies do gênero *Hypophthalmus* realizados na região amazônica, outro estudo que corrobora com o dado encontrado foi Ribeiro (2013) que observou a divergência de populações com uma diferenciação, porém dentro de um grupo não apresentava padrão de diferenciação, similar aos dados achados no presente estudo. Na rede de haplótipos podemos observar com maior clareza a separação populacional, onde se verifica dois grandes grupos, um com os haplótipos mais próximos dos resultados obtidos em Laranjal do Jari e outro mais próximo de Letícia, e entre eles podemos observar que há um compartilhamento de haplótipos entre as populações, onde não se consegue verificar um gradiente de diferenciação, o que corrobora com os resultados do F_{ST} obtido, pois algumas dessas populações têm pequena e moderada diferenciação como foi supracitado anteriormente. Porém a tendência natural é que animais selvagens apresentem estrutura genética diferente, pois são unidades evolutivas independentes, submetidos a condições ambientais diferentes.

Os resultados obtidos neste estudo implicam diretamente no fluxo gênico entre as populações da bacia Amazônica. Como há uma grande diversidade de ambientes e formações geológicas diferentes ao longo de toda bacia amazônica, isso pode estar diretamente relacionado a diversidade de peixes de água doce ao longo da bacia Amazônica (OBERDOFF et al., 2019). Como se pode observar nos valores de F_{ST} e na estimativa de estrutura populacional realizada, foi constatado que há diferenciação quando os pontos de coleta se afastam, como se comprova nos pontos de Laranjal do Jari e Letícia que possuem uma grande diferenciação populacional e as amostragem entre esses locais não revelam um padrão de diferenciação, esta característica pode ser

explicada por um comportamento inesperado da migração de peixes, devido a diversos fatores como heterogeneidade ambiental, clima, contingências históricas que explicam os padrões da bacia Amazônica.

Foram realizados também os testes de neutralidade de Tajima e F_s de Fu, estes apresentaram em sua maioria valores negativos, que corroboram com resultados obtidos por Ashikaga et al. (2015) em que observa que em populações naturais de *B. orbignyanus* a expansão populacional por meio dos resultados negativos obtidos a partir de dados da região *D-loop*, este resultado também foi descrito para outras espécies utilizando a região controle do DNA mitocondrial como podemos comprovar pelo estudo realizado com a espécie *Steindachneiridion scriptum* apresentou um comportamento de expansão populacional.

Os padrões de variabilidade genética encontrados dentro e entre as populações na AMOVA foram realizados entre as áreas amostradas, as populações apresentaram valores estatisticamente significativos de AMOVA, que resultou em 8,41% de diferença entre grupos, ou seja, este teste revelou uma diferenciação entre as populações o qual já tinham sido evidenciados por outros testes, desta forma corroboram com os valores apresentados no F_{ST} , mesmo havendo baixa diferenciação entre alguns locais, porém houve uma predominância da diferenciação populacional, a rede de haplótipos reafirma isto mostrando a diferença entre os pontos extremos e a formação de dois agrupamentos o que reforça a diferenciação populacional calculada pelo F_{ST} e pela AMOVA. Os dados obtidos corroboram com estudos realizados por Ashikaga et al. (2015) no qual obteve 20% de diferenciação entre grupos, porém em uma população da espécie de *Brycon orbignyanus* ameaçada de extinção. Entretanto Okazaki et al. (2017) que estudou populações naturais de *B. hilarii* encontrou valores de 0,96% para os valores de AMOVA, fato que pode estar relacionado aos pontos de amostragem e considerar que os exemplares da espécie *Brycon* possuem uma grande capacidade migratória e nestes tributários apresentaram pouca estrutura populacional que difere do que foi encontrado neste estudo.

2.5 CONCLUSÃO

Baseado em comparações genéticas da região *D-loop* do DNA mitocondrial em populações naturais de *B. melanopterus* na bacia Amazônica e seus afluentes pode-se concluir que:

- A variabilidade genética da espécie ainda se mantém alta mesmo com os altos índices de exploração da espécie, quando comparada com estudos realizados para outras populações do gênero *Brycon* utilizando os mesmos marcadores do estudo.

- As populações estudadas apresentaram significativa diferenciação populacional entre as amostras proveniente de Laranjal do Jari e Letícia, enquanto as amostras coletadas entre esses dois municípios não possuem um padrão de variação, entretanto possuem relações de diferenciação baixa e moderada.

-O presente resultado mostra que políticas de manejo pesqueiro e conservação de *B. melanopterus* existem indícios de pelo menos duas unidades evolutivas distintas coexistindo nos tributários da bacia amazônica. As localidades que apresentaram F_{ST} considerando baixa ou moderada a diferenciação devem ser consideradas unidades similares, fato que deve ser mais bem estudado com o auxílio de marcadores de evolução mais lenta e corroborar com os dados obtidos neste trabalho a fim de que a informação obtida seja levada em consideração em caso de planos de manejo que contemplem a manutenção de *pool* genético dos locais estudados.

REFERÊNCIAS

- ALCÂNTARA, N. C.; GONÇALVES, G. S.; BRAGA, T. M. P.; SANTOS, S. M.; ARAÚJO, R. L.; LIMA, J. P.; ARIDE, P. H. R.; OLIVEIRA, A. T. Avaliação do Desembarque Pesqueiro (2009-2010) no Município de Juruá, Amazonas, Brasil. **Biota Amazônia**, v. 5, n. 1, p. 37-42. 2015.
- AQUADRO, C. F.; GREENBERG, B. D. Human mitochondrial DNA variation and evolution: Analysis of nucleotide sequences from seven individuals. **Genetics**, v. 103, p. 287-312. 1983.
- ARIAS, J. A. Estado actual del conocimiento sobre el yamú, *Brycon amazonicus*. **Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias**, v. 19, p. 125-133. 2006.
- ASHIKAGA, F. Y.; ORSI, M. L.; OLIVEIRA, C.; SENHORINI, J. A.; FORESTI, F. The endangered species *Brycon orbignyanus*: genetic analysis and definition of priority areas for conservation. **Environmental Biology of Fishes**, v. 98, n. 7, p. 1845-1855. 2015.
- AUFFRAY, J. C.; VANLERBERGHE, F.; BRITTON-DAVIDSON, J. The house mouse progression in Eurasia: A paleontological and achaeozoological approach. **Biological Journal of the Linnean Society**, v. 41, p. 13-25. 1990.
- AVISE, J. C. Mitochondrial DNA and the evolutionary genetics of higher animals. **Phil. Tians. Soc. Lond.**, v. 3, n. 2, p. 325-342. 1986.
- AVISE, J. C. **Phylogeography: the history and formation of species**. Cambridge, Massachusetts: Harvard University Press, 2000.
- AVISE, J. C. Phylogeography: retrospect and prospect. **Journal of Biogeography**, v. 36, n. 1, p. 3-15. 2009.
- AVISE, J. C.; ARNOLD, J.; BALL, R. M. J.; BERMINGHAM, E.; NEIGEL, J. E.; REEB, C. A.; SAUNDERS, N. C. Intraspecific phylogeography: The mitochondrial DNA bridge between population genetic and systematics. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v. 18, p. 489-522. 1987.
- AVISE, J. C.; BOWEN, W.; LAMB, T.; MEYLAN, A. B.; BERMINGHAM, E. Mitochondrial DNA evolution at turtle's pace: Evidence for low genetic variability and reduced microevolutionary rate in the Testudines. **Molecular Biology and Evolution**, v. 9, p. 457-473. 1992.

- BALDISSEROTO, B.; GOMES, L. D. C. **Espécies nativas para piscicultura no Brasil.** UFSM, 2013.
- BALLOUX, F.; LUGON-MOULIN, N. The estimation of population differentiation with microsatellite markers. **Molecular Ecology Notes**, v. 11, p. 155-165. 2002.
- 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.
- BARROSO, R. M.; HILSDORF, A. W. S.; MOREIRA, H. L. M.; MELLO, A. M.; GUIMARAES, S. E. F.; CABELLO, P. H.; TRAUB-CSEKO, Y. M. Identification and characterization of microsatellites loci in *Brycon opalinus* (Cuvier, 1819) (Characiforme, Characidae, Bryconia). **Molecular Ecology Notes**, v. 3, n. 2, p. 297-298. 2003.
- BARTHEM, R.; GOULDING, M. **Um ecossistema inesperado. A Amazônia revelada pela pesca.** 2007.
- BATISTA, J. S. Variabilidade genética da dourada e da piramutaba na bacia Amazônica. In: FABRÉ, N. N. e BARTHEM, R. (Eds.). **O Manejo da pesca dos grandes bagres migradores: piramutaba e dourada no eixo Solimões-Amazonas.** IBAMA/ Pró Varzea. Manaus. 2005. p.15-19.
- BATISTA, V. S.; PETRERE JR, M. Characterization on the commercial fish production landed at Manaus, Amazonas State, Brazil. **Acta amazonica**, v. 33, n. 1, p. 155-165. 2003.
- BEHEREGARAY, L. Twenty years of phylogeography: the state of the field and the challenges for the Southern Hemisphere. **Molecular Ecology**, v. 17, p. 3754-3774. 2008.
- BERMINGHAM, E.; MARTIN, A. P. Comparative mtDNA phylogeography of neotropical freshwater fishes: testing shared history to infer the evolutionary landscape of lower Central America. **Molecular Ecology**, v. 7, p. 499-517. 1998.
- BORGES, G. A. **Ecologia de Três Espécies do Gênero *Brycon* Müller e Troschel, 1844 (Pisces-Characidae), Rio Negro-Amazonas, com ênfase na caracterização taxonômica e alimentação.** 1986. 149p. (Dissertação de Mestrado). Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Universidade do Amazonas, Manaus, 1986.
- BRANDÃO, F. R.; GOMES, L. D. C.; CHAGAS, E. C.; ARAÚJO, L. D. D.; SILVA, A. L. F. D. Densidade de estocagem de matrinxã (*Brycon amazonicus*) na recria em tanque rede. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 40, n. 3, p. 299-303mar. 2005.

BROWN, G. G. Structural conservation and variation in the Dloop containing region of vertebrate mitochondrial DNA. **Journal of Molecular Biology**, v. 192, p. 503-511. 1986.

BROWN, K. H. Fish mitochondrial genomics: sequence, inheritance and functional variation. **Journal of Fish Biology**, v. 72, n. 2, p. 355-374. 2008.

CALCAGNOTTO, D.; TOLEDO-FILHO, S. Loss of genetic variability at the transferrin locus in five hatchery stocks of tambaqui (*Colossoma macropomum*). **Genet Mol Res**, v. 23, n. 1. 2000.

CANATORE, R.; ROBERTI, M.; PESOLE, G.; LUDOVICO, A.; MILELLA, F.; GADALETA, M. N.; SACCONI, C. Evolutionary analysis of cytochrome b sequences in some Perciformes: Evidence for a slower rate of evolution than in mammals. **Journal of Molecular Evolution**, v. 39, p. 589-597. 1994.

CARDOSO, R. S.; FREITAS, C. E. C. Characterization on the commercial fish production landed at Manaus, Amazonas State, Brazil. **Acta Amazonica**, v. 37, n. 4, p. 605-612. 2007.

CORNUET, J. M.; LUIKART, G. Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data. **Genetics**, v. 144, n. 3, p. 2001-2014. 1996.

COSTA, F. R. **Estudo das relações genômicas em espécies de Caricaceae com base em marcadores citomoleculares**. 2008. p. (Tese de doutorado). Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes/RJ, 2008.

COUNCIL, N. R. Upstream: salmon and society in the Pacific Northwest. **National Academy**. 1996.

CRONIN, M. A.; SPEARMAN, W. J.; WILMOT, R. L.; PATTON, J. C.; BICKHAM, J. W. Mitochondrial DNA variation in chinook (*Oncorhynchus tshawytscha*) and chum salmon (*O. keta*) detected by restriction enzyme analysis of Polymerase Chain Reaction (PCR) products. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v. 50, p. 708-715. 1993.

DE OLIVEIRA, R. C.; SANTOS, M. D. C. F.; BERNARDINO, G.; HRBEK, T.; FARIAS, I. P. From river to farm: an evaluation of genetic diversity in wild and aquaculture stocks of *Brycon amazonicus* (Spix & Agassiz, 1829), Characidae, Bryconinae. **Hydrobiologia**, v. 805, n. 1, p. 75-88. 2017.

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. 1131, p. 479-491. 1992.

FAO. FAO. **El estado mundial de la pesca y la acuicultura**. (Ed.): 200 p. 2014.

FAO. FAO. **The State of World Fisheries and Aquaculture 2016**. (Ed.): 200 p. 2016.

FERREIRA, D. G.; SHIBATTA, L. S.; SHIBATTA, O. A.; SOFIA, S. H.; CARLSSON, J.; DIAS, J. H. P.; MAKRAKIS, S.; MAKRAKIS, M. C. Genetic structure and diversity of migratory freshwater fish

in a fragmented Neotropical river system. **Rev Fish Biol Fisheries**. 2016.

FERREIRA, E. S. **Variabilidade genética, estrutura populacional e filogeografia do mapará (*hypophthalmus marginatus valenciennes*, 1840 - pimelodidae, siluriformes) no estado do pará, utilizando sequências de DNA mitocondrial**. 2012. 65p. Universidade Federal do Oeste do Pará, Santarém, 2012.

FU, Y. X. Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. **Genetics**, v. 147, n. 2, p. 915-25Oct. 1997.

GONÇALVES, C.; BATISTA, V. S. Characterization on the commercial fish production landed at Manaus, Amazonas State, Brazil. **Acta amazon**, v. 38, n. 1, p. 135-144. 2008.

HALL, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic acids symposium series** 1999.

HAMOY, I.; GUERREIRO, S.; ARARIPE, J.; SANTOS, S. Genética molecular aplicada à conservação de peixes amazônicos. In: (Eds.). **Ecossistemas Aquáticos: Tópicos Especiais**. Belém - PA. 2018.

HANFLING, B.; BRANDL, R. Genetic variability, population size and isolation of distinct populations in the freshwater fish *Cottus gobio* L. **Molecular Ecology**, v. 7, n. 12, p. 1625-1632. 1998.

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

HONCZARYK, A.; INOUE, L. A. K. A. **Produção Comercial de Alevinos de Matrinxã na Amazônia Ocidental** Embrapa. (Ed.). 33 2009.

HRBEK, T.; CROSSA, M.; FARIAS, I. P. Conservation strategies for Arapaima gigas (Schinz, 1822) and the Amazonian várzea ecosystem. **Brazilian Journal of Biology**, v. 67, n. 4, p. 909-917. 2007.

IZEL, A. C. U.; MELO, L. A. S. Criar matrinxã: atividade econômica potencial para o agronegócio amazonense. **Embrapa Amazônia Ocidental. Documentos**, 31. 2004.

KUBITZA, F. **Aquicultura no Brasil: Conquistas e desafios** Panorama da Aquicultura. (Ed.). 150 2015.

LAIKRE, L.; PALM, S.; RYMAN, N. Genetic population structure of fishes: implications for coastal zone management. **Ambio**, v. 34, n. 2, p. 111-119. 2005.

LAMB, T.; AVISE, J. C.; GIBBONS, J. W. Phylogeographic patterns in mtchondrial DNA of the desert totoise (*Xerobates agassizi*), and evolutionary relationships among the North American gopher tortoises. **Evolution**, v. 43, p. 76-87. 1989.

LANCASTER, J.; BELYEA, L. R. Nested hierarchies and scale-dependence of mechanisms of flow refugium use. **journal of the North American Benthological Society**, v. 16, n. 1, p. 221-238. 1997.

LEITE, R. G.; ARAÚJO-LIMA, C. A. R. M. Feeding of the *Brycon amazonicum*, *Triportheus elongatus* and *Semaprochilodus insignis* (Osteichthyes, Caraciformes), larvae in Solimões/ Amazonas river and floodplain areas. **Acta Amazonica**, v. 3, n. 2, p. 56-67. 2002.

LIBRADO, P.; ROZAS, J. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. **Bioinformatics**, v. 25, n. 11, p. 1451-2Jun 01. 2009.

LIMA, F. C. Subfamily Bryconinae (Characins, Tetras). In: (Eds.). **Check list of the freshwater of South and Central America**. EDIPUCRS. Porto Alegre. 2003. p.174-181.

LIMA, F. C. A revision of the cis-andean species of the genus *Brycon* Müller & Troschel (Characiformes: Characidae). **Zootaxa**, v. 4222, n. 1, p. zootaxa 4222 1 1Jan 22. 2017.

LISCHER, H. E. L.; EXCOFFIER, L. **PGDSpider: An automated data conversion tool for connecting population genetics and genomics programs**. 2011.

LIU, Z. J.; CORDES, J. F. DNA marker technologies and their applications in aquaculture genetics. **Aquaculture**, v. 238, p. 1-37. 2004.

LUNDBERG, J. African–South American freshwater fish clades and continental drift: problems

with a paradigm. In: (Eds.). **Biological Relationships Between Africa and South America**. Yale University Press. New Haven, CT. 1993.

MACHADO, A. T. **Manejo da agrobiodiversidade, direito dos agricultores e propriedade intelectual**.

. (Ed.) 2008.

MAGOULICK, D. D.; KOBZA, R. M. The role of refugia for fishes during drought: a review and synthesis. **Freshwater Biology**, v. 48, n. 7, p. 1186-1198. 2003.

MARTIN, A. P.; NAYLOR, J. P.; PALUMBI, S. R. Rates of mitochondrial DNA evolution in sharks are slow compared with mammals. **Nature**, v. 357, p. 153-155. 1992.

MCMILLAN, W. O.; PALUMBI, S. R. Rapid rate of control-region evolution in Pacific butterflyfishes (Chaetodontidae). **J Mol Evol**, v. 45, n. 5, p. 473-84Nov. 1997.

MEYER, A. Evolution of mitochondrial DNA in fishes. In: HOCHACHKA, M. (Eds.). **Biochemistry and molecular biology of fishes**. Elsevier. Amsterdam. 1993.

NEI, M. Analysis of gene diversity in subdivided populations. **Proceedings of the National Academy of Sciences, USA**, v. 75, p. 1904-1908. 1973.

NEI, M. Molecular Evolutionary Genetics. **Columbia University Press**, p. 512. 1987.

NELSON, J. S. **Fishes of the world**. Hoboken, N.J: 2006.

OKAZAKI, T. I.; HALLERMAN, E. M.; DE RESENDE, E. K.; HILSDORF, A. W. S. Genetic characterization of *Brycon hilarii* (Characiformes) populations within the Pantanal: Aspects of their conservation within a globally important neotropical wetland. **Journal of Ichthyology**, v. 57, n. 3, p. 434-444. 2017.

OLSON, Z. H.; WHITTAKER, D. G.; RHODES JR, O. E. The use of molecular markers in wild sheep research in North America: a review. **Proceeding of the Northern Wild Sheep and Goat Council Biennial Symposium**, v. 16, p. 251-269. 2009.

ORREGO, L. E. O. **Análise filogeográfica de *Brachyplatystoma platynemum* (Siluriformes:Pimelodidae)**. 2012. p. Dissertação de Mestrado Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2012.

PAIXÃO, R. V.; RIBOLLI, J.; ZANIBONI-FILHO, E. Genetic Variation of the Endangered Neotropical Catfish *Steindachneridion scriptum* (Siluriformes: Pimelodidae). **Frontiers in Genetics**, v. 9, n. 48, 2018-February-19. 2018.

PANARARI-ANTUNES, R. S.; PRIOLI, A. J.; PRIOLI, S. M. A. P.; GALDINO, A. S.; JULIO JUNIOR, H. F.; PRIOLI, L. M. Genetic Variability of *Brycon orbignyanus* (Valenciennes, 1850) (Characiformes: Characidae) in Cultivated and Natural Populations of the Upper Paraná River, and Implications for the Conservation of the Species. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 54, n. 4, p. 839-848. 2011.

PIORSKI, N. M. Contribution of conservation genetics in assessing neotropical freshwater fish biodiversity. **Brazilian Journal of Biology**, v. 68, p. 1039-1050. 2008.

PIZANGO-PAIMA, E. G.; PEREIRA-FILHO, M.; OLIVEIRA-PEREIRA, M. I. D. Composição corporal e alimentar do matrinxã, *Brycon cephalus* (Günther, 1869), na Amazônia Central. **Acta Amazonica**, v. 31, n. 3, p. 509-520. 2001.

RIBEIRO, E. D. **Diversidade molecular dos Ancistrini (Loricariidae: Siluriformes) reofílicos da ecorregião Xingu-Tapajós**. 2013. 51p. INPA, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, 2013.

RODRIGUEZ-RODRIGUES, M. D. P.; LOPERA-BARRERO, N. M.; RIBEIRO, R. P.; POVH, J. A.; VARGAS, L.; SIROL, R. N.; JACOMETO, C. B. Diversidad genética de piracanjuba usada en programas de repoblación con marcadores microsatélites. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 45, n. 1, p. 56-63. 2010.

ROZAS, J.; SANCHEZ-DELBARRIO, J. C.; MESSEGUER, X.; ROZAS, R. DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. **Bioinformatics**, v. 19, n. 18, p. 2496-2497. 2003.

SANCHES, A.; GALETTI JR., P. M.; GALZERANI, F.; DERAZO, J.; CUTILAK-BIANCHI, B.; HATANAKA, T. Genetic population structure of two migratory freshwater fish species (*Brycon orthotaenia* and *Prochilodus argenteus*) from the São Francisco River in Brazil and its significance for conservation. **Latin American Journal of Aquatic Resources**, v. 40, n. 1, p. 177-186. 2012.

SANTOS, G. M. **Peixes comerciais de Manaus**. Manaus: IBAMA/AM, PróVarzea, 2006.

SANTOS, G. M.; SANTOS, A. C. M. Sustentabilidade da Pesca na Amazônia. **Estudos Avançados**, v. 19, n. 64, p. 1-18. 2005.

SANTOS, M. C. F.; RUFFINO, M. L.; FARIAS, I. P. High levels of genetic variability and panmixia of the tambaqui *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1816) in the main channel of the Amazon River. **Journal of Fish Biology**, v. 71, p. 33-34. 2007.

SIVASUNDAR, A.; BERMINGHAM, E.; ORTI, 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.

SOLÉ-CAVA, A. M. Genética da Conservação. In: (Eds.). **Biologia molecular e evolução**. Holos. Ribeirão Preto. 2001. p.172-192.

SWOFFORD, D. L. PAUP*:Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and other Methods). Disponível em: < <http://paup.phylosolutions.com/> >.

TAJIMA, F. Statistical Method for Testing the Neutral Mutation Hypothesis by DNA Polymorphism. **Genetics**, v. 123, n. 3, p. 585-595. 1989.

TEMPLETON, A. R. Disrupting evolutionary processes: the effect of habitat fragmentation on collared lizards in the Missouri Ozarks. **Proceedings of National Academy Sciences of United States of America**, v. 98, n. 10, p. 5426-5432. 2001.

THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D. G.; GIBSON, T. J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research**, v. 22, p. 4673-4680. 1994.

THUESEN, P. A.; PUSEY, B. J.; PECK, D. R.; PEARSON, R.; CONGDON, B. C. Genetic differentiation over small spatial scales in the absence of physical barriers in an Australian rainforest stream fish. **Journal of Fish Biology**, v. 72, p. 1174-1187. 2008.

TURCHETTO-ZOLET, A. C.; SEGATTO, A. L. A.; TURCHETTO, C.; PALMA-SILVA, C.; FREITAS, L. B. D. **Guia prático para estudos filogeográficos**. Sociedade Brasileira de Genética, 2013.

WALLIS, G. P.; ARNTZ, W. E. Mitochondrial DNA variation in the crested newt superspecies: Limited cytoplasmic gene flow among species. **Evolution**, v. 43, p. 88-104. 1989.

WEIR, B. S.; COCKERHAM, C. C. Estimating F-Statistics for the Analysis of Population Structure. **Evolution**, v. 38, n. 6, p. 1358-1370. 1984.

WRIGHT, S. Evolution and genetics of populations. In: (Eds.). **The Theory of Gene Frequencies**. University of Chicago Press. Londres. 1978. p.511.

ANEXO

Chave de identificação para *B. melanopterus* extraído de Lima, 2017

1. A dark vertical band at the distal portion of caudal fin or caudal fin finely dotted with small spots, in the latter case, with a black adipose fin; closed fontanels in specimens larger than 90 mm SL***Brycon pesu*** species-complex (Guyanese river systems, rio Orinoco basin, and Amazon basin)
 - No dark vertical band at the distal portion of caudal fin or finely dotted caudal fin; adipose fin never black; fontanels open in specimens of all sizes.....2
2. Color pattern consisting only in a humeral dark blotch and a rounded dark caudal peduncle blotch (Fig. 5C); distal portion of maxillary expanded (Fig. 6B, C, E, G, J); fifth infraorbital bone as wide as high, or wider than high (Fig. 6B, C, E, G, J).....3
 - Color pattern consisting in a humeral blotch and either a longitudinal stripe across caudal peduncle and middle caudal fin rays (Fig. 5E–F), or an variously-developed dark pigmentation over anal-fin basin and caudal-fin (Fig. 5G–L); several narrow longitudinal stripes, either straight or wavy, present across the body (Fig. 5E–L); width of maxillary approximately equal along its size, without a expanded distal portion (Fig. 6A, D, F, H, I); fifth infraorbital bone higher than wide (Fig. 6A, D, F, H; with the exception of *Brycon polylepis*).. 14
3. Fifth infraorbital bone wider than high (Fig. 6B); head profile distinctly pointed.....4
 - Fifth infraorbital bone about as wide as high (Fig. 6C, E, G, J); head profile either obtuse or pointed 7
4. Dentary teeth with poorly developed lateral cusps; fin hooks present in all rayed fins (including caudal fin) in mature males ***Brycon coquenani*** (Río Kukenan, upper Río Caroni basin, Río Orinoco basin, Venezuela).
 - Dentary teeth with relatively well-developed lateral cusps; fin hooks present only in anal- and pelvic-fins of mature males.....5
5. Seven to 9 (modally 8) horizontal scale rows between the dorsal-fin origin and the lateral line; 3 to 5 (modally 4) horizontal scales rows between the lateral line and pelvic fin) ***Brycon howesi*** new species (Rio Jequitinhonha basin, eastern Brazil).
 - Nine to 12 horizontal scale rows between the dorsal-fin origin and the lateral line; 4 to 7 horizontal scales rows between the lateral line and pelvic fin. 6
6. Caudal, dorsal, and anal fins carmine-red in life, light-colored in preserved specimens ***Brycon vermelha*** (Rio Mucuri basin, eastern Brazil)
 - Caudal, dorsal, and anal fins darkened in both living and preserved specimens ***Brycon insignis*** (Rio Paraíba do Sul basin and smaller adjacent coastal river systems, eastern Brazil).
7. Head profile distinctly pointed (Fig. 6C, G) 8

- Head profile approximately obtuse (Fig. 6E, J) 9
- 8. Mouth distinctly anisognathous, premaxillary pointed, extending beyond dentary, leaving outer, and often second, premaxillary teeth row exposed in ventral view.
. *Brycon ferox* (coastal river systems of southern Bahia and northern Espírito Santo, eastern Brazil). 9. Mouth approximately isognathous, premaxillary and dentary mostly overlapping, leaving only part of outer premaxillary series exposed in ventral view in some specimens
. *Brycon dulcis* new species (Rio Doce basin, eastern Brazil)
- 9. Opercle with a large dark patch of dark pigmentation
. 10 - Opercle silvery or light-brown, never presenting a large dark patch of pigmentation 11
- 10. Dark blotch on opercle lying at the center of the bone, very conspicuous
. *Brycon coxeyi* (Upper Río Marañon basin, Ecuador and Peru)
- Patch of dark pigmentation on opercle diffuse, covering its upper half *Brycon stolzmanni* (Upper Río Marañon basin, Peru) 11. Caudal peduncle dark blotch extending into the basis of the middle caudal-fin rays; lateral-line tubules presenting 2–5 branches.
. *Brycon nattereri* (Upper rio Paraná, upper rio São Francisco, and upper rio Tocantins basins, Brazil)
- Caudal peduncle dark blotch never extending into the basis of the middle caudal-fin rays; lateral-line tubules generally simple, without secondary branches
. 12
- 12. Snout obtuse, rounded in profile; upper jaw length 38.7–48.3 % of HL, mean 42.9
. *Brycon opalinus* (Upper rio Paraíba do Sul and upper rio Doce basins, eastern Brazil)
- Snout acute, pointed in profile; upper jaw length 45.1–51.4 % of HL, mean 49.5.
. *Brycon vonoi* new species (Rio Pardo basin, eastern Brazil)
- 13. A longitudinal broad dark midlateral stripe extending from supracleithrum (*Brycon whitei*) or mid-body/caudal peduncle into middle caudal-fin rays; no dark stripe at anal-fin basis (Fig. 5E–F). 14
- No longitudinal broad midlateral stripe; a broad dark stripe present at anal-fin basis (with the exception of *Brycon gouldingi*); dark pigmentation on caudal-fin either diffuse or forming a distinctly, variously shaped blotch which is not restricted to the middle caudal fin rays (Figs. 5G–L)
. 18
- 14. Inner pair of symphyseal teeth, situated immediately behind main series only slightly smaller than teeth on main series situated immediately in front; fifth infraorbital bone approximately as high as wide; body with series of discrete longitudinal straight stripes, formed by chromatophores situated in the center of the scales
. *Brycon polylepis* (Lago de Maracaibo drainage and Río Orinoco)

basin, Venezuela and Colombia; rio Tocantins basin, Brazil; upper Amazon basin, Peru)

Inner pair of symphyseal teeth, situated immediately behind main series, considerably smaller than teeth on main series situated immediately in front; fifth infraorbital bone higher than wide; body with series of wavy longitudinal stripes, formed by chromatophores concentrated on the upper and lower scales margins 15

15. Longitudinal broad dark midlateral stripe extending from supracleithrum into middle caudal-fin rays (Fig. 5F); caudal, dorsal, pelvics, and anal fins pinkish in life *Brycon whitei* (Rio Orinoco basin)

- Longitudinal broad dark midlateral stripe extending from mid-body or caudal peduncle into middle caudal-fin rays (Fig. 5E) caudal, dorsal, pelvics and anal fins deep red or deep orange in life 16

16. Lateral line scales 67–82, modally 74; horizontal scale rows between dorsal fin and lateral line 11–17, modally 15. *Brycon hilarii* (Rio Paraguai and middle rio Paraná basins; upper Amazon basin)

- Lateral line scales 49–63; horizontal scale rows between dorsal fin and lateral line 9–13. 17

17. Head profile pointed; dentary teeth decreasing in size gradually, first four teeth not considerably larger than remaining teeth; second row of premaxillary teeth 5–8, modally 6. *Brycon orbignyanus* (Rio Paraná and rio Uruguai basins, Brazil, Uruguay, Paraguay, and Argentina)

- Head profile rounded, obtuse; dentary teeth decreasing in size abruptly, first four teeth considerably larger than remaining teeth; second row of premaxillary teeth 3–5, modally 5. *Brycon orthotaenia* (Rio São Francisco basin, Brazil)

18. Body with series of wavy longitudinal stripes, formed by pigmentation concentrated on the upper and lower scales margins (Fig. 5G–H); pectoral and pelvic fins generally dark. 19

- Body with series of dark, straight longitudinal stripes formed by pigmentation concentrated on the mid-distal portion of scales (Fig. I–L); pectoral and pelvic fins generally pale 20

19. Caudal fin and caudal peduncle with a well-defined V- or crescent-shaped blotch (Fig. 5H) *Brycon gouldingi* (Rio Tocantins basin, Brazil).

- Caudal fin and caudal peduncle with diffuse dark pigmentation, sometimes forming an oblique blurred bar on the upper caudal fin lobe but never V- or crescent-shaped blotch (Fig. 5G). *Brycon amazonicus* (western and central Amazon basin; Rio Orinoco basin)

20. An oblique, solid dark stripe extending from immediately behind pelvic-fin basis, through anal-fin basis, lower surface of caudal peduncle, middle area of caudal peduncle, to the upper caudal-fin lobe; no dark pigmentation on the lower caudal-fin

lobe (Fig. 5I)
. ***Brycon melanopterus*** (Western and central Amazon basin lowlands)

- Dark stripe typically limited to anal-fin basis; typically a V- or crescent-shaped blotch on caudal fin; dark pigmentation on lower caudal-fin lobe less developed in some populations but almost always present (Fig. 5J–L) ***Brycon falcatus*** (Guyanese river systems, Rio Orinoco basin; Amazon basin, mostly shield-draining tributaries)