



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

ANGELA MARIA URREA ROJAS

**DESENVOLVIMENTO E TRANSFERIBILIDADE DE
MARCADORES MICROSSATÉLITES EM PEIXES DO
GÊNERO BRYCON**

Londrina
2022

ANGELA MARIA URREA ROJAS

**DESENVOLVIMENTO E TRANSFERIBILIDADE DE
MARCADORES MICROSSATÉLITES EM PEIXES DO
GÊNERO BRYCON**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência Animal da Universidade Estadual de Londrina - UEL, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor.

Orientador: Prof. Dr. Nelson Mauricio Lopera-Barrero

Londrina
2022

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

Urrea-Rojas, Angela Maria.

Desenvolvimento e transferibilidade de marcadores microssatélites em peixes do gênero *Brycon* / Angela Maria Urrea-Rojas. - Londrina, 2022.
71 f.

Orientador: Nelson Mauricio Lopera-Barrero.

Tese (Doutorado em Ciência Animal) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, 2022.
Inclui bibliografia.

1. Desenvolvimento de marcadores microssatélites para o *Brycon amazonicus* e *Brycon gouldingi*, como ferramenta implementada na análise da diversidade genética nos diferentes programas de manejo e conservação do gênero. - Tese. I. Lopera-Barrero, Nelson Mauricio. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal. III. Título.

CDU 636

ANGELA MARIA URREA ROJAS

**DESENVOLVIMENTO E TRANSFERIBILIDADE DE
MARCADORES MICROSSATÉLITES EM PEIXES DO
GÊNERO BRYCON**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência Animal da Universidade Estadual de Londrina - UEL, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Orientador: Prof. Dr. Nelson Mauricio
Lopera-Barrero
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dr. Ulisses de Pádua Pereira
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dr. Sergio Rodrigo Fernandes
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Profa. Dra. Sara Mataroli de Godoy
Faculdade de Apucarana – FAP

Prof. Dr. Carlos Antonio Lopes de Oliveira
Universidade Estadual de Maringá - UEM

Londrina, 10 de março de 2022.

Dedico este trabalho a Deus e as pessoas mais importantes da minha vida, meu esposo (Angel) & filho (Juan Esteban), meus pais (Martha & Rodrigo), meus irmãos (Diego & Juan David), e cada uma das pessoas que caminharam junto no processo.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual de Londrina, em especial ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, pela oportunidade de realização do curso de doutorado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES, pela bolsa concedida para consolidação de meus estudos de doutorado.

Ao Prof. Dr. Nelson Mauricio Lopera Barrero pela orientação, confiança depositada e oportunidade de ser sua orientada no doutorado, e por ter me recebido em seu laboratório desde o ano 2016 para a realização do estágio não obrigatório, pela compreensão e enorme paciência, e pela amizade construída durante esse tempo, obrigado por tudo!

A Prof. Dr^a. Claudete de Fátima Ruas pela permissão e acompanhamento no desenvolvimento do projeto no Laboratório de Marcadores Moleculares e Citogenética de Plantas - UEL.

Ao Prof. Dr. Jayme Aparecido Povh e a Prof. Dr^a Ligia Uribe Gonçalves pela ajuda na obtenção das amostras.

A todos os integrantes do grupo NEPAG, especialmente ao Felipe e Ed, pela constante ajuda e amizade em todo momento; as colegas de laboratório do CCB especialmente a Daniele e Sara por estarem presentes em todas as reações realizadas e a amizade formada no processo.

Ao meu esposo Angel que virou o capitão do barco na tormenta e o Juan Esteban que sempre dá o melhor de si para entender a situação.

Aos meus pais, Rodrigo e Martha, que sempre me motivaram para ser melhor e estiveram presentes, apoiando, auxiliando e acreditando. Os quais fizeram de minhas metas as suas, dando a força necessária para conquistá-los.

A meus irmãos Diego, e Juan David por ser a fonte de energia sempre entregando o melhor exemplo para eles.

Finalmente á todas aquelas pessoas que ficaram envoltas neste caminhar, que sabemos não é fácil, e que de alguma forma contribuíram de fazer melhor a realização deste projeto.

URREA-ROJAS, Angela Maria. **Desenvolvimento e transferibilidade de marcadores microssatélites em peixes do gênero *Brycon***. 2022. 71 f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2022.

RESUMO

O gênero *Brycon* é o principal representante da subfamília *Bryconinae* (Characidae), e compreende um amplo grupo de peixes com importância ambiental e socioeconômica. Distribuídos em diversas bacias hidrográficas da região Neotropical, são encontrados em vários países da América do Sul. Despertam grande interesse na piscicultura por suas qualidades zootécnicas. No entanto, na natureza algumas espécies deste grupo estão sofrendo declínio populacional, principalmente relacionado as atividades humanas e mudanças ambientais. Com isso, pesquisas que permitam aprimorar a análise da estrutura populacional e diversidade genética no gênero *Brycon* são de grande importância. Assim, objetivou-se neste estudo o desenvolvimento de marcadores microssatélites em duas espécies do gênero *Brycon*. Para atender o objetivo, dois experimentos foram conduzidos através da metodologia de biblioteca enriquecida. Experimento 1: Desenvolvimento, transferibilidade e análise da diversidade genética em *Brycon amazonicus*. Experimento 2: Desenvolvimento de *primers* espécie-específicos para *Brycon gouldingi* e teste de transferibilidade em espécies correlacionadas. No Experimento 1 foram desenvolvidos 17 pares de iniciadores, dos quais oito foram implementados na análise genética dos estoques em pisciculturas de Nova Mutum, Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia, Jatuarana e Nova Airão. A análise populacional dos 96 indivíduos dos quatro estoques de *B. amazonicus* identificou-se um total de 47 alelos. O tamanho dos fragmentos variou de 113 pb (Bram27) a 326 pb (Bram21 e Bram26). O conteúdo de informação polimórfica variou de alto a razoavelmente informativo nos microssatélites. A análise de variância molecular (AMOVA) mostrou que a maior diferenciação foi observada dentro dos grupos de populações (57%). A análise da estrutura populacional indicou a presença de três clusters genéticos ($K = 3$). No Experimento 2 foram desenvolvidos 17 iniciadores para o *Brycon gouldingi*, oito dos quais foram implementados na análise genética dos indivíduos. O estudo revelou um total de 23 alelos. O tamanho dos fragmentos variou de 132 pb (Bgoul84B) a 323 pb (Bgoul182). A Heterozigosidade média observada (0,1654) foi menor em comparação a heterozigosidade média esperada (0,345). Foi observado um desequilíbrio significativo ($p < 0,05$) nos loci (Bgoul84A, Bgoul84B, Bgoul87B, Bgoul179 e Bgoul183). Da mesma maneira, segundo os resultados nos testes de transferibilidade podemos concluir que os novos marcadores microssatélites desenvolvidos poderão ser implementados na análise de diversidade genética, avaliação da estrutura populacional ou em programas de conservação (Repovoamento) tanto no gênero *Brycon* como na família Characidae.

Palavras-chave: Amplificação cruzada. *Brycon amazonicus*. *Brycon gouldingi*. Diversidade genética.

URREA-ROJAS, Angela Maria. **Development and transferability of microsatellite markers in fish of the genus *Brycon***. 2022. 71 p. Thesis (Doctorate in Animal Science) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2022.

ABSTRACT

The genus *Brycon* is the leading representative of the subfamily *Bryconinae* (Characidae), comprising a large group of fish with environmental and socio-economic importance. These are distributed over the different hydrographic basins of the Neotropical region, found in several South American countries. They have a great interest in fish farming due to their zootechnical qualities. However, some species of this group are suffering population decline mainly related to human activities and environmental changes in nature. Thus, research that improves population structure and genetic diversity in the genus *Brycon* is important. Thus, the objective of this study was the development of microsatellite markers in two species of the genus *Brycon*. In that way, two experiments were conducted using the enriched library methodology. Experiment 1: Development, transferability, and analysis of genetic diversity in *Brycon amazonicus*. Experiment 2: Development of species-specific primers for *Brycon gouldingi* and transferability test in correlated species. In Experiment 1: 17 pairs of primers were developed, eight of these were implemented in the genetic analysis of stocks in fish farms in Nova Mutum, Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia, Jatuarana and Nova Airão. The population analysis of 96 individuals from the four stocks of *B. amazonicus* identified a total of 47 alleles. The size of the fragments ranged from 113 bp (Bram27) to 326 bp (Bram21 and Bram26). The polymorphic information content ranged from high to reasonably informative in the microsatellites. Molecular analysis of variance (AMOVA) showed that the most significant differentiation was observed within population groups (57%). The analysis of the population structure indicated the presence of three genetic clusters ($K = 3$). In Experiment 2: 17 primers were developed for *Brycon gouldingi*. Eight of these were implemented in the genetic analysis of the individuals. The study revealed a total of 23 alleles. The size of the fragments ranged from 132 bp (Bgoul84B) to 323 bp (Bgoul182). The observed mean heterozygosity (0.1654) was lower compared to the expected mean heterozygosity (0.345). A significant imbalance ($p < 0.05$) was observed at the loci (Bgoul84A, Bgoul84B, Bgoul87B, Bgoul179, and Bgoul183). In the same way, and according to the results of the transferability tests, we can conclude that the new microsatellite markers developed can be implemented in the analysis of genetic diversity, evaluation of population structure, or conservation programs (Repopulation) both in the genus *Brycon* and in the family Characidae.

Key-words: Cross-amplification. *Brycon amazonicus*. *Brycon gouldingi*. Genetic diversity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Taxonomia e distribuição geográfica do matrinxã (<i>Brycon amazonicus</i>)	18
Figura 2 – Exemplar adulto de matrinxã (<i>Brycon amazonicus</i>)	18
Figura 3 – Taxonomia do <i>Brycon gouldingi</i> e exemplar do peixe em álcool 70%	19
Artigo A - Desenvolvimento, análise da diversidade genética e transferibilidade de marcadores microssatélite em <i>Brycon amazonicus</i>	
Figura 4 – Análise de coordenadas principais (PCoA) nos estoques de <i>B. amazonicus</i>	47
Figura 5 – Análise Bayesiana de agrupamentos dos estoques da espécie <i>Brycon amazonicus</i>	48

LISTA DE TABELAS

Artigo A- Desenvolvimento, análise da diversidade genética e transferibilidade de marcadores microssatélite em *Brycon amazonicus*

Tabela 1 – Caracterização, TA (°C), Pares de base, PIC dos novos marcadores microssatélites usados no análise de diversidade genética nos estoques de pisciculturas na espécie <i>Brycon amazonicus</i>	41
Tabela 2 – Alelos de baixa frequência e alelos exclusivos encontrados nos estoques de <i>Brycon amazonicus</i>	42
Tabela 3 – Resultado da análise de diversidade genética nos estoques de <i>Brycon amazonicus</i>	44
Tabela 4 – Análise de variância molecular (AMOVA), diferenciação genética (F_{ST}) e classificação de Wright (W_r) em populações de <i>Brycon amazonicus</i>	46
Tabela 5 – Índice de diferenciação genética pareada (F_{ST+}) entre os estoques.....	46
Tabela 6 – Amplificação cruzada nas espécies do gênero <i>Brycon</i>	48

Artigo B- Desenvolvimento e transferibilidade de *primers* microssatélite para *Brycon gouldingi*

Tabela 7 – Caracterização dos marcadores microssatélites para <i>Brycon gouldingi</i>	62
Tabela 8 – Resultado da análise de diversidade genética nos indivíduos de <i>Brycon gouldingi</i>	64
Tabela 9 – Amplificação cruzada nas espécies do gênero <i>Brycon</i>	65

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AFLP	Fragment Length Polymorphism
AMOVA	Análise de Variância Molecular
FAO	Food and Agriculture Organization
F_{is}	Índice de fixação
F_{ST}	Diferenciação genética
H_e	Heterozigosidade Esperada
H_o	Heterozigosidade Observada
HWE	Equilíbrio de Hardy-Weinberg
INPA	Instituto Nacional de Pesquisa da Amazonia
ISSR	Inter-simple sequence repeats
N_a	Número de alelos
P_b	Pares de bases
R_a	Riqueza alélica
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
SNPs	Single Nucleotide Polymorphisms
SOFIA	The State of World Fisheries and Aquaculture
SSRs	Simple Sequence Repeats
STRs	Short Tandem Repeats
VNTR	Variable Number of Tandem Repeats

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	REVISÃO DE LITERATURA	15
2.1	AQUICULTURA: ESTABELECIMENTO NO BRASIL	15
2.1.1	Produção de peixes de água doce	16
2.2	PEIXES DO GÊNERO BRYCON	16
2.2.1	<i>Brycon amazonicus</i> (Spix & Agassiz, 1829)	17
2.2.2	<i>Brycon gouldingi</i> (Lima, 2004)	19
2.3	MARCADORES MOLECULARES NA GENÉTICA	20
2.3.1	Microsatélites (SSRs).....	21
3	REFERÊNCIAS	24
4	HIPÓTESE	31
5	OBJETIVOS	32
5.1	OBJETIVO GERAL	32
5.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	32
6	Artigo A - Artigo apresentado nas normas da revista Aquaculture international	33
7	Artigo B - Artigo apresentado nas normas da revista Animal Biotechnology	54
8	CONSIDERAÇÕES FINAIS	70

1 INTRODUÇÃO

A crescente demanda de alimento para a segurança alimentar traz novos desafios na ciência e tecnologia agropecuária. Segundo a FAO (2020), o consumo de peixe no mundo aumentou rapidamente nos últimos anos, principalmente nas últimas décadas, passando de 9,9 kg por pessoa na década de 60 para 20,5 kg em 2018. Esse aumento do consumo leva os produtores a melhorarem os métodos de manejo, otimizando a produtividade (Fabrini et al., 2017).

O Brasil possui características favoráveis para a expansão da aquicultura, destacando-se a dimensão continental do território, a diversidade de biomas e a imensa biodiversidade de peixes, abrigando diversas espécies com alto potencial zootécnico e com grande potencial na aquicultura (Rocha et al., 2013). As principais melhorias foram alcançadas por meio de processos avançados de cultivo, melhoria na nutrição, aperfeiçoamento do diagnóstico e terapias de doenças e, especialmente, da aplicação de técnicas genético-moleculares na produção (Embrapa, 2012).

A piscicultura brasileira cresceu 4,74% em 2021, alcançando uma produção de 841 mil toneladas (Peixe BR, 2022). A produção da tilápia é a base da piscicultura brasileira, no entanto, a produção de peixes nativos vem crescendo. No ano de 2021 a produção de peixes nativos representou 31,2% (262 mil toneladas) da produção brasileira (Peixe BR, 2022). Dentre esses, o gênero *Brycon* Müller & Troschel, 1844 apresenta 44 espécies validadas as quais são importantes recursos pesqueiros e algumas delas são cultivadas Arruda (2019).

Assim, o desenvolvimento de pesquisas no gênero *Brycon* está direcionada a sua importância socioeconômica e na piscicultura. O *Brycon amazonicus* Spix & Agassiz, 1829 é a segunda espécie mais cultivada no Estado do Amazonas, exibe importantes qualidades zootécnicas como boa conversão alimentar e fácil aceitação de ração com diferentes fontes de proteína. Além, de boa aceitação no mercado (Leite et al., 2021). Não entanto, as espécies de *Brycon* são conhecidas por serem muito sensíveis aos distúrbios antropogênicos, como a perda de mata ciliar, poluição de água e represamentos.

Atualmente seis espécies são consideradas ameaçadas no Brasil (Rosa & Lima, 2008). Entre elas destaca-se a espécie *Brycon gouldingi* Lima, 2004 o qual é um peixe endêmico da bacia do Araguaia-Tocantins, habita ambientes de água

doce bentófico-pelágica, sendo popular entre as comunidades pesqueiras por suas características nutricionais e potencial uso na piscicultura Souza et al. (2018).

Apesar da sua importância, poucos estudos avaliando a diversidade genética mediante o uso de marcadores microssatélites foram realizados. Na espécie *Brycon amazonicus* apenas dois trabalhos foram realizados; sendo um de Oliveira et al. (2018); e outro de Urrea-Rojas et al. (2021), estudando-se a diversidade genética da espécie mediante amplificação heteróloga de microssatélites. No caso da espécie *Brycon gouldingi* apenas dois artigos foram divulgados: um por Souza et al. (2018), avaliando a transferibilidade de microssatélites na espécie; e Antunes et al. (2010) descrevendo a relação filogenética em seis espécies do gênero *Brycon* e implementando os inter-simple sequence repeat -ISSR (Siglas em inglês).

A avaliação da diversidade genética é obtida a partir da implementação de técnicas moleculares (marcadores moleculares), os quais permitem a detecção de polimorfismos em regiões específicas do DNA (Marwal & Gaur, 2014). Entre os marcadores moleculares mais implementados se encontram os microssatélites ou “Simple Sequence Repeats -SSR” (Siglas em inglês), que apresentam características co-dominantes, alto polimorfismo e repetitividade dentro do genoma (Souza et al., 2018).

Os SSRs são amplamente utilizados em diferentes espécies de peixes, com resultados satisfatórios na análise da diversidade genética. Li et al. (2018) realizaram um estudo na carpa capim (*Ctenopharyngodon idellus*) mediante o método de multiplex SSR-PCR para avaliação da diversidade genética. Desenvolvendo vinte marcadores microssatélites com alto polimorfismo encontrando maiores índices em comparação com os parâmetros de diversidade genética de loci microssatélites desenvolvidos por outros pesquisadores. Concluindo que o método desenvolvido no estudo foi eficaz e preciso que pode ser uma ferramenta estatística poderosa para detectar informações genéticas de carpa capim.

Tibinika et al. (2019) os implementaram na *Oreochromis niloticus* da África Oriental avaliando a diversidade genética. Os autores mediante a metodologia baseada na genotipagem de microssatélites utilizando sequências de amplicons para chamada de alelos com base em Illumina desenvolveram um total de vinte e seis marcadores SSR. Encontrando-se que a abordagem Illumina genotipou loci SSR com sucesso, demonstrando um alto polimorfismo e sua viabilidade em estudos como de diversidade e estrutura genética. Zhou et al. (2020) desenvolveram marcadores

microssatélites e analisaram a diversidade genética em carpas pretas (*Mylopharyngodon piceus*). Nesse estudo os autores desenvolveram marcadores moleculares mediante a metodologia de FIASCO e implementaram dez deles para avaliar a diversidade genética da carpa preta. Encontrando-se novas evidências de diferenciação genética entre populações selvagens e cultivadas de carpa preta as quais são úteis para a conservação e utilização sustentável dos recursos pesqueiros.

Diyie et al. (2021) analisaram a variação genética em populações de Tilápia do Nilo (*O. niloticus*). Nesse estudo, os autores implementaram os marcadores microssatélites (SSRs) com o fim de avaliar diferentes gerações e populações cultivadas de *O. niloticus* em Gana. Encontrando, que a linhagem Akosombo possui alta diversidade com endogamia mínima e as subpopulações não mudaram caracteristicamente de uma geração para outra. Validando-se mais uma vez que os marcadores microssatélites são eficientes para estudos de diversidade genética.

Porém, nenhuma das espécies envolvidas nesta tese de Doutorado conta com primers microssatélites espécie-específicos publicados, o que leva a implementação de primers heterólogos, dificultando a obtenção de ampliações satisfatórias. Assim, no presente estudo buscou-se desenvolver SSRs para o *Brycon amazonicus* e *Brycon gouldingi*, auxiliando a análise da diversidade genética nos diferentes programas de manejo e conservação do gênero.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 AQUICULTURA: ESTABELECIMENTO NO BRASIL

Segundo periódicos locais e cartas encontradas pelos historiadores, é muito provável que a aquicultura teve início no Brasil nos anos de 1630 a 1654, com a chegada da empresa The West India Company e seu governador da colônia neerlandesa no Recife-Pernambuco Count Johan Maurits de Nassau. Ele liderou a construção de um palácio nomeado Vrijburg, o qual continha três lagoas gigantes nas quais eram cultivadas todo tipo de algas e espécies de peixes nativas do Brasil para o consumo local (Valenti et al., 2021).

Posteriormente, nos anos de 1920-1930, com a finalidade da autossuficiência e independência alimentar, foram estabelecidas diferentes espécies de peixes estuarinos no Recife. Algumas das espécies implementadas foram: mojarra (*Eugerres sp* and *Diapterus sp*), mullets (*Mugil sp.*) e robalos (*Centropomus spp*), as quais dependiam da dinâmica do mar para sua subsistência (Schubart, 1936). As condições favoráveis da região Nordeste permitiram a introdução de outras espécies, como é o caso de camarão de perna branca do Pacífico (*Litopenaeus vannamei*), levando com isso ao início da carcinicultura no final da década de 1990 (Valenti et al., 2021).

Finalmente, na segunda metade do século 20, a produção de organismo aquáticos no Brasil foi se consolidando em grandes variedades de espécies, entre eles os moluscos e peixes de água doce e salgada, camarões e até a produção de peixes ornamentais (Kubitza, 2016). Entre estes organismos, as principais espécies cultivadas são peixes (principalmente tilápia, carpas e o tambaqui), o camarão branco do Pacífico (*Litopenaeus vannamei*) e o mexilhão (*Perna perna*). Como cultivos emergentes na aquicultura brasileira destacam-se os peixes marinhos (principalmente bijupirá, *Rachycentron canadum*), as macroalgas e os cultivos de pirarucu (Ostrensky et al., 2007).

2.1.1 Produção de peixes de água doce

Nos últimos 50 anos o panorama geral da produção aquícola tem tido grandes avanços a partir do conhecimento baseado nos funcionamentos dos ecossistemas aquáticos, com o fim de gerar uma produção mais amigável com o meio ambiente, enfatizando-se a importância de utilizar os recursos pesqueiros e aquícolas de forma responsável ao nível mundial (FAO, 2020).

Segundo dados publicados pela FAO em 2020, no documento denominado SOFIA (pelas siglas em inglês - The State of World Fisheries and Aquaculture), estima-se que a produção de peixe no ano de 2018 chegou perto das 179 milhões de toneladas. A aquicultura representou 46% deste total, com 82,1 milhões de toneladas, em que 88% desta produção foi destinado para o consumo humano, estimando-se um consumo per capita perto dos 20,5 kg. O Brasil encontra-se na 13ª posição na produção de peixes em cativeiro, e 8ª posição na produção de peixes de água doce.

No Brasil, a espécie que lidera a produção piscícola continua sendo a Tilápia. De forma geral, no ano de 2021 a piscicultura cresceu 4,7% e atingiu um total de 841 mil toneladas; dessa produção nacional, os peixes nativos representaram 31,2%, segundo dados da Associação Brasileira da Piscicultura (Peixe BR, 2022). Na produção de peixes nativos, dois grupos de espécies se destacam: os peixes da ordem Characiformes (dourado, pacu, tambaqui, matrinxã) e Siluriformes (surubins, pintado, cacharas e jundiás), em especial das famílias *Characidae* e *Pimelodidae*, respectivamente. Cerca de 70% das espécies nativas produzidas no Brasil pertencem a estas duas famílias, correspondendo a 32% da produção nacional (Alves et al., 2014).

2.2 PEIXES DO GÊNERO BRYCON

A família Characidae é uma das maiores famílias de peixes com escamas de água doce encontrada no Brasil, caracteriza-se por apresentar nadadeira adiposa, padrões de dentição e formato corporal bastante variado com 148 gêneros e 1149 espécies identificadas Nelson (2006). O gênero *Brycon* Müller e Troschel 1844 é um dos maiores gêneros neotropicais, contendo pelo menos 75 espécies nominais, das quais 44 são válidas Antunes et al. (2010).

Difundido, desde o sul do México até o sul do Panamá na América Central, também são encontrados nos sistemas fluviais transandinos do norte do Peru até o sistema Lago de Maracaibo na Venezuela e, na América do Sul, percorre o Orinoco, Amazonas, as bacias dos rios La Plata e São Francisco, e os rios costeiros do leste do Brasil desde a foz do rio São Francisco em direção ao sul até a bacia do rio Paraíba do Sul Lima (2017).

Segundo Lima (2017), as espécies do gênero *Brycon* são fonte principal de proteína para consumo humano, uma vez que, são apetecidas tanto na pesca artesanal como na comercial. A agressividade exposta na hora da captura os converte em alvos na pesca esportiva Mateus et al. (2004). Uma particularidade do gênero é sua sensibilidade aos distúrbios antrópicos no meio ambiente, o que tem levado ao declínio de seis espécies, que já são consideradas ameaçadas no Brasil: *Brycon insignis*, *B. vermelha*, *B. devillei*, *B. opalinus*, *B. nattereri* e *B. orbignyanus* Rosa & Lima (2008).

2.2.1 *Brycon amazonicus* (Spix & Agassiz, 1829)

Uma das espécies mais relevantes na piscicultura da região Amazônica é o *Brycon amazonicus*, nomeada pelos locais como matrinxã ou salmão da Amazônia no Brasil (Bini, 2012; Oliveira et al., 2018) e yamú ou sábalo de cola roja na Colômbia (Arias et al., 2006; Reis & Lima, 2009). Esta espécie percorre amplamente a bacia Amazônica incluindo o Rio Orinoco (Reis & Lima, 2009) (Figura 1). A espécie habita diversos habitats durante sua vida, realizando várias migrações, realizando migração reprodutiva no início da estação das chuvas, e quando a água desce, realiza a desova em rios de águas brancas - rios relativamente alcalinos com altas cargas de sedimentos; rios típicos das florestas da bacia amazônica, incluindo as florestas inundadas de rios de água branca e preta (Reis et al., 2009; Bini, 2012).

Quanto ao seu fenótipo e fisionomia, a espécie apresenta corpo alongado com tamanho médio de 40 cm (Figura 2), possui boca pequena com dentes multicuspidados em 3 a 4 fileiras na maxila superior e duas fileiras na maxila inferior, e os olhos bem desenvolvidos; sua coloração é cinza-amarelado, mais claro no ventre; apresenta escamas com bordas escuras formando linhas contínuas sinuosas. O corpo apresenta pigmentação ligeiramente mais escura na parte dorsal, a qual inicia na cabeça e tinge o lado superior do pedúnculo caudal. Tanto as nadadeiras ímpares

como os pares tem pigmentações pretas (Baldisserotto & Carvalho, 2005; Reis et al., 2009).

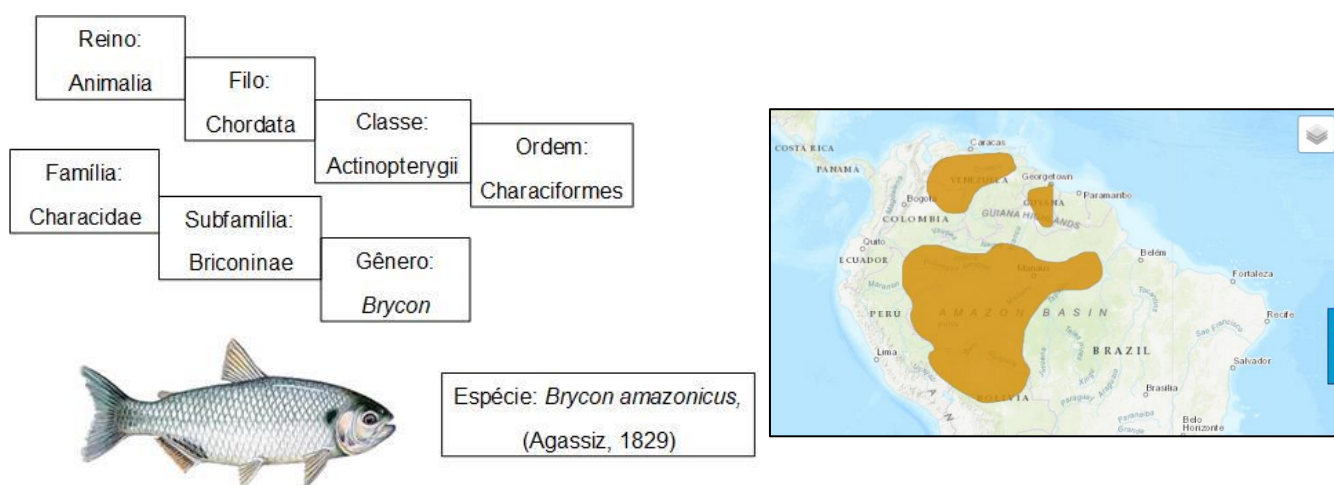


Figura 1. Taxonomia e distribuição geográfica do matrinxã (*Brycon amazonicus*).

Fonte: Reis & Lima, 2009

Desenho: Próprio autor



Figura 2. Exemplar adulto de matrinxã (*Brycon amazonicus*).

Fonte: Moraes et al., 2018.

A espécie *B. amazonicus* é um recurso pesqueiro extremamente importante na região amazônica, e é considerado como uma das espécies de peixes nativos cultivados no Brasil. Possui alto valor comercial e grande potencial para criação em cativeiro, por apresentar crescimento rápido e índices desejáveis de conversão alimentar. Esta espécie está-se tornando cada vez mais popular, devido às suas características organolépticas e sabor de sua carne Oliveira et al. (2018). A população natural de *B. amazonicus* é catalogada como estável, ou seja, não se encontra em risco de extinção segundo Reis & Lima (2009), no entanto, não existem medidas de conservação em vigor. Por isso, em algumas regiões brasileiras, o desmatamento ciliar, o barramento dos rios e a poluição industrial são considerados os principais fatores responsáveis pela diminuição nas populações das espécies do

gênero *Brycon*, como a quase extinção do *Brycon orbignyianus* na região Sudeste e do *Brycon acuminatus* no Rio Paraíba do Sul (Baldisserotto & Carvalho, 2005).

Por outro lado, na região Amazônica a piscicultura é uma das atividades agropecuárias de subsistência com maior predomínio, e entre as espécies mais cultivadas encontra-se o matrinxã (*Brycon amazonicus*), tambaqui (*Colossoma macropomum*) e pirarucu (*Arapaima gigas*) (Santos et al., 2020). O matrinxã é a segunda espécie mais cultivada na região Amazônica (Oliveira et al., 2018). Segundo o Peixe BR a espécie no ano de 2020 conta com 5.261 estabelecimentos agropecuários para sua produção em todo o Brasil (Peixe BR, 2020).

2.2.2 *Brycon gouldingi* (Lima, 2004)

O *Brycon gouldingi* é uma espécie recentemente descrita e catalogada da bacia do rio Tocantins - Araguaia, Brasil. Segundo Lima (2004), o peixe apresenta diferenciação anatômica no quinto osso infraorbital, o qual é mais alto do que largo; também apresentam várias faixas longitudinais estreitas ao longo das superfícies dorsolaterais do corpo; as nadadeiras e escamas exibem um padrão de crescimento distinto; barbatanas peitorais e pélvicas escurecidas, e possui uma marca diferenciada em forma de V na nadadeira caudal (Lima, 2004; Faustino et al., 2018) (Figura 3).

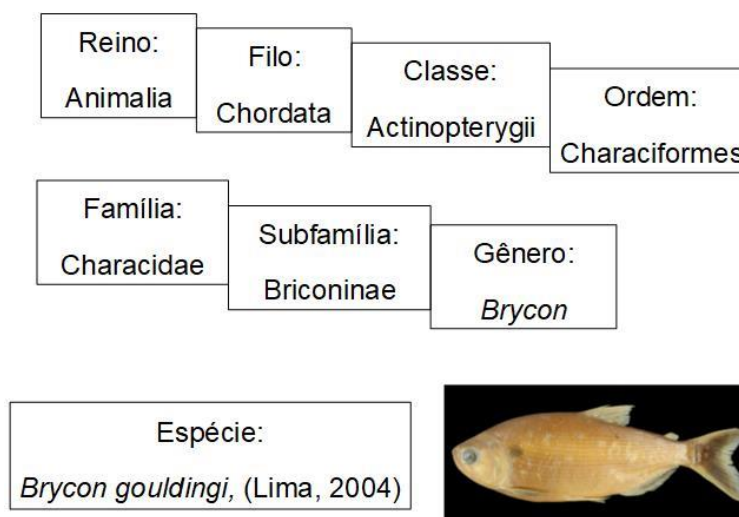


Figura 3. Taxonomia do *Brycon gouldingi* e exemplar do peixe em álcool 70%

Fonte: Lima, 2017; Lima, 2004

Desenho: Próprio autor

Esta espécie é conhecida pelo nome vulgar de piabanha, expõem um hábito alimentar a base de frutas e insetos, e vive em ambientes bentopelágicos de água doce tropical (Zaniboni et al., 2006; Faustino et al., 2018). A piabanha exhibe qualidades favoráveis para sua produção em ambientes controlados devido a sua fácil adaptação ao cativeiro; boa aceitação aos alimentos de origem animal e vegetal; rápido crescimento ao tamanho comercial; fácil comercialização da carne, boa aceitação pelos consumidores e potencial para o cultivo em sistemas intensivos (Zaniboni et al., 2006).

Entretanto, a bacia do rio Tocantins está sendo progressivamente modificada para a construção de usinas hidrelétricas (UHEs). Na área de distribuição do *B. gouldingi* estão construídas as UHEs Serra da Mesa, Peixe Angical, Lajeado, Estreito e Tucuruí, quebrando as migrações naturais da espécie, alterando sua reprodução e diminuindo as populações naturais, levando a classificação da espécie como ameaçada de extinção (EN). Por essa razão, *B. gouldingi* é uma das espécies-alvo do Plano de Ação Nacional para Conservação das Espécies Ameaçadas de Extinção da Ictiofauna e Herpetofauna do Cerrado e Pantanal, fazendo-se necessários estudos populacionais em toda sua área de distribuição para conhecer melhor o estado das populações da espécie (ICMBio, 2021).

2.3 MARCADORES MOLECULARES NA GENÉTICA

Entre as maiores conquistas do século XX encontra-se a determinação da estrutura do ácido desoxirribonucleico (DNA) em 1953 pelos pesquisadores Francis Crick, James Watson e Maurice Wilkins (Danylova & Komisarenko, 2020). Igualmente destaca-se o desenvolvimento da técnica de PCR (*Polymerase Chain Reaction*, siglas em inglês) por Kary Mullis em 1990 e a descoberta da enzima *taq* polimerase (Templeton, 1992), permitindo maiores avanços na biologia molecular assim como na bioquímica.

Com a implementação da PCR foram desenvolvidas novas técnicas de marcadores moleculares como: *Random Amplified Polymorphic* (RAPD); *Amplified Fragment Length Polymorphism* (AFLP); *Variable Number of Tandem Repeats* (VNTR); *Single Nucleotide Polymorphisms* (SNPs); ISSR (*Inter-simple sequence repeats*); *Simple Sequence Repeats* (SSRs) (Seberg & Buiatti, 1996; Zolet et al., 2017;

Karp; Eltaher et al., 2018). Essas técnicas são capazes de distinguir variações entre os genótipos estudados convertendo-se na chave dos estudos genéticos.

Marcadores moleculares fornecem informações sobre as variações alélicas em um determinado locus (Schlötterer, 2004). Elucidando as relações filogenéticas, diversidade e estrutura das populações, rotas de migração alélicas e o fluxo gênico. Da mesma forma, também são ferramentas implementadas na identificação taxonômica, melhoramento genético, identificação de genes e teste de paternidade Duran et al. (2009). O primeiro trabalho relatando a construção de mapas genéticos usando um marcador molecular (*Restriction Fragment Length Polymorphism* -RFLP) foi publicado no ano de 1980 por Botstein et al. Desde então, diversas são as técnicas implementadas nos estudos desenvolvidos as quais tem agido como ferramentas versáteis nas análises genética populacionais mediante a biologia molecular Zolet et al. (2017).

2.3.1 Microssatélites (SSRs)

Os primeiros marcadores amplamente implementados aproveitando a tecnologia da PCR foram os microssatélites. Desenvolvidos em 1989 para o mapeamento em humanos, os SSRs têm sido aplicados em diversas áreas com ótimos resultados nos estudos de genética populacional (Faleiro, 2007). São repetições em tandem, altamente polimórficos, abundante e bem distribuídos por toda a parte eucromática dos genomas, tanto nas regiões codificante e não codificantes, e de característica co-dominante Schlötterer (2004).

Zolet et al. (2017) descreveram vários marcadores moleculares, entre eles os microssatélites, e ressaltaram as seguintes vantagens: altamente informativos (multialélicos); fáceis de isolar; codominantes; apresentam alta reprodutibilidade. No entanto, têm algumas limitações: complexo comportamento mutacional; presença de alelos nulos; sendo geralmente, espécie-específicos. Uma qualidade importante dos microssatélites é que eles permitem a distinção de genótipos homozigotos e heterozigotos, implementando-se em peixes na análise da diversidade genética com bastante predileção Oliveira et al. (2018).

Alguns dos mais recentes trabalhos publicados pelo grupo de estudo (NEPAG), mencionamos os seguintes. Pandolfi et al. (2021) desenvolveram mediante a técnica biblioteca enriquecida 11 *primers* espécie-específicos para a espécie de

peixe (*Pterophyllum scalare*), avaliando a diversidade e estrutura genética de uma população selvagens, do rio Amazonas, e três estoques comerciais. Encontrando que os quatro grupos estudados apresentaram alta diferenciação genética. Yamachita et al. (2020) descreveram pela primeira vez um painel de microssatélites para a espécie (*Hyphessobrycon eques*) com o objetivo de avaliar a diversidade genética e testar a transferibilidade dos mesmos na espécie (*Serrapinnus notomelas*). Ressaltando-se a importância do desenvolvimento de SSRs na análise de diversidade genética em peixes.

Os microssatélites são classificados segundo o comprimento do motif: os quais vão desde mono-, di-, tri-, tetra-, penta-, até hexa-nucleotídeos, ou podem ser chamados de nucleotídeos Complex quando um ou mais variações de motif se encontra dentro da mesma sequência de microssatélite (Grover & Sharma, 2016). Várias são as formas de obtenção e desenvolvimento dos microssatélites genômicos. Entre elas encontramos o isolamento de bibliotecas genômicas de tamanho selecionado o qual exige a triagem de milhares de clones genômicos por meio de hibridização usando sondas microssatélites curtas, marcadas com repetições de di ou tri-nucleotídeos, como CA, CT, GC, GCG, ATC (Grover et al., 2009), ou sondas tetra-nucleotídicas GATA e GACA (Bhatia et al., 1995). Porém, uma das dificuldades da técnica é a baixa obtenção de clones positivos (<1%) (Grover & Sharma, 2016).

Outra técnica é a obtenção de microssatélites a partir de triagem das bibliotecas enriquecidas, a qual garante maior obtenção de regiões contendo SSRs. Implementando a biotina-estreptavidina e ligação de adaptadores aos fragmentos de DNA, eles são submetidos a ampliações por PCR. Seus produtos são hibridizados com sondas previamente marcadas e posteriormente são eluídos, amplificados e clonados novamente (Wardill et al., 2004), garantido maior obtenção de SSRs. Existem outras técnicas pouco implementadas devido à baixa obtenção de regiões contendo SSRs. Fisher, Gardner & Richardson (1996) descreveram um procedimento de enriquecimento baseado em PCR usando um iniciador de repetição de oligo-nucleotídeo ancorado a região 5' com a sequência degenerada KKVRVRV(CT₆). Porém, sua maior limitação é a PCR, a qual tendia a fornecer microssatélites na posição terminal, limitando assim o primer.

Edwards et al. (2007) implementaram outro protocolo de enriquecimento no qual os iniciadores de ligação Sau3AI inicialmente amplificaram o DNA selecionado por tamanho clonado em plasmídeos e, em seguida, sondas

marcadas com biotina foram usadas para enriquecimento usando hibridização. Um procedimento alternativo de enriquecimento de biblioteca descrito por Fisher & Bachmann (1998) rendeu quase 70% de microssatélites CT. De forma geral a taxa de obtenção de marcadores microssatélites a partir de bibliotecas enriquecida é de 50% (Grover & Sharma, 2016; Grover et al., 2010).

3 REFERÊNCIAS

ARRUDA, P. S., FERREIRA, D. C., OLIVEIRA, C., & VENERE, P. C. DNA barcoding reveals high levels of divergence among mitochondrial lineages of *Brycon* (Characiformes, Bryconidae). **Genes**, v.10, n.9, p. 639, 2019. Doi:10.3390/genes10090639.

ANTUNES, R. S. P., GOMES, V. N., PRIOLI, S. M. A. P., PRIOLI, R. A., JÚLIO, H. F., PRIOLI, L. M., AGOSTINHO, C. S., PRIOLI, A. J. Molecular characterization and phylogenetic relationships among species of the genus *Brycon* (Characiformes: Characidae) from four hydrographic basins in Brazil. **Genetics and Molecular Research**, v.9, n.2, p. 674-684, 2010. Doi:10.4238/vol9-2gmr759.

ARIAS, C. J. A., ZANIBONI-FILHO, E., & AYA, B. E. Indicadores del ciclo reproductivo del yamú *Brycon amazonicus*, en cautiverio. **Orinoquia**, v.10, n.2, p. 24-34, 2006.

BALDISSEROTTO, B., & CARVALHO, L. Espécies Nativas para a Piscicultura no Brasil. In: ESPÉCIES NATIVAS PARA A PISCICULTURA NO BRASIL. Ed. UFSM, 2005.

BARTLETT, J. M., & STIRLING, D. A short history of the polymerase chain reaction. In PCR PROTOCOLS, p. 3-6, 2003.

BHATIA, S., DAS, S., JAIN, A., & LAKSHMIKUMARAN, M. DNA fingerprinting of *Brassica juncea* cultivars using microsatellite probes. **Electrophoresis**, v.16, n.9, p. 1750-4, 1995.

BINI, E. **Peixes do Brasil de Rios, Lagoas e Riachos**. 1. ed. Itapema, SC: homem-pássaro publicações, 2012.

DANYLOVA, T. V., & KOMISARENKO, S. V. Standing on the shoulders of giants: James Watson, Francis Crick, Maurice Wilkins, Rosalind Franklin and the birth of molecular biology. **The Ukrainian Biochemical Journal**, v.92, n.4, p. 154-165, 2020. Doi:10.15407/ubj92.04.154.

DIYIE, R. L., AGYARKWA, S. K., ARMAH, E., AMONOO, N. A., OWUSU-FRIMPONG, I., & OSEI-ATWENEBOANA, M. Y. Genetic variations among different generations and

cultured populations of Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) in Ghana: Application of microsatellite markers. **Aquaculture**, v.544, n.737070, p. 1-8, 2021. Doi: 10.1016/j.aquaculture.2021.737070.

DURAN, C., APPLEBY, N., EDWARDS, D., & BATLEY, J. (2009). Molecular Genetic Markers: Discovery, Applications, Data Storage and Visualization. **Current Bioinformatics**, v.4, n.1, p. 16-27. Doi: 10.2174/157489309787158198.

EDWARDS, C. E., ARAKAKI, M., QUINTANA-ASCENCIO, P. F., SOLTIS, D. E., & SOLTIS, P. S. Isolation and characterization of microsatellite loci from the endangered highlands scrub hypericum (*Hypericum cumulicola*). **Molecular Ecology Notes**, v.7, n.6, p. 1135-1137, 2007. Doi: 10.1111/j.1471-8286.2007.01808.x.

ELTAHER, S., SALLAM, A., BELAMKAR, V., EMARA, H. A., NOWER, A. A., SALEM, K. F. M., POLAND, J., BAENZIGER, P. S. Genetic diversity and population structure of f3: 6 Nebraska winter wheat genotypes using genotyping-by-sequencing. **Frontiers in genetics**, v.9, p. 1–9, 2018. Doi: 10.3389/fgene.2018.00076.

Embrapa. **Genética na Piscicultura: Importância da variabilidade genética, marcação e coleta para análise de DNA**. 1a Edição. 32p. Brasília, 2012.

FABRINI, B., BRAGA, W., ANDRADE, E., PAULA, D., & PAULINO, R. Sulfated polysaccharides in diets for Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) in the initial growth phase. **Journal Aquaculture Research Development**, v.8, n.477, p. 2, 2017. Doi: 10.4172/2155-9546.1000477.

FALEIRO, F. G. **Marcadores genético-moleculares aplicados a programas de conservação e uso de recursos genéticos**. Planaltina: Embrapa Cerrados, p. 99, 2007.

FAO- Food and Agriculture Organization. (2020). **El estado mundial de la pesca y la acuicultura**. Sustentabilidad en acción. Roma.

FAUSTINO, F., MAKINO, L. C., NEUMANN, E., & NAKAGHI, L. S. O. Ultrastructure aspects of *Brycon gouldingi* (Teleostei, Characidae) related to swimming ability and feeding during larval development. **Journal of fish biology**, v.92, n.5, p. 1560-1573, 2018. Doi: 10.1111/jfb.13612.

FISHER, D., & BACHMANN, K. Microsatellite enrichment in organisms with large genomes (*Allium cepa* L.). **Biotechniques**, v.24, n.5, p. 796–800, 1998.

FISHER, P. J., GARDNER, R. C., & RICHARDSON, T. E. Single locus microsatellites isolated using 50 anchored PCR. **Nucleic Acids Research**, v.24, n.21, p. 4369–71, 1996.

GROVER, A., & SHARMA, P. C. Development and use of molecular markers: past and present. **Critical reviews in biotechnology**, v.36, n.2, p. 290-302, 2016. Doi: 10.3109/07388551.2014.959891.

GROVER, A., JAIN, A., & SHARMA, P. C. Microsatellite markers: potential and opportunities in medicinal plants. *In*: ARORA R, MEDICINAL PLANT BIOTECHNOLOGY. ed. **Medicinal plant biotechnology**. Oxon, United Kingdom: CAB International, 2010, p. 71–92. Doi: 10.1079/9781845936785.0071.

GROVER, A., RAMESH, B., SHARMA, P. C. Development of microsatellite markers in potato and their transferability in some members of Solanaceae. **Physiology and Molecular Biology of Plants**, v.15, n.4, p. 343–358, 2009. Doi: 10.1007/s12298-009-0039-1.

ICMBio- Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade. ***Brycon gouldingi***. The IUCN Red List of Threatened Species 2021: e.T134695006A134695015.

KARP, A., SEBERG, O. L. E., & BUIATTI, M. Molecular techniques in the assessment of botanical diversity. **Annals of Botany**, v.78, n.2, p.143-149, 1996.

KUBITZA, F. **Brazilian Aquaculture: Constraints and Challenges**. **Global Aquaculture Advocate**, (Part 1), v.19. p. 1–5, 2016.

LEITE, A.C.V., PANTOJA-LIMA, J., PAULINO, R.R., BUSSONS, M.R.F.M., GIMBO, R.Y., DUNCAN, W.L.P., ARIDE, P.H.R., FAGGIO, C., OLIVEIRA, A.T. & MATTOS, B.O. Effect of Dietary Protein Levels on Growth Performance, Hematological Parameters and Digestive Enzymes in Juveniles of *Brycon amazonicus* (Spix & Agassiz, 1829). Preprints, 2021. Doi: 10.20944/preprints202112.0131.v1.

LI, D., WANG, S., SHEN, Y., MENG, X., XU, X., WANG, R., & LI, J. A multiplex microsatellite PCR method for evaluating genetic diversity in grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*). **Aquaculture and fisheries**, v.3, n.6, p. 238-245, 2018. Doi: 10.1016/j.aaf.2018.09.001.

LIMA, F. C. A revision of the cis-andean species of the genus *Brycon* Müller & Troschel (Characiformes: Characidae). **Zootaxa**, v.4222, n.1, p.1-189. 2017. Doi: 10.11646/ZOOTAXA.4222.1.1.

LIMA, F.C.T. *Brycon gouldingi*, a new species from the Rio Tocantins drainage, Brazil (Ostariophysi: Characiformes: Characidae), with a key to the species in the basin. **Ichthyological exploration of freshwaters**, v.15, p. 279–287, 2004. Doi: 10.1590/1982-0224-20150176.

MARWAL, A., & GAUR, R. K. Molecular markers: Tool for genetic analysis. In: VERMA, A., & SINGH, A. **Animal Biotechnology**. Academic Press, 2014. p. 353-372. Doi: 10.1016/B978-0-12-811710-1.00016-1.

MATEUS, L., PENHA, J. M., & PETRERE, M. Fishing resources in the Rio Cuiabá basin, Pantanal do Mato Grosso, Brazil. **Neotropical Ichthyology**, v.2, n.4, p. 217-227, 2004. Doi: 10.1590/S1679-62252004000400004.

MORAES, F. D., FRANCINE, P. V., ROSSI, P. A., AVILEZ, I. M., SOUZA, S. N. E & MORAES, G. Assessment of biomarkers in the neotropical fish *Brycon amazonicus* exposed to cypermethrin-based insecticide. **Ecotoxicology**, v.27, n.2, p.188-197, 2018. DOI: 10.1007/s10646-017-1884-2.

NELSON, J. S. **Fishes of the world**, 4th edition, John Wiley & Sons Inc., New Jersey, 2006.

NOBILE, A. B., CUNICO, A. M., VITULE, J. R., QUEIROZ, J., VIDOTTO-MAGNONI, A. P., GARCIA, D. A., ORSI, M. L., LIMA, F. P., ACOSTA, A. A., SILVA, R. J.; PRADO, F. D., BRANDÃO, H., FORESTI, F., OLIVEIRA, C., & RAMOS, I. P. Status and recommendations for sustainable freshwater aquaculture in Brazil. **Reviews in Aquaculture**, v.12, n.3, p.1495-1517, 2020. Doi: 10.1111/raq.12393.

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, 2018. Doi: 10.1007/s10750-017-3278-0.

OSTRENSKY, A., BORGHETTI, J. R., & SOTO, D. **Estudo setorial para consolidação de uma aquicultura sustentável no Brasil**. Grupo Integrado de Aquicultura e Estudos Ambientais (GIA), Curitiba, p. 20-30, 2007.

PANDOLFI, V.C.F., YAMACHITA, A.L., DE SOUZA, F.P., DE GODOY, S.M., DE LIMA, E.C.S., FELICIANO, D.C., DE PÁDUA PEREIRA, U., POVH, J.A., AYRES, D.R., BIGNARDI, A.B. & PENAFORT, J.M. (2021). Development of microsatellite markers and evaluation of genetic diversity of the Amazonian ornamental fish *Pterophyllum scalare*. **Aquaculture International**, v.29, n.6, p. 2435-2449. Doi: 10.1007/s10499-021-00757-8.

Peixe, BR. Associação Brasileira de Piscicultura. **Anuário PeixeBR da Piscicultura 2021**. São Paulo, 2022.

REYNALTE-TATAJE, D. A., SOARES, M. D. L., MASSARO, M. V., BASTIAN, R., & PELICICE, F. M. (2020). First evidence of a spawning site of the endangered fish *Brycon orbignyanus* (Valenciennes, 1850) (Characiformes, Bryconidae) in the Middle Uruguay River, Brazil. **Acta Limnologica Brasiliensia**, 32. Doi: 10.1590/S2179-975X2220.

REIS, R & LIMA, F. *Brycon amazonicus*. The IUCN Red List of Threatened Species.e: T167645A6362017. 2009.

ROCHA, C. M. C., RESENDE, E. K., ROUTLEDGE, E. A. B., & LUNDSTEDT, L. M. Avanços na pesquisa e no desenvolvimento da aquicultura brasileira. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.48, n.8, p. 4–6, 2013. Doi: 10.1590/S0100-204X2013000800iii.

ROSA, R.S., & LIMA, F.C.T. Os peixes ameaçados de extinção. *In*: MACHADO, A.B.M., DRUMMOND, G.M. & PAGLIA, A.P. **Livro vermelho da fauna brasileira ameaçada de extinção**. Ministério do Meio Ambiente/Fundação Biodiversitas, Brasília, 2008. p. 9–285.

SANTOS, A. C.; SILVA, L. D. J.; DE CASTRO, A. F.; & MENEGHETTI, G. A. (2020). A piscicultura no Amazonas: uma análise do perfil dos produtores de tambaqui (*Colossoma macropomum*) e Matrinxã (*Brycon amazonicus*), em Presidente Figueiredo e Rio Preto da Eva/AM. In **EMBRAPA AMAZÔNIA OCIDENTAL-ARTIGO EM ANAIS DE CONGRESSO (ALICE)**. In: CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ECONOMIA, ADMINISTRAÇÃO E SOCIOLOGIA RURAL, v. 58, p. 1-12, 2020, Foz do Iguaçu. Cooperativismo, inovação e sustentabilidade para o desenvolvimento rural: anais. Foz do Iguaçu: SOBER, 2020.

SANTOS, L. C., & BATISTA, V. S. Dinâmica populacional da matrinxã *Brycon amazonicus* (Characidae) na Amazônia Central. **Zoologia** (Curitiba), v.26, n.2, p. 195–203, 2009. Doi: 10.1590/S1984-46702009000200001.

SCHLÖTTERER, C. The evolution of molecular markers—just a matter of fashion? **Nature reviews genetics**, v.5, n.1, p.63-69, 2004.

SCHUBART, O. **Investigações sobre os viveiros do Recife**. Boletim da Secretaria de Agricultura, Indústria e Comércio do Estado de Pernambuco, v.1, n.2, p.153–176, 1936.

SHIBATTA, O. A., & DIAS, J. H. P. **40 peixes do Brasil: CESP 40 anos**. Rio de Janeiro: Editora Dois, 2006.

SOUZA, F. P. D., LIMA, E. C. S., LEITE, N. G., URREA-ROJAS, A. M., YAMACHITA, A. L., PANDOLFI, V. C. F., & LOPERA-BARRERO, N.M. Transferability of heterologous microsatellite primers in *Brycon gouldingi*. **Ciência Rural**, v. 48, n. 11, 2018. Doi: 10.1590/0103-8478cr20180412.

TEMPLETON, N. S. The Polymerase Chain Reaction History Methods and Applications. **Diagnostic Molecular Pathology**, v.1, n.1, p.58-72, 1992. Doi: 10.1097/00019606-199203000-00008.

TIBIHIKA, P. D., CURTO, M., DORNSTAUDER-SCHRAMMEL, E., WINTER, S., ALEMAYEHU, E., WAIDBACHER, H., & MEIMBERG, H. Application of microsatellite genotyping by sequencing (SSR-GBS) to measure genetic diversity of the East African *Oreochromis niloticus*. **Conservation Genetics**, v.20, n.2, p.357-372, 2019. Doi: 10.1007/s10592-018-1136-x.

URREA-ROJAS, A. M., SOUZA, F. P., LIMA, E. C. S., GONÇALVES, L. U., POVH, J. A., AYRES, D. R., BIGNARDI, A. B., PEREIRA, U. P., & LOPERA-BARRERO, N. M. Genetic diversity of Matrinxã breeding stocks: implications for management and conservation. **Semina: Ciências Agrárias**, v.42, n.2, p.757-768, 2021. Doi: 10.5433/1679-0359.2021v42n2p757.

VALENTI, W. C., BARROS, H. P., MORAES-VALENTI, P., BUENO, G. W., & CAVALLI, R. O. Aquaculture in Brazil: past, present and future. **Aquaculture Reports**, v.19, n.100611, p.1-18, 2021. Doi: 10.1016/j.aqrep.2021.100611.

YAMACHITA, A. L., PANDOLFI, V.C.F., SOUZA, F. P. D., GODOY, S. M. D., LIMA, E. C. S. D., PEREIRA, U. D. P., POVH, J. A., CAMPOS, E. C., AYRES, D. R., BIGNARDI, A. B., RUAS, C. D. F., & LOPERA-BARRERO, N. M. (2020). Evaluation of a panel of microsatellite markers to study their applications in *Serrapinnus notomelas* and to reveal the genetic diversity in *Hyphessobrycon eques*. **Animal Biotechnology**, 1-9. Doi: 10.1080/10495398.2020.1826957.

WARDILL, T. J., SCOTT, K. D., GRAHAM, G.C., ZALUCKI, M.P. Isolation and characterization of microsatellite loci from *Acacia nilotica* ssp. Indica (Mimosaceae). **Molecular Ecology Notes**, v.4, n.3, p.361-363, 2004. Doi:10.1111/j.1471-8286.2004.00697.x.

WASKO, A. P. A importância do monitoramento genético em estoques cultivados de matrinxã e piraicanjuba. **Revista Panorama da Aqüicultura**, v.15, p.47–49, 2005.

ZANIBONI, E., TATAJE, D. R., & WEINGARTNER, M. Potencialidad del género Brycon en la piscicultura brasileña. **Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias**, v.19, n.2, p.233-240, 2006.

ZHOU, Y., TONG, J., WANG, J., & YU, X. Development of microsatellite markers and genetic diversity in wild and cultured populations of black carp (*Mylopharyngodon piceus*) along the Yangtze River. **Aquaculture International**, v.28, n.5, p.1867-1882, 2020. Doi: 10.1007/s10499-020-00563-8

ZOLET, A. C. T., TURCHETTO, C., ZANELLA, C. M., & PASSAIA, G. **Marcadores moleculares na era genômica: metodologias e aplicações**. Edição 1. Rio Grande do Sul. Edit: Sociedade Brasileira de Genética, 2017.

4 HIPÓTESE

É possível desenvolver marcadores SSRs para as espécies *B. amazonicus* e *B. gouldingi* aprimorando sua implementação na análise genética e sua transferibilidade nas espécies correlacionadas.

5 OBJETIVOS

5.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver marcadores microssatélite para o *Brycon amazonicus* e *Brycon gouldingi* e, através deles, realizar estudos genéticos.

5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Desenvolver *primers* espécie-específicos para o *Brycon amazonicus* e *Brycon gouldingi*.
- Através dos *primers* desenvolvidos, realizar a análise da variabilidade e da estrutura genética de populações de *Brycon amazonicus*.
- Realizar testes de amplificação cruzada dos *primers* desenvolvidos em espécies de *Brycon* correlacionadas.

6 ARTIGO A- ARTIGO APRESENTADO NAS NORMAS DA REVISTA AQUACULTURE INTERNATIONAL

Desenvolvimento, análise da diversidade genética e transferibilidade de marcadores microssatélites em *Brycon amazonicus*

Development, analysis of genetic diversity and transferability of microsatellite markers in *Brycon amazonicus*

Highlights

Descrição de dezessete novos iniciadores microssatélites para gênero *Brycon*

Validação de oito SSRs na análise de diversidade genética em *Brycon amazonicus*

Elevada diferenciação genética entre estoques de *Brycon amazonicus* avaliados

Alta transferibilidade dos novos *primers* microssatélites no gênero *Brycon*

Resumo

Brycon amazonicus é uma espécie nativa do Brasil com importância socioeconômica e potencial para a produção piscícola. É a segunda espécie mais cultivada na Região Amazônica. No entanto, a falta de marcadores moleculares específicos limita as pesquisas genéticas. Há poucos estudos genéticos voltados à avaliação da estrutura populacional desta espécie. Assim, o objetivo do presente estudo foi desenvolver marcadores microssatélites específicos para a espécie *B. amazonicus*. Analisar a diversidade genética em quatro estoques de pisciculturas: Nova Mutum; Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia (INPA); Jatuarana e Nova Airão. Além, de avaliar a transferibilidade desses marcadores em espécies do mesmo gênero (*Brycon orbignyanus*, *Brycon falcatus* e *Brycon gouldingi*). Como resultado e mediante o método da biblioteca enriquecida, 17 pares de primers foram desenvolvidos. Oito deles implementados na análise genética nos estoques de *B. amazonicus*. Foi possível obter um total de 47 alelos. O conteúdo de informação polimórfica variou de moderado a alto nos oito pares de primers. O coeficiente médio de endogamia F_{IS} foi negativo e significativo no estoque de Nova Mutum. Não entanto, nos estoques de Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia (0,179), Jatuarana (0,099) e Nova Airão os valores foram positivos e não significativos. A análise de variância molecular (AMOVA) mostrou que a maior diferenciação genética se encontra dentro dos estoques (57%), entretanto, diferenciação genética entre os estoques foi alta. A análise Bayesiana designou como melhor número de agrupamentos genéticos

$K = 3$. E o teste de transferibilidade mostrou amplificação bem-sucedida dos primers desenvolvidos para *B. amazonicus* nas espécies testadas *B. orbignyanus*, *B. falcatus* e *B. gouldingi*. Indicando-se o alto potencial dos microssatélites para análise de diversidade e estrutura genética populacional tanto no gênero *Brycon* como na família Characidae.

Palavras-chaves: Genética molecular. Marcador molecular. Matrinxã. Peixe.

Abstract

Brycon amazonicus is a species native to Brazil with socioeconomic importance and potential for fish production. It is the second most cultivated species in the Amazon Region. However, the lack of specific molecular markers limits genetic research. There are few genetic studies aimed at evaluating the population structure of this species. Thus, the objective of the present study was to develop species-specific microsatellite markers for *B. amazonicus*. To analyze the genetic diversity in four fish farm stocks: Nova Mutum; Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia (INPA); Jatuarana and Nova Airão. In addition, to evaluate the transferability of these markers in species of the same genus (*Brycon orbignyanus*, *Brycon falcatus*, and *Brycon gouldingi*). As a result, and through the enriched library method, 17 primer pairs were developed. Eight of them were implemented in the genetic analysis of *B. amazonicus* stocks. A total of 47 alleles were obtained. The polymorphic information content varied from moderate to high in the eight primer pairs. The mean F_{IS} endogamy coefficient was negative and significant in Nova Mutum stock. However, in the stocks of Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia (0.179), Jatuarana (0.099) and Nova Airão the values were positive and not significant. The analysis of molecular variance (AMOVA) showed that the greatest genetic differentiation was found within stocks (57%), however, genetic differentiation among stocks was high. Bayesian analysis designated the best number of genetic clusters as $K = 3$. And the transferability test showed successful amplification of the primers developed for *B. amazonicus* in the tested species *B. orbignyanus*, *B. falcatus* and *B. gouldingi*. Indicating the high potential of microsatellites for analysis of diversity and population genetic structure in both the genus *Brycon* and the family Characidae.

Keywords: Molecular genetics. Molecular marker. Matrinxã. Fish.

Introdução

A piscicultura brasileira cresceu 4,74% em 2021, alcançando uma produção de 841 mil toneladas. A produção de peixes nativos está-se consolidando em conjunto com a produção aquícola, representando um segmento muito importante da piscicultura brasileira (Peixe BR, 2022). No ano de 2021 a produção de peixes nativos representou 31,2% (262 mil toneladas) da produção brasileira (Peixe BR, 2022). Na Amazônia Central o peixe é um recurso de grande interesse para a economia local e abastecimento da população ribeirinha (Cajado et al. 2018).

Brycon amazonicus (Spix & Agassiz, 1829) tem destaque dentro do gênero *Brycon* (Müller & Troschel, 1844). Conhecido como matrinxã, a espécie exibe importantes qualidades zootécnicas como boa conversão alimentar, bom rendimento da carcaça e boa aceitação no mercado (Lima et al. 2021). Sendo a segunda espécie mais cultivada da região Amazônica (Oliveira et al. 2018).

Apesar da sua importância, poucos estudos avaliando a diversidade genética mediante o uso de marcadores microssatélites foram realizados. A manutenção da diversidade genética é importante com o fim de manter a habilidade de adaptação e resposta as mudanças ambientais da progênie. Sendo uma prioridade nos estoques mantidos em cativeiro com o fim de diminuir o risco de endogamia (Urrea-Rojas et al. 2021). Nesse sentido, os marcadores moleculares podem auxiliar na obtenção de informações sobre a estrutura genética populacional, história demográfica, parentesco e sistema de acasalamento (Penha et al. 2020).

Entre os marcadores moleculares mais usados para análises genéticas de populações em peixes, destacam-se os microssatélites (Diyie et al. 2021). Nomeados como “Simple Sequence Repeats - SSRs” ou “Shorts Tandem Repeats - STRs” são marcadores polimórficos, abundantes tanto nas regiões codificantes como não codificantes do genoma e de característica co-dominante, que permite a diferenciação entre homozigotos e heterozigotos (Schlötterer, 2004).

Várias pesquisas analisando populações do gênero *Brycon* já foram realizadas através desses marcadores (Souza et al. 2018a; Souza et al. 2018b; Penha et al. 2020). No entanto, a espécie *B. amazonicus* não conta com primers específicos, o que leva a implementação de *primers* heterólogos, dificultando a obtenção de ampliações satisfatórias. Assim, o objetivo do presente estudo foi desenvolver

primers espécie-específicos para *Brycon amazonicus*, analisar a diversidade genética de estoques e testes de amplificação cruzada para outras espécies do mesmo gênero.

Material e Métodos

A pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética na Utilização de Animais da Universidade Estadual de Londrina (CEUA / UEL N° 2166.2020.33).

Extração do DNA

Foram coletadas amostras de nadadeira caudal (aproximadamente 0,5 cm²) de nove indivíduos de *Brycon amazonicus*. A extração de seu DNA genômico foi de acordo com o protocolo NaCl, conforme determinado por Lopera-Barrero et al. (2008). Posteriormente, a integridade do DNA extraído (5 µg) foi verificada em gel de agarose (1%), com tampão de ácido 1-Tris-borato-etilenodiaminotetracético (TBE) submetidos à eletroforese por 60 minutos a 100 V e 400 mA.

Desenvolvimento dos marcadores microssatélites

Foi desenvolvida uma biblioteca enriquecida de microssatélites, através do método de captura por hibridização, de acordo com o protocolo descrito por Billote et al. (1999), com sondas (AGA) 5, (CT) 8 e (GT) 8 na fase de enriquecimento. O DNA genômico extraído (5 µg) de *B. amazonicus* foi digerido com 50 U da enzima de restrição RsaI tipo II (Promega, Madison, EUA) para obter vários fragmentos com uma sequência de terminação conhecida. Estes fragmentos foram conectados aos adaptadores de fita simples (10 mM) Rsa21 (5'-CTCTTGCTTACGCGTGGACTA-3') e Rsa25 (5'-TAGTCCACGCGTAAGCAAGAGCACA-3') com T4 DNA ligase (Promega, Madison, WI). Para a ligação, a incubação foi realizada a 20 °C durante duas horas.

Os fragmentos foram selecionados por hibridização com os oligonucleotídeos ligados a uma biotina, complementares às sequências de microssatélites. Esses fragmentos foram capturados usando esferas magnéticas revestidas com estreptavidina com alta capacidade de conjugação com biotina (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA). Os fragmentos enriquecidos com microssatélites foram amplificados via reação em cadeia da polimerase (PCR) com primers para Rsa21, clonados no vetor pGEM-T Easy (Promega) e transformados em competentes mediante *Escherichia coli* JM109 (Promega). Plasmídeos de colônias únicas foram isolados e sequenciados usando o kit de sequenciamento Big Dye Terminator versão

3.1 (Applied Biosystems, Foster City, CA) em analisador genético automatizado (ABI 3500xL, Applied Biosystems) usando o primer de cauda M13 (5'-TGTA AACGACGGCCAGT-3').

A leitura e a análise das sequências foram realizadas pelo software MEGA versão 6.0 (Tamura et al. 2013). As sequências que apresentaram baixa qualidade ou pouca especificidade foram excluídas. A construção dos marcadores microssatélites foi feita por meio do software Primer3, versão 2.0.4.0 (Rozen & Skaletsky, 2000). Todos os primers foram testados para possíveis interações primer-primer e estruturas sobrepostas (Hairpin) mediante o software AutoDimer 1.0 (Vallone e Butler 2004).

Os iniciadores desenvolvidos foram testados em amostras de *B. amazonicus*, para padronização da temperatura de anelamento. Os produtos desses testes foram visualizados em gel de agarose (3%) submetidos à eletroforese com tampão de ácido TBE por 120 minutos a 100 V e 200 mA. Com base na melhor resolução das bandas no gel e descarte dos primers que não apresentaram especificidade, foram selecionados um total de 17 primers para validação, transferibilidade e análise da diversidade genética.

Análise de diversidade genética e validação dos marcadores microssatélites

Foram amostrados 96 indivíduos da espécie *B. amazonicus*, coletados em quatro municípios: 24 amostras de uma piscicultura em Nova Mutum (NM), Mato Grosso - BR (13,822° S, 56,083° O); 24 amostras do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), Amazonas - BR (3,095° S, 59,988° O); 24 amostras de uma piscicultura em Jatuarana (JAT), Manaus - BR (3,0553° S, 59,6586° O); e 24 amostras de uma piscicultura em Nova Airão (NA), Amazonas - BR (2,3715° S 60,5638° O).

O DNA genômico foi extraído de fragmentos da nadadeira caudal utilizando o protocolo de NaCl, conforme descrito por Lopera-Barrero et al. (2008). O produto dessa extração foi quantificado em espectrofotômetro SLIPQ 026 - Quantificador L-Quant (Loccus Biotecnologia, Ribeirão Preto, Brasil) e diluído para 30 ng / µL para padronização da concentração da amostra. Posteriormente, a integridade do DNA foi verificada em um gel de agarose 1%, com tampão 1× Tris-borato-etilenodiaminotetracético (TBE) por 1 h a 100 V e 400 mA.

A amplificação foi realizada através de PCR em um volume final de reação de 15 µL contendo enzima recombinante "hot start" Taq DNA Polimerase (1,0 U / µL) (LGC Biotecnologia, Cotia - SP); Tampão 1 X sem MgCl₂; 2,0 mM de MgCl₂; 0,2 mM

de dNTP; primer Forward - iniciador direto (0,12 μ L); primer reverse - iniciador reverso (0, 48 μ L); 0, 48 μ L de iniciador de cauda M13 (5'-TGTAACGACGGCCAGT-3 ') marcado com sondas FAM, HEX, NED ou PET (Applied Biosystems); 1 μ L de DNA genômico (30 ng / μ L) e água livre Miliq para um volume total de 15 μ L. O ciclo de PCR foi realizado nas seguintes condições: quatro minutos de desnaturação inicial a 94 °C; seguido por 35 ciclos de 45 segundos de desnaturação a 94 °C; 30 segundos de anelamento a 64 °C; e 1 minuto de extensão a 72 °C; seguido por uma extensão final de 10 minutos a 72 °C.

Os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese capilar automatizada em analisador genético (ABI 3500xL) utilizando GS-600 LIZ (Thermo Fisher Scientific) como marcador interno de peso molecular. Os alelos foram visualizados por meio do software GeneMarker, versão 2.6.3 (SoftGenetics LLC).

Testes de amplificação cruzada

Para os microssatélites desenvolvidos, foram realizados testes de amplificação cruzada em três espécies do gênero *Brycon*: oito amostras de *B. gouldingi*, oito de *B. falcatus* e oito amostras de *B. orbignyanus*. Foram usadas as mesmas condições de PCR e eletroforese capilar descritas para *B. amazonicus*. Para os primers amplificados, foram determinados o número de alelos produzidos (Na) e a taxa de sucesso da amplificação (As%) (porcentagem de bandas com amplificação satisfatória).

Análise Estatística

O número de alelo, alelo efetivo; A heterozigiosidade observada (H_o) e esperada (H_e); equilíbrio de Hardy-Weinberg; Alelos de baixa frequência e alelos exclusivos; análise de variância molecular (AMOVA); índice de fixação (F_{ST}) (nível de significância de 0,05) e índice de diferenciação genética pareada (F_{ST+}) foram calculados com o software GenAEx versão 6.5 (Peakall & Smouse 2012). Como método de diferenciação dos valores de F_{ST} , foi utilizada a definição de Wright (1978), onde valores entre 0,00 e 0,05, 0,051 e 0,15, 0,151 e 0,25 e $> 0,25$ indicam diferenciação genética pequena, moderada, alta e muito alta, respectivamente. O coeficiente de endogamia (F_{IS}) foi calculado usando o software FSTAT versão 2.9.3.2 (Goudet 2005).

A presença de alelos nulos foi testada com o software Micro-Cheker (Van Oosterhout et al. 2004). O conteúdo de informação polimórfica (PIC) foi calculado usando o software Cervus versão 3.0.7 (Kalinowski et al. 2007) e classificado de acordo com Botstein et al. (1980). Sendo que valores $PIC > 0,5$; entre $0,5-0,25$ e $<0,25$ indicam que são altamente informativos, razoavelmente informativos e pouco informativos, respectivamente.

Uma análise Bayesiana da estrutura genética foi realizada utilizando o software Parallel Structure (Besnier e Glover 2013; Pritchard et al. 2000) para verificar a existência de possíveis clusters (K) entre as populações, seguindo o modelo misto de clusters com um período de *burnin* em de 250.000 e 1.000.000 repetições de MCMC (Markov Chain Monte Carlo), com 20 execuções para cada valor K hipotético, com K variando de um a oito ($K = 1-8$). O número de clusters foi determinado pelo método proposto por Evanno et al. (2005) implementado no site Structure Harvester (Earl e vonHoldt 2012). A análise de coordenadas principais (PCoA) foi realizada por meio da função *cmdscale* do R v. 4.0.1 (R Core Team, 2020).

Resultados e Discussão

Dos 17 primers desenvolvidos e testados, oito marcadores microssatélites apresentaram amplificação polimórfica Tabela1. O conteúdo de informação polimórfica (PIC) variou de alto (Bram18, Bram21, Bram24 e Bram27) a razoavelmente informativos (Bram6, Bram11, Bram22 e Bram26). Os valores encontrados para PIC demonstram que as informações fornecidas pelos *primers* são úteis para a análise da diversidade genética populacional no *B. amazonicus*. Outros autores encontraram valores de PIC semelhantes em outras espécies do gênero *Brycon*. Castro et al. (2018) avaliaram a diversidade genética através da implementação de primers heterólogos no *B. orbignyanus*, encontrando valores de PIC entre 0,215 (Bh5) a 0,609 (Bc48-10).

Tabela 1. Caracterização, TA (°C), Pares de base, PIC dos novos marcadores microsatélites usados no análise de diversidade genética nos estoques de pisciculturas na espécie *Brycon amazonicus*

Iniciador	SSR Motif	Repetição	Sequência Primer (5'-3')	TA (°C)	Pares de bases	PIC
Bram6	(GAT) ₅	Tri	F: TGTTCCAGATCAGAAAAGCAGA R: TGGATCAAATAGGGAATGCAGAC	64	234-264	0,358
Bram11	(AC) ₁₂	Di	F: AGAATGCTGCTGAGACCATT R: TTCAACCGACTCATTTTGTTTCT	64	224-252	0,431
Bram18	(GT) ₂ C (TG) ₃ N(GA) ₃	Complex	F: GCAAAGACCTAAACTTAACCCT R: ACACTGACCCCTCTTTCTGG	64	140-206	0,661
Bram21	(GT) ₁₆	Di	F: AGTAGTCAGAACTCGTCGCTCT R: TGCTATGAAGACGTGCATGC	64	230-326	0,678
Bram22	(AG) ₄	Di	F: ATTTACCCAGTTCTGCCCAG R: ATAAAACGCACTTGAGCCGC	64	279-314	0,399
Bram24	(TG) ₂₀	Di	F: GAAACACACCCTGATACTGCA R: GAGGAGGAGCAGCACTAACA	64	280-307	0,730
Bram26	(CA) ₃	Di	F: CTGTTCTTGGTTCTTGGTTCAGA R: CTTGACCCACACTTCACCAG	64	293-326	0,399
Bram27	(CT) ₄	Di	F: GTTTAGTCTGGCCTTGGAGAG R: CCTGGTTGCATCCGTCCG	64	113-143	0,656

Temperatura de anelamento TA (°C)

Conteúdo de informação polimórfica (PIC)

As populações do INPA e Jatuarana apresentaram maior quantidade de alelos de baixa frequência ($p < 0,100$) com um total de quatorze e nove alelos, seguido por Nova Airão com seis e, finalmente, Nova Mutum com cinco. Alelos exclusivos também foram identificados nos estoques: INPA com quinze; cinco em Nova Mutum; três tanto em Jatuarana como em Nova Airão (Tabela 2).

Tabela 2. Alelos de baixa frequência e alelos exclusivos encontrados nos estoques de *Brycon amazonicus*

Alelos de baixa frequência				
	Nova Mutum	INPA	Jatuarana	Nova Airão
Bram6	264 _(0,023)	234 _(0,028) 240 _(0,028) 264 _(0,028)	264 _(0,021)	-
Bram11	228 _(0,065) 230 _(0,022)	224 _(0,042) 232 _(0,042) 234 _(0,042) 236 _(0,021) 238 _(0,042)	228 _(0,042) 230 _(0,021) 252 _(0,042)	-
Bram18	206 _(0,021)	-	197 _(0,021)	194 _(0,043)
Bram21	286 _(0,063)	267 _(0,068)	-	-
Bram22	-	279 _(0,025) 314 _(0,050)	293 _(0,050)	293 _(0,068)
Bram24	-	-	300 _(0,079) 307 _(0,053)	294 _(0,059) 298 _(0,059) 300 _(0,059)
Bram26	-	293 _(0,021) 326 _(0,042)	295 _(0,022)	295 _(0,043)
Bram27	-	115 _(0,021)	-	-
Alelos de Exclusivos				
	Nova Mutum	INPA	Jatuarana	Nova Airão
Bram6	-	240 _(0,028)	-	-
Bram11		224 _(0,042) 232 _(0,042) 234 _(0,042)	252 _(0,042)	

		236 _(0,021)		
		238 _(0,042)		
Bram18	142 _(0,979)	140 _(0,543)	-	-
Bram21	286 _(0,063)	267 _(0,068)	-	-
	326 _(0,417)			
Bram22	-	279 _(0,025)	-	-
		314 _(0,050)		
Bram24	292 _(0,500)	-	304 _(0,658)	294 _(0,059)
			307 _(0,053)	298 _(0,059)
Bram26	309 _(0,636)	293 _(0,021)	-	-
		326 _(0,042)		
Bram27	-	115 _(0,021)	-	113 _(0,239)
		128 _(0,208)		
		143 _(0,771)		

Na análise populacional dos 96 indivíduos dos quatro estoques de *B. amazonicus*, identificou-se um total de 47 alelos (Tabela 2). O tamanho dos fragmentos variou de 113 pb (Bram27) a 326 pb (Bram21 e Bram26). O loci Bram22 no estoque Nova Mutum apresentou padrão monomórfico. Não entanto, nos demais estoques o iniciador revelou padrão polimórfico. O número de alelos por locus variou de um para oito.

Resultados semelhantes foram anteriormente relatados por Urrea-Rojas et al. (2021) num estudo de avaliação da diversidade genética em matrinxã por meio de microssatélites heterólogos, onde a maior quantidade de alelos obtida foi nos iniciadores BoM13 com 9 alelos e Bh5 com 8 alelos. Da mesma forma Oliveira et al. (2018) realizaram um estudo comparando populações naturais e em cativeiro reportando variações entre o número de alelos de 7 a 9. Pode-se inferir que o número de alelos pode variar por diversos fatores como origem das amostras, tamanho da amostra, iniciadores implementados. Não foi evidenciada a presença de alelos nulos (Tabela 2).

Tabela 3. Resultado da análise de diversidade genética nos estoques de *Brycon amazonicus*

Estoque	Locus	Na	Ne	Ho	He	HWE	F _{IS}
Nova Mutum	Bram6	3	2	0,318	0,515	0,176	0,402
	Bram11	3	1	0,174	0,162	0,976	-0,054
	Bram18	2	1	0,042	0,041	0,917	0,000
	Bram21	3	2	0,958	0,551	0,00*	0,729
	Bram22	1	1			Monomórfico	
	Bram24	2	2	1,000	0,500	0,00*	-1,000
	Bram26	2	2	0,636	0,463	0,079	-0,355
	Bram27	2	2	0,957	0,499	0,00*	-0,913
	Media	2	2	0,511	0,341	0,269	-0,149*
Instituto Nacional de Pesquisa da Amazonia	Bram6	4	1	0,167	0,157	1,00	-0,030
	Bram11	8	4	0,375	0,723	0,00*	0,498
	Bram18	2	2	0,913	0,496	0,00*	-0,833
	Bram21	2	1	0,136	0,127	0,73	-0,050
	Bram22	3	1	0,050	0,141	0,00*	0,661
	Bram24	3	2	0,125	0,525	0,00*	0,771
	Bram26	3	1	0,042	0,119	0,00*	0,662
	Bram27	3	2	0,458	0,362	0,55	-0,247
	Media	4	2	0,283	0,331	0,285	0,179
Jatuarana	Bram6	3	2	0,167	0,494	0,004*	0,674
	Bram11	4	1	0,125	0,194	0,00*	0,373
	Bram18	3	1	0,333	0,284	0,811	-0,154
	Bram21	2	2	0,542	0,499	0,676	-0,064
	Bram22	2	1	0,100	0,095	0,814	-0,027
	Bram24	4	2	0,316	0,514	0,048*	0,408
	Bram26	2	1	0,043	0,043	0,915	0,000
	Bram27	2	2	0,609	0,423	0,036*	-0,419
	Media	3	2	0,279	0,318	0,402	0,099
Nova Airão	Bram6	2	1	0,200	0,278	0,278	0,311
	Bram11	3	2	0,391	0,532	0,059	0,285
	Bram18	2	1	0,087	0,083	0,827	-0,023
	Bram21	2	2	0,435	0,386	0,541	-0,106
	Bram22	2	1	0,136	0,127	0,731	-0,050
	Bram24	4	1	0,118	0,311	0,00*	0,640
	Bram26	2	1	0,087	0,083	0,827	-0,023
	Bram27	3	3	0,913	0,600	0,001*	-0,505
	Media	3	2	0,296	0,300	0,408	0,066

Número de alelos por locus (Na), alelos efetivos (Ne), heterozigosidade observada (Ho) e esperada (He), teste de equilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE) e coeficiente de endogamia (F_{IS}) dos estoques de *Brycon amazonicus*.

Resultados destacados com * são significativos (P < 0,05).

A Ho média variou de 0,279 Jatuarana a 0,511 em Nova Mutum. A He média foi menor em Nova Airão (0,300) e maior em Nova Mutum (0,341). Os valores médios encontrados para Ho já eram esperados. Já que estamos avaliando estoques

mantidos há mais de dez anos em cativeiro. Evidenciando-se um déficit de heterozigotos principalmente nos estoques de INPA e Jatuarana. No entanto, segundo Oliveira et al. (2018) a espécie *Brycon amazonicus* apresenta alta H_o média quando comparada com outras espécies de *Brycon*. Assim mesmo, a retirada de indivíduos da natureza com o fim de implementá-los como reprodutores nos estoques de piscicultura pode ter influenciado em ditos resultados, já que não se contam com estudos prévias a sua captura.

Os estoques avaliados no presente estudo são antigos formados há mais de dez anos, onde se desconhecem dados sobre sua formação, tipo de acasalamento e manejo reprodutivo. Assim, o efeito fundador seja um fator importante nos níveis de diversidade genética observados, já que o estoque inicial das pisciculturas avaliadas poderia ter tido um tamanho limitado, contribuindo para a redução da diversidade genética (Pandolfi et al. 2021).

O coeficiente médio de endogamia F_{IS} foi negativo e significativo no estoque de Nova Mutum (-0,149). Porém, nos estoques de INPA (0,179), Jatuarana (0,099) e Nova Airão (0,066) os valores foram positivos e não significativos. O desvio do equilíbrio de Hardy-Weinberg ($p < 0,05$) foi encontrado para cinco locus (Bram11, Bram18, Brm22, Bram24, Bram26) nos indivíduos de INPA; quatro locus (Bram6, Bram11, Bram24 e Bram27) no estoque de Jatuarana; três locus (Bram21, Bram24, Bram27) na piscicultura de Nova Mutum, e dois locus (Brm24 e Bram27) nos indivíduos de Nova Airão.

Os desvios apresentados nos locus anteriores estão possivelmente relacionados ao déficit de heterozigotos refletindo-se nos valores de F_{IS} positivos. Estes resultados apontam que os estoques avaliados estão sendo influenciados pelas perdas das frequências alélicas refletindo numa possível endogamia. Pandolfi et al. (2021) descreve que os estoques estão sujeitos a processos de endogamia devido ao número limitado de reprodutores e ao processo de seleção artificial ao qual estão submetidos.

A AMOVA mostrou que a maior diferenciação foi observada dentro das populações avaliadas (57%). Houve elevada e significativa diferenciação genética ($F_{ST} = 0,423$) de acordo com a classificação de Wright (1978) (Tabela 3). O índice de diferenciação genética pareada (F_{ST+}) entre os estoques foi muito alta em cinco das combinações, (INPA x Nova Mutum), (Jatuarana x Nova Mutum), (Jatuarana x INPA), (Nova Airão x Nova Mutum), (Nova Airão x INPA), e moderada na combinação (Nova

Airão x Jatuarana) (Tabela 4). Estes resultados demonstram que cada estoque tem formado suas próprias características e diversidade genética ao longo do tempo de cativeiro, que foram estabelecidas a partir do estoque inicial (efeito fundador).

Tabela 4. Análise de variância molecular (AMOVA), diferenciação genética (F_{ST}) e classificação de Wright em populações de *Brycon amazonicus*.

Fonte de Variação	GL	SQ	QM	VE	%	F_{ST}	Wright
Entre grupos	3	183,630	61,210	1,241	43%	0,423*	Elevada
Dentro grupos	188	307,188	1,634	1,634	57%		
Total	191	490,818		2,875	100%		

GL: graus de liberdade, SQ: soma dos quadrados, QM: média da soma dos quadrados; VE: variância estimada, %: porcentagem de variação, F_{ST} , Classificação de Wright; F_{ST} * Significativo ($P < 0,05$)

Tabela 5. Índice de diferenciação genética pareada (F_{ST+}) entre os estoques

	NM	INPA	JAT	NA
NM	-			
INPA		0,291	-	
JAT		0,360	0,346	-
NA		0,415	0,295	0,085

Nova Mutum (NM), Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), Jatuarana (JAT) e Nova Airão (NA) na espécie *Brycon amazonicus*

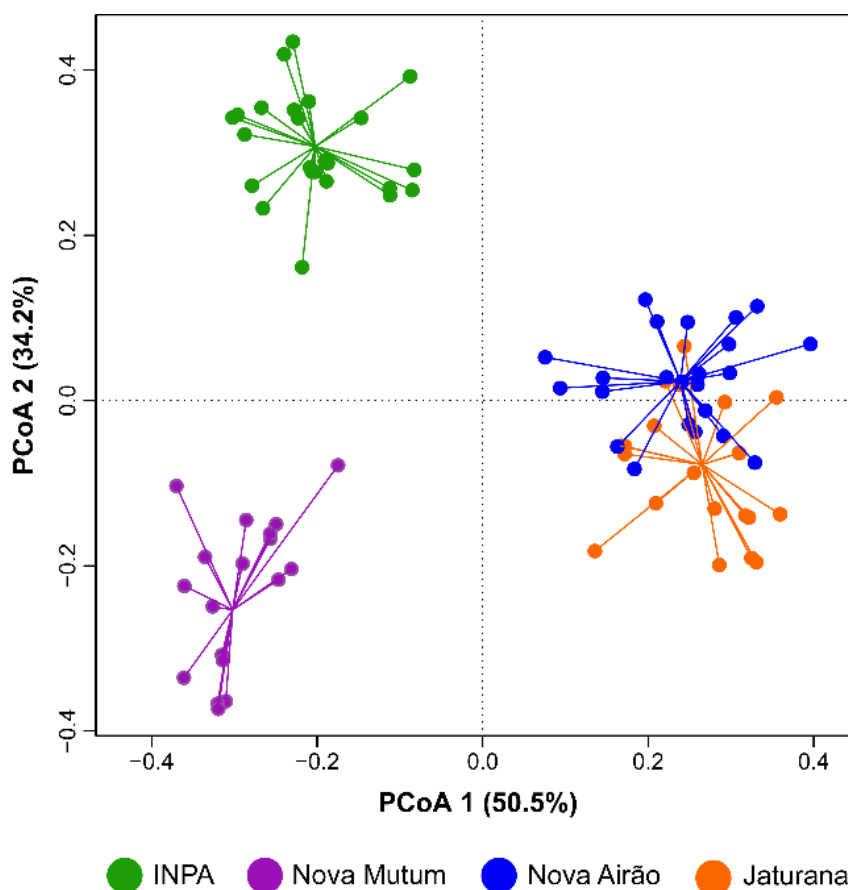
A análise de coordenadas principais (PCoA) nos estoques de *B. amazonicus* evidenciou uma maior distância genética entre os indivíduos de INPA (verde) e Nova Mutum (roxo) em relação aos quatro estoques avaliados. Contudo, os indivíduos de Nova Airão (azul) e Jatuarana (laranja) sua distância genética foi menor ficando próximos. A análise Bayesiana da estrutura populacional indicou a presença de três clusters genéticos ($K = 3$), um composto por os indivíduos de Nova Mutum, outra composta pelo estoque de INPA e uma terceira pelas pisciculturas de Jatuarana e Nova Airão (Figura 5). Avaliando-se de forma conjunta as Figura 4 e Figura 5, podemos inferir que os indivíduos de Jatuarana e Nova Airão provavelmente apresentam uma origem em comum causando-se uma menor diferenciação genética.

Baseados nos resultados do presente estudo e se faz necessária a introdução de novos indivíduos com uma alta variabilidade genética principalmente no estoque de Nova Mutum. Não entanto, daremos algumas sugestões as quais são validas para todo os estoques mantidos em cativeiro nas pisciculturas: 1. Avaliação previa: deve

ser feita com o fim de conhecer a diversidade genética dos indivíduos a ser inseridos. 2. Realizar acasalamentos preferivelmente entre indivíduos com alta diversidade genética e 3. Os parentais devem contar com um número elevado de alelos efetivos com o fim de garantir a herança da diversidade na progênie.

Entre outras medidas a ter em conta apontamos a equalizar o tamanho das famílias e delimitar a duração das gerações Urrea-Rojas et al. (2021). Reposição pontual dos reprodutores os quais devem ser obtidos localmente onde está localizada a estação de pesca. O plantel nunca deve ser “reforçado” com indivíduos de outros sistemas de drenagem ou com peixes de outras fazendas de origem desconhecida e finalmente deve ser evitada o escape acidental ou intencional dos indivíduos mantidos em cativeiro (Oliveira et al., 2018).

Figura
(PCoA)
de *B.*



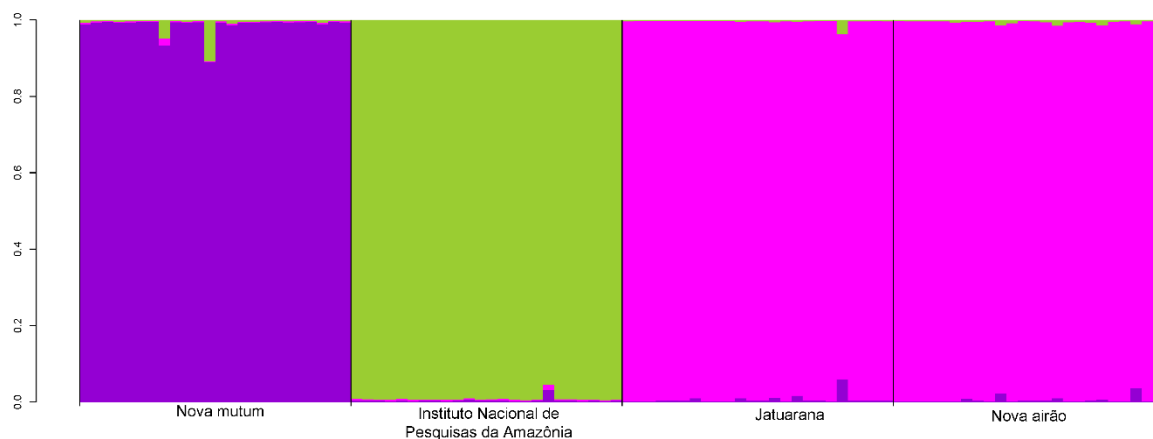


Figura 5. Análise Bayesiana de agrupamentos dos estoques da espécie *Brycon amazonicus*

O teste de amplificação cruzada mostrou amplificação 100% bem-sucedida nos locus Bram2, Bram4, Bram6, Bram15, Bram18, Bram26 e Bram27 nas três espécies testadas. A espécie que apresentou maior número de alelos foi *B. gouldingi* com 17 alelos, seguido de *B. falcatus* com 16 e *B. orbignyanus* com 14 alelos. O tamanho dos alelos variou de 126 pb (Bram27) a 307 pb (Bram26) (Tabela 5). Esses resultados são similares aos observados nos estoques de *B. amazonicus* analisados no presente estudo, confirmando que a região flanqueada pelos primers possui tamanho semelhante apesar das variações no local de anelamento, permitindo amplificações heterólogas ou cruzadas (Urrea-Rojas et al. 2021).

Tabela 6. Amplificação cruzada nas espécies do gênero *Brycon*

Locus		Espécie		
		<i>B. orbignyanus</i>	<i>B. falcatus</i>	<i>B. gouldingi</i>
Bram2	pb	286	286	286
	Na	1	1	1
	As	100%	100%	100%
Bram4	pb	285	285	285
	Na	1	1	1
	As	100%	100%	100%
Bram6	pb	207-222	222	210-222
	Na	2	1	2
	As	100%	100%	100%
Bram11	pb	0	222-224-226	208-224-226-232
	Na	0	3	4
	As	0%	62.5%	87.5%
Bram15	pb	197-199-201	201-203	199-201-203
	Na	3	2	3

Bram18	As	100%	100%	100%
	pb	144	144	144
	Na	1	1	1
Bram21	As	100%	100%	100%
	pb	261-269	284-290-304	286
	Na	2	3	1
Bram22	As	88%	100%	25%
	pb	294	294	294
	Na	1	1	1
Bram26	As	25%	100%	100%
	pb	307	307	307
	Na	1	1	1
Bram27	As	100%	100%	100%
	pb	126-141	126-141	126-141
	Na	2	2	2
	As	100%	100%	100%

Tamanho do alelo (pb), Número de alelos (Na), e Sucesso na Amplificação (%)

Finalmente, um dos maiores desafios da aquicultura atual é a produção sustentável e não exaustiva das espécies naturais (selvagens). Na piscicultura amazônica a formação dos estoques de produção e reprodução para piscicultura é obtida a partir da extração de indivíduos da natureza o que gera um declínio nas espécies, especialmente *B. amazonicus*, a qual é a segunda espécie mais produzida na Amazônia (Oliveira et al. 2018). Com isso se faz necessário o desenvolvimento de metodologias que permitam avaliar a diversidade genética. Nesse caso, ressaltam-se os novos marcadores microssatélites obtidos no presente estudo os quais são úteis no direcionamento e avaliação da estrutura genética tanto da espécie alvo como outras espécies do gênero *Brycon* e a família Characidae.

Conclusão

Concluimos que foi possível desenvolver um total de 17 novos marcadores microssatélites e oito deles foram implementados na análise da diversidade genética em quatro populações de matrinxã. Encontrando-se de media para baixa diversidade genética. A baixa diversidade genética pode ser o resultado de reprodutores de baixa variabilidade genética ou um número limitado de reprodutores no plantel inicial. Assim, ressaltamos a importância do desenvolvimento dos marcadores microssatélites no matrinxã os quais ajudam na compreensão e avaliação da diversidade genética e da estrutura populacional em programas de reprodução, melhoramento genético, conservação (Repovoamento) de indivíduos selvagens ou estoques mantidos em cativeiro, tanto no gênero *Brycon* como na família Characidae.

Agradecimentos

Os autores agradecem à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior” (CAPES), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), e ao Programa de Pós Graduação em Ciência Animal (Universidade Estadual de Londrina) pelo apoio e financiamento.

Referências

Belkhir, K., Borsa, P., Chikhi, L., Raufaste, N., & Bonhomme, F. GENETIX 4.05, logiciel sous Windows TM pour la génétique des populations. Available online: <http://www.genetix.univ-montp2.fr/genetix/genetix.htm> (accessed on 10 May 2019).

Besnier, F., & Glover, K. A. (2013) Parallel Structure: a R package to distribute parallel runs of the population genetics program STRUCTURE on multi-core computers. PLoS One 8:e70651. doi.org/10.1371/journal.pone.0070651

Billotte, N., Lagoda P. J. R., Risterucci, A. M. & Baurens, F. C. (1999). Microsatellite-enriched libraries: applied methodology for the development of SSR markers in tropical crops. Fruits, 54(4), 277–288.

Botstein, D., White, R. L., Skolnick, M., & Davis, R. W. (1980) Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. American journal of human genetics, 32,3, 314–331. doi.org/10.17348/era.9.0.151-162

Castro, P.L.D., Ribeiro, R.P., Santos, S.C.A.D., Goes, E.S.D.R., Souza, F.P.D., Poveda-Parra, A.R., Vargas, L., Urrea-Rojas, A.M. & Lopera-Barrero, N.M (2017). Cross-amplification of heterologous microsatellite markers in Piracanjuba. Ciência Rural, 47(12), 1-6. doi:10.1590/0103-8478cr20170374

Cajado, R. A., Oliveira, L. S., Oliveira, C. C., Ponte, S. C. S., Bittencourt, S. C. S., Queiroz, H. L. & Zacardi, D. M. (2018). Distribuição de larvas de Brycon amazonicus (PISCES: BRYCONIDAE) no entorno da Reserva de Desenvolvimento Sustentável Mamirauá: base ecológica para manejo. Revista Ibero Americana de Ciências Ambientais, 9(6),78-87, 2018. doi: 10.6008/CBPC2179-6858.2018.006.0010

Diyie, R. L.; Agyarkwa, S. K.; Armah, E.; Amonoo, N. A.; Owusu-Frimpong, I.; & Osei-Atweneboana, M. Y. (2021). Genetic variations among different generations and cultured populations of Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) in Ghana: Application of microsatellite markers. *Aquaculture*, 544,1-8. doi.10.1016/j.aquaculture.2021.737070

Earl, DA., & vonHoldt, B. M. (2012) Structure Harvester: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conservation Genetics Resources* 4:359–361. doi.org/10.1007/s12686- 011-9548-7

Evanno, G., Regnaut, S., & Goudet, J. (2005) Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular Ecology* 14:2611–2620. doi.org/10.1111/j.1365-294X.2005. 02553.x

Excoffier, L., & Lischer, H. E. L. (2010) Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular and Ecology Resources* 10,564–567. doi.org/10.1111/j.1755-0998. 2010.02847.x

Goudet, J. (2005) FSTAT: a program to estimate and test gene diversities and fixation indices (version 2.9.3.2)

Kalinowski, S. T., Taper, M. L., & Marshall, T. C. (2007) Revising how the computer program cervus accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. *Molecular Ecology*, 16,1099–1106. doi.org/10. 1111/j.1365-294X.2007.03089.x

Lima, D. L. G., Cajado, R. A., Silva, L. V. F., Maia, J. L. S. & Zacardi, D. M. (2021). Descrição morfológica do desenvolvimento inicial de *Brycon amazonicus* (Characiformes, Bryconidae) do Baixo Amazonas, Pará. *Biota Amazônia*, 11(1),60-67. doi: 10.18561/2179-5746

Lima, F. C. (2017). A revision of the cis-andean species of the genus *Brycon* Müller & Troschel (Characiformes: Characidae). *Zootaxa*, 4222(1), 1-189.

Lopera-Barrero, N. M., Povh, J. A., Ribeiro, R. P., Gomes, P. C., Jacometo, C. B., & Lopes, T. S. (2008). Comparison of DNA extraction protocols of fish fin and larvae

samples: modified salt (NaCl) extraction. *Ciencia e Investigación Agraria*, 35,65-74. doi: 10.4067/S0718-16202008000100008

Lopera-Barrero, N. M., Santos, S. C. A., Castro, P. L., Souza, F. P., Poveda-Parra, A. R., Pandolfi, V. C. F., Yamachita, A.L., Urrea-Rojas, A. M., Rojas-Meza, D. A., & Ribeiro, R. P. (2019). Genetic diversity of Piracanjuba populations in fish stocking programs in the Tietê River, Brazil. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 32(2),139-149. doi: 10.17533/udea.rccp.v32n2a07

Oliveira, R. C., Santos, M. C. F., Bernardino, G. & Hrbek, T. (2018). From river to farm: an evaluation of genetic diversity in wild and aquaculture stocks of *Brycon amazonicus* (Spix & Agassiz, 1829), Characidae, Bryconinae. *Hydrobiologia*, 805(1),75-88. doi: 10.1007/s10750-017-3278-0

Peakall, R. & Smouse, P. E. (2012). GenALEX 6.5: genetic analysis in excel. Population genetic software for teaching and research-an update. *Bioinformatics*, 28(19), 2537–2539. doi: 10.1093/bioinformatics/bts460

Peixe BR. (2021). Associação Brasileira de Piscicultura. Anuário Peixe BR da Piscicultura de 2022.

Penha, D. S., Souza, F. P., Lima, E. C. S., Urrea-Rojas, A. M., Pandolfi, V. C. F., Yamachita, A. L... Lopera-Barrero, N. M. (2020). Transferability of heterologous primers in *Brycon falcatus*. *Acta Amazônica*, 50(3), 232-238. doi: 10.1590/1809-4392201904191

R CORE TEAM. R: A language and environment for statistical computing. **R Foundation for Statistical Computing**, Vienna, Austria, 2020. Available at: <https://www.R-project.org/>.

Reis, R. & Lima, F. 2009. *Brycon amazonicus*. The IUCN Red List of Threatened Species. e: T167645A6362017.

Rozen, S. & Skaletsky, H. J. (2000). PRIMER 3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: *Bioinformatics methods and protocols: methods in molecular biology*. Berlin, Germany: Springer.

- Santos, L. C.; & Batista, V. S. (2009). Dinâmica populacional da matrinxã *Brycon amazonicus* (Characidae) na Amazônia Central. *Zoologia (Curitiba)*, 26(2),195–203. doi.org/10.1590/S1984-46702009000200001
- Schlötterer, C. The evolution of molecular markers—just a matter of fashion? *Nature reviews genetics*, 5(1),63-69, 2004
- Souza, F. P., Lima, E. C. S., Leite, N. G., Urrea-Rojas, A. M., Yamachita. A. L., Pandolfi, V. C. F. & Lopera-Barrero, N. M. (2018b). Transferability of heterologous microsatellite primers in *Brycon gouldingi*. *Ciência Rural*, 48(11),1-6. doi: 10.1590/0103-8478cr20180412
- Souza, F. P., Urrea-Rojas, A. M., Ruas, C. D. F., Povh, J. A., Ribeiro, R. P., Ruas, E. A.; Giacomini, R. M., Goes, B. D., Castro, P. L. D., & Lopera-Barrero, N. M. (2018a). Novel microsatellite markers for the endangered neotropical fish *Brycon orbignyanus* and cross-amplification in related species. *Italian Journal of Animal Science*, 17(4), 916-920. doi: 10.1080/1828051X.2018.1436008
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A. & Kumar, S. (2013). MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, 30(12),2725–2729. doi: 10.1093/molbev/mst197
- Urrea-Rojas, A. M., Souza, F. P., Lima, E. C. S., Gonçalves, L. U., Povh, J. A., Ayres, D. R., Bignardi, A. B., Pereira, U. P., & Lopera-Barrero, N. M. (2021). Genetic diversity of Matrinxã breeding stocks: implications for management and conservation. *Semina: Ciências Agrárias*, 42(2),757-768. doi: 10.5433/1679-0359.2021v42n2p757
- Vallone, P. M., & Butler, J.M. (2004) AutoDimer: a screening tool for primer-dimer and hairpin structures. *Biotechniques*, 37,226–231. doi.org/10.2144/04372ST03
- Van Oosterhout, C., Hutchinson, W. F., Wills, D. P. M., & Shipley, P. (2004) micro-checker: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular and Ecology Notes*, 4,535–538. doi.org/10.1111/j.1471-8286.2004.00684.x

Wright, S. (1978). *Evolution and genetics of populations: a treatise in four volumes: Vol. 4: variability within and among natural populations (4th ed.)*. Chicago: University of Chicago.

7 ARTIGO B- ARTIGO APRESENTADO NAS NORMAS DA REVISTA ANIMAL BIOTECHNOLOGY

Desenvolvimento e transferibilidade de primers microssatélite para *Brycon gouldingi*

Development and transferability of microsatellite primers for *Brycon gouldingi*

Highlights

Novos marcadores moleculares disponíveis para a espécie ameaçada *Brycon gouldingi*

Validação e avaliação genética em indivíduos naturais de *Brycon gouldingi*

Sucesso na transferibilidade dos marcadores moleculares em três espécies do gênero *Brycon*

Disponibilidade de novos marcadores moleculares para estudos genéticos em peixes da família Characidae

Resumo

Brycon gouldingi, é um peixe endêmico da bacia Araguaia-Tocantins no Brasil. Os estoques naturais vêm-se diminuindo sendo catalogada como espécie ameaçada. Assim, estudos genéticos se fazem importante no direcionamento das estratégias de manejo e conservação. O objetivo do presente estudo foi desenvolver marcadores microssatélite específicos para a espécie *Brycon gouldingi* e avaliar a transferibilidade com outras espécies do mesmo gênero. Foi desenvolvida uma biblioteca enriquecida e realizada amplificação através de sequenciador automático. Dos 17 primers desenvolvidos, oito foram implementados na análise genética. Sete apresentaram características polimórfica e só um foi monomórfico (Bgoul74A). O tamanho dos fragmentos variou de 132 pb (Bgoul84B) a 323 pb (Bgoul182). Foi observado um desequilíbrio significativo ($p < 0,05$) nos loci (Bgoul84A, Bgoul84B, Bgoul87B, Bgoul179 e Bgoul183). O valor médio de coeficiente de endogamia após o ajuste nominal foi de 5% (0,00625) foi positivo e significativo F_{IS} : 0,519. Os resultados de transferibilidade indicaram o alto potencial dos novos *primers* na mensuração de parâmetros de diversidade genética e estrutura populacional em estudos futuros para o gênero *Brycon*.

Palavras-chaves: Biologia molecular. Marcador molecular. Peixe. Piabanha.

Abstract

Brycon gouldingi is an endemic fish from the Araguaia-Tocantins basin in Brazil. Its natural stocks have been decreasing and it is classified as a threatened species. Thus, genetic studies are important in directing management and conservation strategies. The objective of this study was to develop microsatellite markers specific for the species *Brycon gouldingi* and to evaluate the transferability with other species of the same genus. An enriched library was developed and amplification was performed using an automated sequencer. Of the 17 primers developed, eight were implemented in the genetic analysis. Seven showed polymorphic characteristics and only one was monomorphic (Bgoul74A). The fragment sizes ranged from 132 bp (Bgoul84B) to 323 bp (Bgoul182). Significant imbalance ($p < 0.05$) was observed at the loci (Bgoul84A, Bgoul84B, Bgoul87B, Bgoul179 and Bgoul183). The mean value of endogamy coefficient after nominal adjustment was 5% (0.00625) was positive and significant F_{IS} : 0.519. The transferability results indicated the high potential of the new primers in measuring genetic diversity and population structure parameters in future studies for the genus *Brycon*.

Keywords: Fish. Molecular Biology. Molecular marker. Piabanha.

Introdução

Entre as principais causas na perda da biodiversidade nos ecossistemas aquáticos e terrestres no Brasil encontramos a fragmentação e a degradação dos habitats; as recentes mudanças no Código Florestal; construção de barragens é a criação de peixes não nativos em tanques-redes nos reservatórios hidroelétricos Pelicice et al. (2014). A manutenção das propriedades naturais dos habitats aquáticos é importante para os peixes, especialmente os migratórios os quais precisam do fluxo natural e extensas áreas de habitat com o fim de completar com sucesso seu ciclo reprodutivo Zambadi et al. (2020).

A piabanha *Brycon gouldingi* Lima, 2004 é uma espécie de peixe endêmico da Bacia Araguaia-Tocantins (Lima, 2004). Habita ambientes bentopelágicos e consome uma dieta a base de frutas e insetos Faustino et al. (2018). Na área de distribuição do

B. gouldingi estão acontecendo alterações em seu ambiente natural como a construção das usinas hidroelétricas da Serra da Mesa, Peixe Angical, Lajeado, Estreito e Tucuruí, o que quebra as migrações naturais da espécie, alterando sua reprodução Souza et al. (2017). A espécie atualmente encontra-se na Lista Vermelha da IUCN listada como espécie ameaçada (EN) (ICMBio, 2021).

Poucas são as pesquisas realizadas na obtenção de informações taxonômicas (Lima, 2017), morfológicas e de desenvolvimento (Faustino et al. 2015), ambientais e ecológicas (Albrecht et al. 2009) e apenas duas pesquisas na área de genética foram encontradas na espécie *B. gouldingi*. Antunes et al. (2010) avaliaram as relações filogenéticas entre as espécies *Brycon orbignyanus*, *B. hilarii*, *B. cf. B. pesu*, *B. cephalus*, *B. falcatus* e *B. gouldingi* mediante a implementação de marcadores mitocondriais e ISSR. No segundo os autores avaliaram a diversidade genética através da implementação de *primers* microssatélites mediante ampliações heterólogas Souza et al. (2018).

Entre as ferramentas genéticas, os marcadores microssatélites têm sido usados há anos nas análises genéticas em peixes (Abdul-Muneer et al., 2014). Devido ao seu alto polimorfismo, distribuição ao longo do genoma e a sua característica co-dominante, os marcadores microssatélites possibilitam a obtenção de muitas informações genéticas (Vieira et al. 2016). Entretanto, seu uso apresenta como contratempo a necessidade de *primers* específicos para cada espécie, sendo geralmente feito o uso de *primers* heterólogos do mesmo gênero (Lopera-Barrero et al., 2016; Castro et al., 2017; Souza et al., 2018), procedimento que dificulta a obtenção de resultados adequados. Assim, estudos direcionados para o desenvolvimento de *primers* específicos são necessários para abrir novas possibilidades de pesquisas genéticas, como é o caso do *B. gouldingi*, espécie para a qual não há marcadores específicos na atualidade.

Dessa forma, o objetivo do presente estudo foi desenvolver *primers* microssatélite específicos para *B. gouldingi* e realizar uma análise de transferibilidade destes *primers* com outras espécies do mesmo gênero.

Material e Métodos

A pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética na Utilização de Animais da Universidade Estadual de Londrina (CEUA / UEL N °: 2166.2020.33).

Desenvolvimento dos marcadores microssatélites

Foram coletadas amostras de nadadeira caudal (aproximadamente 0,5 cm²) de nove indivíduos de *Brycon gouldingi*. A extração de seu DNA genômico foi de acordo com o protocolo NaCl, conforme determinado por Lopera-Barrero et al. (2008). O DNA genômico foi quantificado mediante um espectrofotômetro SLIPQ 026 - Quantificador L-Quant (Loccus Biotecnologia, Ribeirão Preto - BR). Posteriormente, a integridade do DNA foi verificada em gel de agarose (1%) com tampão de ácido 1-Tris-borato-etilenodiaminotetracético (TBE) por 60 minutos a 100 V e 400 mA.

Foi desenvolvida uma biblioteca enriquecida, usando o método de captura por hibridização de Billote et al. (1999), com sondas (AGA) 5, (CT) 8 e (GT) 8 na fase de enriquecimento. O DNA genômico extraído (5 µg) de *B. gouldingi* foi digerido com 50 U da enzima de restrição RsaI tipo II (Promega, Madison, EUA) para obter vários fragmentos com sequência de terminação conhecida. Estes fragmentos foram conectados aos adaptadores de fita simples (10 mM) Rsa21 (5'-CTCTTGCTTACGCGTGGACTA-3') e Rsa25 (5'-TAGTCCACGCGTAAGCAAGAGCACA-3') com T4 DNA ligase (Promega, Madison, WI). Para a ligação, a incubação foi realizada a 20 °C durante duas horas.

Os fragmentos foram selecionados por hibridização com os oligonucleotídeos ligados a uma biotina, complementares às sequências de microssatélites. Esses fragmentos foram capturados usando esferas magnéticas revestidas com estreptavidina com alta capacidade de conjugação com biotina (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA). Os fragmentos enriquecidos com microssatélites foram amplificados via reação em cadeia da polimerase (PCR) com primers para Rsa21, clonados no vetor pGEM-T Easy (Promega) e transformados em competentes mediante *Escherichia coli* JM109 (Promega). Plasmídeos de colônias únicas foram isolados e sequenciados usando o kit de sequenciamento Big Dye Terminator versão 3.1 (Applied Biosystems, Foster City, CA) em analisador genético automatizado (ABI 3500xL, Applied Biosystems) usando o primer de cauda M13 (5'-TGTA AACGACGGCCAGT-3').

Finalmente, A leitura e a análise das sequências foram realizadas pelo software MEGA versão 6.0 (Tamura et al. 2013). As sequências que apresentaram baixa qualidade ou pouca especificidade foram excluídas. A construção dos marcadores microssatélites foi feito por meio do software Primer3, versão 2.0.4.0 (Rozen & Skaletsky, 2000). Todos os primers foram testados para possíveis interações primer-

primer e estruturas sobrepostas (Hairpin) mediante o software AutoDimer 1.0 (Vallone e Butler 2004).

O marcador desenvolvido foi testado em três amostras de *B. Gouldingi*, para padronização da temperatura de anelamento. Os produtos desses testes foram visualizados em gel de agarose (3%) submetidos à eletroforese com tampão de ácido TBE por 120 minutos a 100 V e 200 mA. Com base na melhor resolução das bandas no gel e descarte dos primers que não apresentaram especificidade, foram selecionados um total de 17 primers para validação, transferibilidade.

Extração do DNA e validação dos novos marcadores moleculares

O DNA genômico foi extraído de um total de 16 indivíduos de *B. Gouldingi* do Rio Araguaia, Mato Grosso, Brasil. Através de fragmentos da nadadeira caudal utilizando o protocolo de NaCl, conforme descrito por Lopera-Barrero et al. (2008). O produto dessa extração foi quantificado em espectrofotômetro SLIPQ 026 - Quantificador L-Quant (Loccus Biotecnologia, Ribeirão Preto, Brasil) e diluído para 30 ng/μL para padronização da concentração da amostra. Posteriormente, a integridade do DNA foi verificada em gel de agarose (1%) com tampão 1 x TBE por 1 h a 100 V e 400 mA.

A amplificação foi realizada através de PCR em um volume final de reação de 15 μL contendo enzima recombinante "hot start" Taq DNA Polimerase (1,0 U / μL) (LGC Biotecnologia, Cotia - SP); Tampão 1 x sem MgCl₂; 2,0 mM de MgCl₂; 0,2 mM de dNTP; Forward - iniciador direto (0,12 μL); primer reverse - iniciador reverso (0,48 μL); 0,48 μL de iniciador de cauda M13 (5'-TGTTAAACGACGGCCAGT-3') marcado com sondas FAM, HEX, NED ou PET (Applied Biosystems); 1 μL de DNA genômico (30 ng / μL) e água livre Miliq para um volume total de 15 μL. O ciclo de PCR foi realizado nas seguintes condições: quatro minutos de desnaturação inicial a 94 °C; seguido por 35 ciclos de 45 segundos de desnaturação a 94 °C; 30 segundos de anelamento a 64 °C; e 1 minuto de extensão a 72 °C; seguido por uma extensão final de 10 minutos a 72 °C.

Os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese capilar automatizada em analisador genético (ABI 3500xL) utilizando GS-600 LIZ (Thermo Fisher Scientific) como marcador interno de peso molecular. Os alelos foram visualizados por meio do software GeneMarker, versão 2.6.3 (SoftGenetics LLC).

Testes de amplificação cruzada

Foram realizados testes de amplificação cruzada com os *primers* validados em três espécies do gênero *Brycon*: 16 amostras de *B. orbignyanus*, 16 amostras de *B. falcatus* e 16 amostras de *B. amazonicus*. A metodologia e amplificação dos SSR implementada foi a mesma a qual já foi descrita.

Análise estatística nas amplificações espécie-específicas e heterólogas

Foi verificada a heterozigosidade observada (H_o) e esperada (H_e), equilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE), e o índice de fixação (F_{ST}) (nível de significância de 0,05) a través do software GenAlEx versão 6.5 (Peakall e Smouse, 2012). Como método de diferenciação dos valores de F_{ST} , foi utilizada a definição de Wright (1978), onde valores entre 0,00 e 0,05, 0,051 e 0,15, 0,151 e 0,25 e $> 0,25$ indicam diferenciação genética pequena, moderada, alta e muito alta, respectivamente.

O coeficiente de endogamia (F_{IS}) foi calculado usando o software FSTAT versão 2.9.3.2 (Goudet 2005). A presença de alelos nulos foi testada com o software Micro-Cheker (Van Oosterhout et al. 2004). O conteúdo de informação polimórfica (PIC) foi calculado usando o software Cervus versão 3.0.7 (Kalinowski et al. 2007) e classificado de acordo com Botstein et al. (1980). Sendo que valores $PIC > 0,5$; entre 0,5-0,25 e $< 0,25$ indicam que são altamente informativos, razoavelmente informativos e pouco informativos, respectivamente.

Nas amplificações heterólogas, foram determinados o número de alelos produzidos (N_a) e a taxa de sucesso da amplificação ($As\%$) (porcentagem de bandas com amplificação satisfatória).

Resultados e Discussão

Dos 17 primers desenvolvidos e testados, oito loci microssatélites foram implementados na análise genética nos indivíduos de *Brycon gouldingi*. Sete apresentaram característica polimórfica e só um monomórfico (Bgoul87A). O tamanho em pares de bases variou de 132 pb (Bgoul84B) a 233 pb (Bgoul182). As características e sequências de cada iniciador são apresentadas na Tabela 6.

O conteúdo de informação polimórfica (PIC) variou de altamente (Bgoul179, Bgoul183) a razoavelmente (Bgoul84A, Bgoul176, Bgoul182) e pouco informativo nos iniciadores (Bgoul84B, Bgoul87A, Bgoul87B) (Tabela 6). O fato de Bgoul84B,

Bgoul87A e Bgoul87B serem pouco informativos é devido a presença de alelos nulos, o que foi confirmado pelo programa Micro-Checker para Bgoul84B e Bgoul87B, e no caso do Bgoul87A foi possivelmente devido a sua característica monomórfica. No entanto, no iniciador Bgoul183 também foi confirmada a presença de alelos nulos, porém não interferiu na variabilidade genética neste caso.

Tabela 7. Caracterização dos marcadores microssatélites para *Brycon gouldingi*

Locus	SSR Motif	Repetição	Sequência Primer (5'-3')	TA (°C)	pb	PIC
Bgoul84A	(AG) ₇	Di-	F: TCGTCGAGATCCAGTTCAGG R: CCGGGTGCTGAATCTCCTC	64	216-224	0,388
Bgoul84B	(TG) ₄	Di-	F: ACCACCGCGTCAAATAAC R: GAGGACAACTGGTAATGCTTCA	64	132-136	0,215
Bgoul87A	(TG) ₃ N (TA) ₂ (TG) ₅	Complex	F: ACTGACCTATGACGTGACACA R: GCTCCCACTCCAGTTCTTCT	64	189	-
Bgoul87B	(AG) AC (AG) ₆ (TG) ₃ (AG) ₄ (AT) ₃	Complex	F: GAGTGGACCTGGTGATCATAAA R: GCTGACTTGCAATGAATTCCT	64	153-161	0,21
Bgoul176	(GTG) ₃	Tri-	F: CTGCGTGGATGGGTAAAGG R: CTGGGACACAACAGCAAACA	64	176-186	0,371
Bgoul179	(GT) ₄	Di-	F: ACACTGAGTCATGGGTCTGT R: CTTCTTGACCTCACCTGCCT	64	141-200	0,56
Bgoul182	(CT) ₄ CC (CT) ₃ GC (CT) CG TT CA (CT) ₃	Complex	F: GTTTCCCCTTCATCACCAGC R: ACCAAAGTCAACCGTCCTAGT	64	301-323	0,302
Bgoul183	(GT) ₄ CT TT(GT) ₃ GC(GT) ₁₀	Complex	F: GTGACTGTGGGTTTTGGTGG R: CGTTCTGTCAGCGTTTGGAA	64	248-274	0,504

Temperatura de anelamento (TA °C), tamanho dos alelos em pares de bases (pb) e conteúdo de informação polimórfico (PIC)
Di-: Dimer; Tri-: Trimer; Com: Complex; pb: pares de bases.

Na análise genética dos indivíduos de *B. gouldingi* foram gerados o total de 23 alelos. O número de alelos variou de um (Bgoul87A) a quatro nos iniciadores (Bgoul176, Bgoul179, Bgoul182 e Bgoul183) (Tabela 7). A H_o média observada (0,1654) foi menor em comparação a H_e média (0,345). Resultados semelhantes foram encontrados no estudo de transferibilidade de primers em *B. gouldingi* com valores médios de H_o (0,157) menores, em comparação aos valores médios de H_e (0,357) por Souza et al. (2018). Assim mesmo, o número de alelos per locus relatado por esses autores variou de 2 a 3, exibindo resultados semelhantes aos encontrados no presente estudo em indivíduos naturais pertencentes ao rio Araguaia e a espécie *B. gouldingi*.

Em comparação com outras espécies do gênero *Brycon*, Penha et al. (2020) avaliaram a diversidade genética em indivíduos selvagens de *B. falcatus* no rio Araguaia, encontrando valores médios de 0,294 para H_o e 0,406 para H_e . Coimbra et al. (2020) avaliaram a diversidade genética em indivíduos de *B. orthotaenia* pertencentes ao rio São Francisco, e os valores de H_o variaram entre 0,169 e 0,900 e H_e variaram entre 0,238 e 0,897. Castro et al. (2017) estudaram a diversidade genética em *B. orbignyanus* do centro de repovoamento do rio Tietê, reportando valores médios de 0,391 para H_o e de 0,423 para H_e . De forma geral, os resultados encontrados no presente estudo (Tabela 7) são próximos aos relatados por esses autores e expressam variabilidade genética moderada no gênero *Brycon*. Da mesma forma, o número de locus pode variar dependendo da espécie estudada e do tamanho da mostra, refletindo variações na análise da diversidade genética (Penha et al., 2020).

Foi observado o desvio do desequilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE) significativo ($p < 0,05$) nos loci (Bgoul84A, Bgoul84B, Bgoul87B, Bgoul179 e Bgoul183), o que está possivelmente relacionado com a presença de alelos nulos identificados nos iniciadores (Bgoul84B, Bgoul87B e Bgoul183) (Tabela 7). No entanto, no caso do loci Bgoul179, o desvio no (HWE) está relacionado ao déficit de heterozigotos e com a alta frequência encontrada em seus alelos.

O valor médio de coeficiente de endogamia após o ajuste nominal do 5% (0,00625) foi positivo e significativo F_{IS} : 0,519 (Tabela 7), provavelmente causado pela deficiência de indivíduos heterozigotos na população avaliada. A avaliação da diversidade e estrutura genética em populações de *B. gouldingi* através dos novos primers microssatélites foi útil para a obtenção de novos resultados e ferramentas

disponíveis para o desenvolvimento de metodologias na avaliação da base genética da espécie, a fim de orientar os acasalamentos dos estoques ou populações naturais (programas de repovoamento). Nessa condição é possível controlar a consanguinidade e obter progênes com alta diversidade genética, que sejam capazes de sobreviver a diferentes ambientes, aumentando sua capacidade de adaptação (Yamachita et al., 2020).

Lembrando que a espécie alvo conta com poucos estudos de diversidade genética, além de encontrar-se na lista vermelha de espécies ameaçadas, destaca-se a importância da realização de mais estudos em populações naturais de diferentes bacias hidrográficas. A fim de obter resultados que permitam conhecer a estrutura genética populacional e podam-se direcionar medidas que permitam realizar programas de conservação do *B. gouldingi*, evitando a extinção da espécie e problemas de perda da diversidade genética e sua capacidade de adaptação da espécie.

Tabela 8. Resultado da análise de diversidade genética nos indivíduos de *Brycon gouldingi*

	Locus	Na	Ne	Ho	He	HWE	F _{IS}
	Bgoul84A	3	2	0,267	0,427	0,001*	0,404
	Bgoul84B	3	1	0,000	0,227	0,000*	1,000
	Bgoul87A	1	1	Monomórfico			
<i>Brycon</i>	Bgoul87B	3	1	0,063	0,225	0,000*	0,737
<i>gouldingi</i>	Bgoul176	4	2	0,250	0,406	0,227	0,421
	Bgoul179	4	3	0,563	0,619	0,000*	0,123
	Bgoul182	4	1	0,182	0,318	0,084	0,467
	Bgoul183	4	2	0,000	0,545	0,000*	1,000
	Media	3	3	0,1654	0,345	0,038	0,519*

Número de alelos por locus (Na), alelos efetivos (Ne), heterozigosidade observada (Ho) e esperada (He), teste de equilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE) e coeficiente de endogamia (F_{IS}). Resultados destacados com * são significativos (P < 0,05).

Assim mesmo, nos testes de amplificação heteróloga dez pares de iniciadores apresentaram transferibilidade. A maior taxa de sucesso na amplificação (SA>80%) foi encontrada nas espécies de *B. falcatus* e *B. amazonicus*. A espécie que apresentou maior número de alelos foi *B. falcatus* com 27 alelos no total, o locus que mais apresentaram alelos foram Bgoul183 com 6 e Bgoul182 com 5 alelos, seguido do *B. amazonicus* com 18 alelos no total com quatro alelos no loci Bgoul178 e três alelos no

Bgoul183. O tamanho dos alelos variou de 136 pb (Bgoul84B) a 321 pb (Bgoul182), estes resultados são semelhantes aos encontrados na análise de diversidade no *B. gouldingi* no presente estudo (Tabela 8).

Tabela 9. Amplificação cruzada nas espécies do gênero *Brycon*.

Locus	Espécie			
	<i>B. orbignyanus</i>	<i>B. falcatus</i>	<i>B. amazonicus</i>	
Bgoul84A	pb	218	216-218-223	218
	Na	1	3	1
	As	18,75%	81,25%	100,00%
Bgoul84B	pb	136	132-136	136
	Na	1	2	1
	As	25,00%	100%	100,00%
Bgoul87A	pb	0	189	187-189
	Na	0	1	2
	As	0%	87,50%	93,75%
Bgoul87B	pb	157	153-157	153-155
	Na	1	2	2
	As	37,50%	93,75%	100,00%
Bgoul176	pb	186	142-186	142-186
	Na	1	2	2
	As	31%	56,25%	93,75%
Bgoul178	pb	181-187	164-208	164-181-200-208
	Na	2	2	4
	As	93,75%	50,00%	69%
Bgoul179	pb	200	176	200
	Na	1	1	1
	As	75,00%	81,25%	63%
Bgoul182	pb	321	293-297- 301-304-321	318-321
	Na	1	5	2
	As	18,75%	93,75%	56,25%
Bgoul183	pb	274-276-280	243-248- 255-268- 270-274	258-268-270
	Na	3	6	3
	As	100%	93,75%	62,5%
Bgoul188	pb	260	160-175	137
	Na	1	2	1
	As	87,5%	93,75%	25%

Tamanho do alelo (pb), Número de alelos (Na), e Sucesso na Amplificação (%).

Estudos em *B. orbignyana* (Carmo et al., 2015; Castro et al., 2017), *B. gouldingi* (Souza et al., 2018) e *B. falcatus* (Penha et al., 2020) demonstram que o gênero apresenta grande sucesso na transferibilidade de primers o que é concordante com os resultados obtidos no presente estudo. O sucesso na transferibilidade confirma que a região flanqueada pelos SSRs possui tamanho constante apesar das variações no local de anelamento, permitindo amplificações heterólogas ou cruzadas (Urrea-Rojas et al., 2021).

O grau de conservação das regiões de ligação do primer no DNA é determinante (Souza et al., 2018). Isso demonstra o alto potencial desses marcadores para medir parâmetros de diversidade genética e estrutura populacional em estudos futuros para o gênero *Brycon*, considerando-se as espécies do gênero como evolutivamente próximas.

Conclusão

Novos marcadores moleculares microssatélites foram desenvolvidos para a espécie *Brycon gouldingi*. Disponibilizando-se novas ferramentas moleculares com o fim de ajudar a conservação da espécie *Brycon gouldingi*. Foi possível a transferibilidade em espécies correlacionadas *B. orbignyana*; *B. falcatus* e *B. amazonicus*. Garantindo a viabilidade de desenvolver novas pesquisas na área da genética, tanto na análise de diversidade genética como na avaliação da estrutura populacional no gênero *Brycon*.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior” (CAPES) e ao Programa de Pós Graduação em Ciência Animal (Universidade Estadual de Londrina) pelo apoio e financiamento.

Referências

Abdul-Muneer, P. M. (2014). Application of microsatellite markers in conservation genetics and fisheries management: recent advances in population structure analysis and conservation strategies. *Genetics Research International*, 2014,1-11. doi: 10.1155/2014/691759

- Albrecht, M. P., Caramaschi, É. P., & Horn, M. H. (2009). Population responses of two omnivorous fish species to impoundment of a Brazilian tropical river. *Hydrobiologia*, 627(1), 181-193. doi: 10.1007/s10750-009-9727-7
- Antunes, R. S. P., Gomes, V. N., Prioli, S. M. A. P., Prioli, R. A., Júlio Jr, H. F., Prioli, L. M., Agostinho, C. S., Prioli, A. J. (2010). Molecular characterization and phylogenetic relationships among species of the genus *Brycon* (Characiformes: Characidae) from four hydrographic basins in Brazil. *Genetics and Molecular Research*, 9(2), 674-684. doi: 10.4238/vol9-2gmr759
- Billotte, N., Lagoda P. J. R., Risterucci, A. M. & Baurens, F. C. (1999). Microsatellite-enriched libraries: applied methodology for the development of SSR markers in tropical crops. *Fruits*, 54(4), 277–288.
- Botstein, D., White, R. L., Skolnick, M., & Davis, R. W. (1980). Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *American Journal Human Genetics*, 32, 314–331. doi.org/10.17348/era.9.0.151-162.
- Carmo, F.M.D.S., Polo, É.M., Silva, M.A.D. and Yazbeck, G.D.M., 2015. Optimization of heterologous microsatellites in Piracanjuba. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 50, 1236-1239.
- Castro, P.L., Ribeiro, R. P., Santos, S. C. A., Goes, E. S. R., Souza, F. P., Poveda-Parra, A. R., Vargas, L., Urrea-Rojas, A. M., & Lopera-Barrero, N. M. (2017). Cross-amplification of heterologous microsatellite markers in Piracanjuba. *Ciência Rural*, 47(12), e20170374. doi: 10.1590/0103-8478cr20170374
- Coimbra, M. R., Dantas, H. L., Luna, M. M., Lima, M. A., Sales, M., da Silva, B. C., & Lima, A. P. (2020). High gene flow in two migratory Neotropical fish species, *Salminus franciscanus* and *Brycon orthotaenia*, and implications for conservation aquaculture. *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems*, 30(6), 1063-1073.
- Faustino, F., Makino, L. C., Neumann, E., & Nakaghi, L. S. O. (2015). Morphological and morphometric aspects of early life stages of piabanha *Brycon gouldingi* (Characidae). *Journal of Fish Biology*, 86(5), 1491-1506, 2015. doi: 10.1111/jfb.12652

Faustino, F., Makino, L. C., Neumann, E., & Nakaghi, L. S. O. (2018). Ultrastructure aspects of *Brycon gouldingi* (Teleostei, Characidae) related to swimming ability and feeding during larval development. *Journal of Fish Biology*, 92(5), 1560-1573. Doi: doi:10.1111/jfb.13612

Goudet, J. (2005) FSTAT: a program to estimate and test gene diversities and fixation indices (version 2.9.3.2).

ICMBio- Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade. *Brycon gouldingi*. The IUCN Red List of Threatened Species 2021: e.T134695006A134695015.

Kalinowski, S. T., Taper, M. L., Marshall, T. C. (2007). Revising how the computer program cervus accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. *Molecular Ecology*, 16,1099–1106. doi.org/10.1111/j.1365-294X.2007.03089.x.

Lima, F. C. T. (2004). *Brycon gouldingi*, a new species from the Rio Tocantins drainage, Brazil (Ostariophysi: Characiformes: Characidae), with a key to the species in the basin. *Ichthyological Exploration of Freshwaters*, 15(3), 279–287.

Lima, F. C. T. (2017). A revision of the cis-andean species of the genus *Brycon* Müller & Troschel (Characiformes: Characidae). *Zootaxa*, 4222(1), 1-89. doi: 10.11646/ZOOTAXA.4222.1.1

Lopera-Barrero, N. M., Povh, J. A., Ribeiro, R. P., Gomes, P. C., Jacometo, C. B., & Lopes, T. S. (2008). Comparison of DNA extraction protocols of fish fin and larvae samples: modified salt (NaCl) extraction. *Ciencia e Investigación Agraria*, 35, 65-74. doi: 10.4067/S0718-16202008000100008

Lopera-Barrero, N. M., Tanamati, F., Rodriguez-Rodriguez, M. del P., Povh, J. A., Poveda-Parra, A. R., Otonel, R. A. A., Castro, P. L., Goes, E. S. R., Furlan, P. J., & Ribeiro, R. P. (2016). Cross-amplification of heterologous microsatellite markers in *Rhamdia quelen* and *Leporinus elongatus*. *Semina: Ciências Agrárias*, 37(1), 517-524. doi: 10.5433/1679-0359.2016v37n1p517

Peakall, R., & Smouse, P. E. (2012). GenAEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research—an update. *Bioinformatics*, 28, 2537–2539. doi.org/10.1093/bioinformatics/bts460

Pelicice, F. M., Vitule, J. R. S., Lima Junior, D. P., Orsi, M. L., & Agostinho, A. A. (2014). A serious new threat to Brazilian freshwater ecosystems: the naturalization of nonnative fish by decree. *Conservation Letters*, 7(1), 55-60. doi: 10.1111/conl.12029

Penha, D.D.S., Souza, F.P.D., Lima, E.C.S.D., Urrea-Rojas, A.M., Pandolfi, V.C.F., Yamachita, A.L., Povh, J.A., Leite, N.G., Pereira, U.D.P. and Lopera-Barrero, N.M., 2020. Transferability of heterologous primers in *Brycon falcatus*. *Acta Amazonica*, 50, pp.232-238.

Rozen, S. & Skaletsky, H.J. (2000). PRIMER 3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: *Bioinformatics methods and protocols: methods in molecular biology*. Berlin, Germany: Springer.

Souza, M. F., Marques, E. E., Miranda, E. B., & Araujo, A. F. (2017). Do rio Tocantins a Hidrelétrica de Peixe Angical: os peixes e as pescarias na memória dos pescadores. *Revista Interface (Porto Nacional)*, (12), 119-134. Doi:

Souza, F. P., Lima, E. C. S., Leite, N. G., Urrea-Rojas, A. M., Yamachita, A. L., Pandolfi, V. C. F. & Lopera-Barrero, N. M. (2018). Transferability of heterologous microsatellite primers in *Brycon gouldingi*. *Ciência Rural*, 48(11), 1-6. doi: 10.1590/0103-8478cr20180412

Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., FilipSKI, A. & Kumar, S. (2013). MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, 30(12), 2725–2729. doi: 10.1093/molbev/mst197

Urrea-Rojas, A. M., Souza, F. P., Lima, E. C. S., Gonçalves, L. U., Povh, J. A., Ayres, D. R., Bignardi, A. B., Pereira, U. P., & Lopera-Barrero, N. M. (2021). Genetic diversity of Matrinxã breeding stocks: implications for management and conservation. *Semina: Ciências Agrárias*, 42(2), 757-768. doi: 10.5433/1679-0359.2021v42n2p757

Van Oosterhout, C., Hutchinson, W. F., Wills, D. P. M., & Shipley, P. (2004). micro-checker: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite

data. *Molecular Ecology Notes*, 4, 535–538. doi.org/10.1111/j1471-8286.2004.00684.x.

Vieira, M. L. C., Santini, L., Diniz, A. L., & Munhoz, C. F. (2016). Microsatellite markers: what they mean and why they are so useful. *Genetics and Molecular Biology*, 39(3), 312-328. doi: 10.1590/1678-4685-GMB-2016-0027

Wright, S. (1978) **Evolution and the genetics of populations**. University of Chicago Press, Chicago, IL.

Yamachita, A.L., Pandolfi, V.C.F., Souza, F.P.D., Godoy, S.M.D., Lima, E.C.S.D., Pereira, U.D.P., Povh, J.A., Campos, E.C., Ayres, D.R., Bignardi, A.B. and Ruas, C.D.F., 2020. Evaluation of a panel of microsatellite markers to study their applications in *Serrapinnus notomelas* and to reveal the genetic diversity in *Hyphessobrycon* eques. *Animal Biotechnology*, p.1-9.

Zambaldi, L., & Pompeu, P. S. (2020). Evaluation of river fragmentation and implications for the conservation of migratory fish in southeastern Brazil. *Environmental Management*, 65(5), 702-709. Doi: 10.1007/s00267-020-01266-9

8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Do ponto de vista genético, um dos objetivos desta tese foi a determinação da diversidade genética nas espécies alvo. Com isso, o desenvolvimento de ferramentas na biologia molecular tem permitido a determinação das variações entre os indivíduos e das populações avaliadas. Entre as ferramentas disponíveis encontram-se os marcadores microssatélites, os quais ajudam na avaliação dos recursos genéticos.

O desenvolvimento de marcadores microssatélites para duas espécies do gênero *Brycon* (*Brycon amazonicus* e *Brycon gouldingi*) foi possível nesta pesquisa através da metodologia de biblioteca enriquecida. Pretende-se que com os novos iniciadores possam ser utilizados em estudos visando a conservação, melhoramento genético, programas de repovoamento e manutenção da diversidade genética tanto no gênero *Brycon* como na família Characidae. Assim, podem ser realizados estudos comparando-se populações naturais com as mantidas em cativeiro.

Contudo, espera-se que os novos marcadores microssatélites possam ajudar nas populações mantidas em cativeiro no direcionamento dos acasalamentos e programas de reprodução, mantendo, sempre que possível, bons índices na diversidade genética. Nas populações naturais pretende-se, além da diversidade genética, obter resultados mais acurados sobre a sua estrutura genética e caracterização molecular das espécies que foram alvo desta pesquisa.