



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

VICTOR CÉSAR FREITAS PANDOLFI

**DESENVOLVIMENTO DE MARCADORES
MICROSSATÉLITES E AVALIAÇÃO DA DIVERSIDADE
GENÉTICA DO PEIXE ORNAMENTAL AMAZÔNICO
*Pterophyllum scalare***

Londrina
2020

VICTOR CÉSAR FREITAS PANDOLFI

**DESENVOLVIMENTO DE MARCADORES
MICROSSATÉLITES E AVALIAÇÃO DA DIVERSIDADE
GENÉTICA DO PEIXE ORNAMENTAL AMAZÔNICO**
Pterophyllum scalare

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

Orientador: Prof. Dr. Nelson Mauricio Lopera Barrero

Londrina
2020

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

P189d Pandolfi, Victor César Freitas.

DESENVOLVIMENTO DE MARCADORES MICROSSATÉLITES E AVALIAÇÃO DA DIVERSIDADE GENÉTICA DO PEIXE ORNAMENTAL AMAZÔNICO *Pterophyllum scalare* / Victor César Freitas Pandolfi. - Londrina, 2020.
53 f. : il.

Orientador: Nelson Mauricio Lopera-Barrero.

Coorientador: Claudete de Fatima Ruas.

Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, 2020.

Inclui bibliografia.

1. Aquicultura Ornamental - Tese. 2. Conservação genética - Tese. 3. Estrutura populacional - Tese. 4. Marcador molecular - SSR - Tese. I. Lopera-Barrero, Nelson Mauricio . II. Ruas, Claudete de Fatima. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal. IV. Título.

CDU 636

VICTOR CÉSAR FREITAS PANDOLFI

**DESENVOLVIMENTO DE MARCADORES MICROSSATÉLITES E
AVALIAÇÃO DA DIVERSIDADE GENÉTICA DO PEIXE
ORNAMENTAL AMAZÔNICO *Pterophyllum scalare***

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

BANCA EXAMINADORA

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

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

Profa. Dra. Sara Mataroli de Godoy
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Londrina, 28 de fevereiro de 2020.

Dedico este trabalho a minha família que sempre me apoiou para continuar com meus estudos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Universidade Estadual de Londrina pela possibilidade de cursar a Pós-Graduação no programa de Ciência Animal e obter o título de mestre.

Agradeço a CAPES pela oportunidade de ter cursado todo esse período com o auxílio de uma bolsa.

Aos meus pais José Carlos Pandolfi, Wilma Freitas Pandolfi e a minha irmã Thaís Juliana Freitas Pandolfi, por terem me ajudados em todos os momentos difíceis que eu passei.

Ao professor Dr. Nelson Mauricio Lopera Barrero, por ter me aceitado como orientado, ter confiado em mim e me dando liberdade para a condução dessa pesquisa, e por todos os outros momentos de amizade que extrapolam o ambiente acadêmico.

Aos meus amigos de trabalho do NEPAG, Andrei, Felipe e Ed pela ajuda em todas as atividades do laboratório, pelas quais, foi possível a realização deste trabalho. Aos outros membros do grupo, Natalia, Angela e Filipe que acabaram não participando diretamente das atividades, mas contribuíram diversas formas durante estes dois anos. A todos os meus calouros que participaram das reuniões, onde eu aprendi a transmitir meu conhecimento de maneira clara, o que contribuiu muito para o meu crescimento como cientista e espero que eu tenha contribuído igualmente para a formação acadêmica de todos vocês.

A todos os meus amigos que me suportaram durante o mestrado explicando minha pesquisa em todas as oportunidades possíveis e por terem proporcionado momentos ótimos de descontração e por me aconselharem em momentos de desespero.

“Por milhões de anos, a humanidade viveu como os animais. Então aconteceu algo que desencadeou o poder da nossa imaginação. Nós aprendemos a falar. E nós aprendemos a ouvir. A fala tem permitido a comunicação de ideias, permitindo aos seres humanos trabalhar em conjunto. Para construir o impossível. As maiores conquistas da humanidade surgiram em decorrência da fala. E os maiores fracassos pela falta dela. Não precisa ser desta forma! Nossas maiores esperanças poderiam se tornar realidade no futuro. Com a tecnologia à nossa disposição, as possibilidades são ilimitadas. Tudo o que precisamos fazer é garantir que continuemos conversando.”

Stephen Hawking

PANDOLFI, Victor César Freitas. **Desenvolvimento de marcadores microssatélites e avaliação da diversidade genética do peixe ornamental amazônico *Pterophyllum scalare***. 2020. 53 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2020.

RESUMO

O acará-bandeira (*Pterophyllum scalare*) é um peixe de água doce que está distribuído em diversas regiões da América do Sul, estando presente na bacia do rio Amazonas, no Brasil, Colômbia, Guianas e Peru. Ele apresenta elevada demanda de mercado, estando entre uma das espécies ornamentais mais importantes. Devido a sua importância biológica, econômica e as crescentes pressões humanas sobre seu habitat, nenhum *primer* microssatélite foi desenvolvido para pesquisas da sua estrutura genética. O objetivo do presente trabalho foi desenvolver *primers* espécie-específicos para o *P. scalare* e analisar a estrutura genética de uma população selvagem e três estoques comerciais. Foram coletadas amostras da nadadeira caudal de 24 indivíduos do rio Amazonas, na região de Macapá - AP, 24 da linhagem comum e 24 da linhagem marmorato e 24 da linhagem palhaço, todas de criadores de Vieras - MG. Foram identificados oito *loci* polimórficos e 66 alelos com 4,250 a 4,625 alelos por locus. O conteúdo da informação polimórfica variou entre 0,031 a 0,827. Observou-se alta diferenciação genética par a par entre a população selvagem e os estoques e moderada entre somente os estoques. Foi observado desvio no equilíbrio de Hardy-Weinberg na população e nos estoques. As análises de estrutura populacional não demonstrou sobreposição entre a população e os estoques demonstrou a existência de duas subpopulações (selvagem) e as três (comerciais). Os *primers* desenvolvidos servem como ferramenta para as análises de diversidade e estrutura genética e estudos de conservação do *P. scalare*.

Palavras-chave: Aquicultura ornamental. Conservação genética. Estrutura populacional. Marcador molecular. SSR.

PANDOLFI, Victor César Freitas. **Development of microsatellite markers and evaluation of genetic diversity of the amazonian ornamental fish *Pterophyllum scalare***. 2020. 53 p. Dissertation (Master's degree in Animal Science) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2020.

ABSTRACT

The angelfish (*Pterophyllum scalare*) is a freshwater fish that is distributed in various regions of South America and is present in the Amazon River basin, in Brazil, Colombia, Guyana and Peru. It has high market demand, being among one of the most important ornamental species. Due to its biological and economic importance and the increasing human pressures on its habitat, no microsatellite primer has been developed for research into its genetic structure. The objective of the present work was to develop species-specific primers for *P. scalare* and to analyze the genetic structure of one wild population and three commercial stocks. Samples of the caudal fin were collected from 24 individuals from the Amazon River, in the region of Macapá - AP, 24 from the common lineage, 24 from the marmorato lineage and 24 from the clown lineage, all from fish farms from Vieras - MG. Eight polymorphic loci and 66 alleles were identified with 4,250 to 4,625 alleles per locus. The content of the polymorphic information ranged from 0.031 to 0.827. It was observed high pairwise genetic differentiation between population and stocks and moderate between only stocks. Hardy-Weinberg equilibrium deviation in population and stocks was observed. Population structure analyzes showed no overlap between population and the stocking showed two subpopulations (wild) and the three (commercial). The developed primers serve as a tool for the analysis of diversity and genetic structure and conservation studies of *P. scalare*.

Key-words: Genetic conservation. Molecular marker. Ornamental aquaculture. Population structure. SSR.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – <i>Pterophyllum scalare</i> , linhagem Marmorato	21
Figura 2 – Distribuição do <i>Pterophyllum scalare</i> na América do Sul	22
ARTIGO A –Development of microsatellite markers and evaluation of genetic diversity of the amazonian ornamental fish <i>Pterophyllum scalare</i>	32
Fig1 – <i>Pterophyllum scalare</i> wild type (a), common lineage (b), marble lineage (c) and (d) clown lineage.....	35
Fig2 – Collection point for the WIL population in the stretch of the Amazon River 0°05'28.1"N, 51°01'07"W, indicated by the red dot.....	36
Fig3 – Graphical representation of the factorial correspondence analysis (FCA), yellow squares: WIL, blue circles: COM, red triangles: MAR and gray stars: CLO. (b) Cluster analysis of (<i>Pterophyllum scalare</i>)	38

LISTA DE TABELAS

ARTIGO A –Development of microsatellite markers and evaluation of genetic diversity of the amazonian ornamental fish <i>Pterophyllum scalare</i>	32
Table 1 – Characterization of Locus/Genebank /Class, Repetition and motif, Size of alleles (bp), Annealing temperature (Ta°C) and Polymorphic information content of the primers used in the analysis of a population (WIL) and three stocks (COM, MAR and CLO) of <i>Pterophyllum scalare</i>	39
Table 2 – Number of alleles (Na), number of effective alleles (Ne), allelic richness (Ar), observed heterozygosity (Ho), expected heterozygosity (He), Hardy-Weinberg equilibrium (p value) (Hw), Coefficient of inbreeding (FIS) by population (WIL)/stocks (COM, MAR and CLO) by <i>locus</i>	40
Table 3 – Exclusive alleles and low-frequency alleles observed in a population (WIL) and three stocks (COM, MAR and CLO) of <i>Pterophyllum scalare</i>	41
Table 4 – Signal test for heterozygote excess/deficiency in a population (WIL) and three stocks (COM, MAR and CLO) of <i>Pterophyllum scalare</i>	42
Table 5 – Analysis of molecular variance (AMOVA) for a population (WIL) and three stocks (COM, MAR and CLO) of <i>Pterophyllum scalare</i>	42

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABINPET	Associação Brasileira de Produtos para Animais de Estimação
AMOVA	Análise de Variância Molecular
COM	<i>Pterophyllum scalare</i> , linhagem Comum
CLO	<i>Pterophyllum scalare</i> , linhagem Palhaço
F_{IS}	Índice de fixação
F_{ST}	Diferenciação genética
H_e	Heterozigosidade Esperada
H_o	Heterozigosidade Observada
H_w	Equilíbrio de Hardy-Weinberg
IAM	Infinite allele model
MAR	<i>Pterophyllum scalare</i> , linhagem Marmorato
Pb	Pares de Bases
PIC	Conteúdo de informação polimórfica
Ra	Riqueza alélica
WIL	<i>Pterophyllum scalare</i> Selvagem
SMM	Stepwise Mutation Model
TPM	Two-phase Mutation

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1	PANORAMA DA AQUICULTURA ORNAMENTAL	16
2.2	MARCADORES MOLECULARES	17
2.3	MICROSSATÉLITES	17
2.4	ANÁLISE GENÉTICA DE ESTOQUES E POPULAÇÕES DE PEIXES	18
2.5	CONSERVAÇÃO E GESTÃO DA PESCA EXTRATIVISTA.....	19
2.6	<i>PTEROPHYLLUM SCALARE</i>	20
2.6.1	Classificação	21
2.6.2	Distribuição	22
2.6.3	Reprodução.....	22
2.7	PESQUISAS COM <i>PTEROPHYLLUM SCALARE</i>	23
3	REFERÊNCIAS	24
4	HIPÓTESE	30
5.	OBJETIVOS	31
5.1	OBJETIVO GERAL.....	31
5.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	31
6	ARTIGO A - DEVELOPMENT OF MICROSATELLITE MARKERS AND EVALUATION OF GENETIC DIVERSITY OF THE AMAZONIAN ORNAMENTAL FISH <i>PTEROPHYLLUM SCALARE</i>	32
7	CONCLUSÃO	48
	ANEXOS	52
	Fig4 Delta K graph of the structure analysis on all assumed K values	53

1 INTRODUÇÃO

O estudo de espécies de peixes no Brasil tem como foco a compreensão dos aspectos populacionais, reprodutivos, biológicos e genéticos. Essas informações permitem o avanço do conhecimento da dinâmica populacional, dos mecanismos reprodutivos, da influência de fatores ambientais e genéticos e da inserção de espécies na produção em cativeiro. O conhecimento dessas informações é útil para projetos de sustentabilidade das espécies e sua conservação.

Dentro das atividades desenvolvidas nos projetos de conservação e de produção em cativeiro de peixes destaca-se a análise genética de populações. De acordo com Lopera-Barrero, (2009) a análise genética de estoques e populações naturais é necessária para visualizar a potencialidade genética das espécies, sendo utilizadas essas informações como partes dos mecanismos e ações de proteção ou cultivo em cativeiro que serão utilizadas. Nesse sentido, nos últimos anos tem se destacado a utilização de marcadores moleculares os quais permitem fornecer dados de variabilidade e estrutura genética.

Entre os marcadores moleculares mais utilizados na atualidade na análise genética de populações destacam-se os microssatélites, pois possibilitam a geração de uma grande quantidade de informações devido ao seu alto polimorfismo e a sua característica codominante (ABDUL-MUNEER, 2014). Porém, para a utilização desse marcador, são necessárias informações prévias do genoma e primers espécie-específicos, o que limita a utilização dessa técnica para aqueles indivíduos que não os possuem. Alguns estudos optam por utilizar primers descritos para uma espécie em espécies relacionadas que ainda não possuem sequências microssatélites sintetizadas, chamados de primers heterólogos (LOPERA-BARRERO et al., 2016; CASTRO et al., 2017), entretanto, mesmo com resultados promissores observados em algumas pesquisas publicadas, existem dificuldades na sua utilização relacionadas às amplificações não específicas, ao baixo número de alelos e à presença de alelos nulos. Sendo assim, se faz necessário o desenvolvimento de primers espécie-específicos para aprimorar e melhorar as análises genéticas em espécies que não os apresentam.

O acará- bandeira (*Pterophyllum scalare*) é um peixe tropical de água doce que está distribuído em diversas regiões da América do Sul, estando presente na bacia do rio Amazonas, no Peru, Colômbia, Brasil e Guianas (PEREIRA et al.,

2016). Na natureza habitam pântanos ou terrenos alagados onde a vegetação aquática e ripária é densa, que servem de abrigos contra predadores, preferem locais onde a água seja levemente ácida e apresente baixa dureza (RIBEIRO; RODRIGUES; FERNANDES, 2007)

Dentro da família dos ciclídeos o acará-bandeira é uma das mais importantes espécies ornamentais (KASIRI; FARAHI; SUDAGAR, 2011) e apresentam elevada demanda no mercado (RIBEIRO; PRETO; FERNANDES, 2009). Apesar da sua importância biológica e econômica relatada para o *P. scalare* nenhum *primer* microssatélite foi desenvolvido para pesquisas da estrutura genética dessa espécie, sendo assim necessárias pesquisas para que se viabilizem essas ferramentas genéticas.

Assim, objetivo deste trabalho é desenvolver primers espécie-específicos para *P. scalare* e através deles realizar a análise da variabilidade e estrutura genética de três linhagens dessa espécie.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 PANORAMA DA AQUICULTURA ORNAMENTAL

A criação de peixes em aquários é uma atividade já praticada a muito séculos e com grande parte do mercado pertencente ao público amador e dessa vontade do homem possuir peixes coloridos para ornamentação surgiram as primeiras pisciculturas. Os primeiros registros de técnicas de aquicultura para a criação de kinguios e as carpas koi remetem ao final do século XVI. Porém a aquariofilia se popularizou a partir do século XX, com o advento dos aquários de vidros, equipamentos específicos para a prática que diminuem o tempo gasto em manutenção e a facilidade de troca de peixes ornamentais entre os praticantes da aquariofilia (BOTELHO, 1990).

Os peixes que alimentam esse mercado são, em grande maioria, provenientes de países em desenvolvimentos nas regiões tropicais e subtropicais. Estima-se que 60% das mais de 2500 espécies presentes no mercado de peixes ornamentais sejam dulcícolas, e que este nicho seja ocupado por cerca de 30 espécies, como o Acará-Bandeira, Acará-Disco, Neon, Zebrafish entre outras (DEY, 2016). A pesca ornamental tem por características a captura de espécies de pequeno porte com formas peculiares e com cores suntuosas. (ROSSONI; FERREIRA; ZUANON, 2014)

O Brasil no período de 2014 até 2018 exportou um total de 52 milhões dólares em peixes ornamentais de água doce, sendo os cinco maiores exportadores os estados do Pará, Amazonas, Ceará, Espírito Santo e Goiás, tendo como maiores importadores os países da Ásia (Exclusive Oriente Médio) e União Europeia (MDIC - MINISTÉRIO DA INDÚSTRIA COMÉRCIO EXTERIOR E SERVIÇOS, 2018).

Segundo Chao et al. (2001) e Ribeiro et al. (2009) mesmo o Brasil sendo um grande exportador de peixes ornamentais, grande parte desse volume é fruto da pesca extrativista, sendo que uma grande parte dos animais morrem no momento da captura ou durante o transporte.

Ainda segundo Ribeiro et al. (2009) a produção em cativeiro de espécies amazônicas, como: Acará-Disco e Acará-Bandeira, neon-tetra, arraia, corredora e vários tipos de cascudos dentre eles, o Cascudo-Zebra, que se encontra

ameaçado extinção, em escala comercial no Brasil está muito aquém do sucesso de produção realizada em outros países.

Crampton (1999) identificou vários impactos no comércio de peixes ornamentais gerados pela sobrepesca nas áreas de lagos da reserva ecológica Mamirauá, Tefé - AM, como a diminuição dos estoques do acará-disco. Essa redução mostra a necessidade de um plano de manejo sustentável da pesca extrativista na reserva. A situação da sobrepesca se repete no município de Altamira- PA como Seabra-Carvalho et al. (2004) relataram, após entrevistar pescadores da região, a diminuição da abundância de peixes ornamentais, como o cascudo-zebra.

Analisando o mercado mundial, Olivier (2001) concluiu que está ocorrendo uma drástica redução dos estoques genéticos. Esta redução é acompanhada de uma possível quebra na atividade extrativista e prejuízos para a estrutura socioeconômica das regiões. Essa exploração desordenada chegava a retirar 100 milhões de espécimes de aproximadamente 400 espécies de peixes de água doce da América do Sul (INCODER; TRAFFIC; WWF, 2006).

2.2 MARCADORES MOLECULARES

Segundo Bered, Barbosa Neto, Carvalho (1997) e Faleiro (2011) os marcadores moleculares são de extrema importância para a geração de uma grande quantidade de informações genéticas como, identidade genética, diversidade, frequência gênica, relacionamentos filogenéticos, mapeamentos genético, seleção assistida, e vários outras que são importantes para os programas de conservação e melhoramento genético. Essas informações são complementares as informações ecológicas, morfológicas dos recursos genéticos afim de analisar e validar a diversidade e pureza genética; auxiliar a construção de árvores filogenéticas; assistir à seleção de genótipos com características desejadas para os programas de melhoramento genético e são as mais adequadas para o estudo de populações.

2.3 MICROSSATÉLITES

Os microssatélites, repetições de sequencias simples (SSR) de 1 a 10 nucleotídeos, são uma subcategoria de repetições em tandem (TRs). Essas regiões genômicas repetitivas são relevantes para o processo evolutivo em virtude a sua

instabilidade. Podendo sofrer mutações em taxas de 10^3 e 10^6 por geração de células, sendo assim muito maiores do que as mutações pontuais (GEMAYEL et al., 2012)

Os SSR são vistos em procariotos e eucariotos e estão profusamente disseminados em todo o genoma, principalmente na eucromática de eucariotos e no DNA nuclear e organogênico codificador e não-codificante (PÉREZ-JIMÉNEZ et al., 2013; PHUMICHAJ; PHUMICHAJ; WONGKAEW, 2015) e constituem uma classe extremamente polimórfica de marcadores (TAUTZ, 1989).

Para a obtenção dos marcadores é necessário a amplificação dos microssatélites por meio da PCR, onde se utiliza primers específicos que contenham entre 20 a 25 pb para as regiões do DNA que estão flanqueando os microssatélites (FALEIRO, 2007). O que vai demandar a construção de bibliotecas genômicas, seleção e sequenciamento dos clones positivos, análise das sequências de DNA e desenho e síntese dos primers, validação dos primers por PCR, eletroforese do produto da reação e detecção do polimorfismo entre indivíduos (MASON, 2015). Em alguns casos é possível utilizar primers desenvolvidos para espécies geneticamente relacionadas.

Os microssatélites, contraposto aos outros marcadores moleculares são mais eficientes para detectar polimorfismo em espécies ou indivíduos pertencentes a uma mesma população, além de tudo ele possuía a característica de serem codominantes, sendo assim podem apresentar os alelos dominantes e recessivos. O que é de suma relevância em análises genéticas e no estudo da evolução de populações naturais, sobretudo em espécies muito heterozigóticas (ZUCCHI; VENCOVSKY, 2002; BRONDANI et al., 2006).

Os marcadores moleculares microssatélites são um ótimo recurso e são amplamente utilizados para a construção de mapas genéticos, testes de paternidades, análise de fluxo gênico, diagnósticos de doenças, estudos populacionais e ecológicos, biologia da conservação e em investigações forense e limites taxonômicos (CHASE; KESSELI; BAWA, 1996; GOLDSTEIN; POLLOCK, 1997; FILCEK et al., 2005; RACEY et al., 2007; MCCUSKER; PATERSON; BENTZEN, 2008). Algumas pesquisas também indicam que os microssatélites são funcionais e podem afetar a regulação gênica (KASHI; KING, 2006; GEMAYEL et al., 2010; SONAY et al., 2015).

2.4 ANÁLISES GENÉTICAS DE ESTOQUES E POPULAÇÕES DE PEIXES

Tendo em vista que os microssatélites são altamente polimórficos seu uso na aquicultura apresenta grande potencial, servindo para quantificar variações genéticas dentro e entre populações de espécies (ABDUL MUNEER et al., 2009), são extremamente assertivos na diferenciação de populações geograficamente isoladas e espécies e subespécies irmãs e em teste de parentesco (ZARDOYA et al., 1996; WEBSTER; REICHART, 2005).

Vários autores relatam o uso de microssatélites para estudos de populações ou estoques de várias espécies de peixes como o *Dissostichus eleginoides* (REILLY; WARD, 1999), *Euchiloglanis* (LI; LUDWIG; PENG, 2017) e o *Brachyplatystoma platynemum* (OCHOA et al., 2015)

Dentro do cultivo de estoques de peixes não se pode negligenciar o conhecimento de sua estrutura genética, pois a formação de estoques com altas taxas de endogamia gera perdas de produtividade. Desta forma a análise genética dos estoques é uma ferramenta muito útil para os programas reprodutivos a fim de se manter a alta variação genética entre os animais (WASKO, 2005).

2.5 CONSERVAÇÃO E GESTÃO DA PESCA EXTRATIVISTA

Abdul-Muneer (2014) afirma que são importantes as informações geradas por microssatélites sobre a variação genética e estrutura de estoque de espécies de peixes com o intuito de se realizar o manejo da pesca e conservação das espécies em suas populações naturais. Segundo Frankham (2003) a diferenciação de uma espécie em populações geneticamente distintas é de suma importância para o processo de evolução e depende de forças físicas e biológicas, como barreiras geográficas, deriva genética, seleção e migração. Espécies em risco de extinção terão populações pequenas ou em declínio, apresentando assim alta taxa de endogamia e perda da diversidade genética, que por sua vez reduzirá a capacidade evolutiva da população para lidar com mudanças ambientais e também a perda de seus membros mais adaptados para sobreviver em um determinado habitat.

Como resultado da sobrepesca extrativista é possível encontrar populações com deficiência heterozigótica e desvio do equilíbrio de Hardy-Weinberg, isso somados a endogamia se tem como consequência o gargalo genético (PADHI; MANDAL, 2000).

Abdul-Muneer (2014) ainda menciona que os esforços para aumentar a diversidade genética das espécies de peixes, os programas de conservação devem seguir alguns princípios genéticos:

- i. O tamanho efetivo da população deve ser mantido o maior possível para que o número de adultos participantes da reprodução ajude a manter a variabilidade genética natural.
- ii. Os fatores que causam a redução no tamanho efetivo da população devem ser controlados o mais rápido possível.
- iii. Nenhum fluxo artificial de genes entre estoques distintos deve ser criado por meio de programas aleatórios de estocagem ou repovoamento.
- iv. Os programas de repovoamento devem também incluir meios para monitorar o impacto do programa, isso pode ser feito rastreando a população por meio de marcadores genéticos.

O autor ainda afirma que para atingir tais objetivos é de caráter prioritário proteger as populações e habitat contra o estresse antropogênico e fortalecer a população por meio de programas de repovoamento específicos sustentados por:

- i. Regulamentação das atividades humanas por meio de compreensão pública e sensibilização através da educação, ou através de formulações e implantações de leis adequadas.
- ii. Proibição da pesca durante a época de reprodução.
- iii. Avaliação de estoques de diferentes rios e imposição de cotas para manutenção do tamanho da população.
- iv. Proibir a venda de espécies subdimensionadas.
- v. Restringir a pesca apenas para peixes adultos e impedir o uso de explosivos e produtos químicos para a pesca.
- vi. Manter o nível mínimo de água dos rios e declarar certos trechos de rios como santuários.

2.6 *PTEROPHYLLUM SCALARE* (SCHULTZE, 1823)

O Acará-Bandeira bandeira (Figura 1) é um dos peixes ornamentais que mais possui potencial de criação comercial no Brasil (RIBEIRO; CARVALHO

JÚNIOR; FERNANDES, 2008 e TAKATSUKA; NAVARRO, 2019). Apresenta o corpo comprido lateralmente, semelhante-se a um triângulo por conta da sua nadadeira dorsal e anal muito alongadas, linha lateral interrompida (LIMA, 2003).

Atualmente é possível encontrar em lojas especializadas diversas linhagens de acara-bandeira, sendo as mais populares: Marmorato, Selvagem Ouro, Palhaço, Siamês e o Negro (TAKATSUKA; NAVARRO, 2019) entre outras, tendo como a maior diferença o padrão de cor e tamanho das nadadeiras.

2.6.1 Classificação

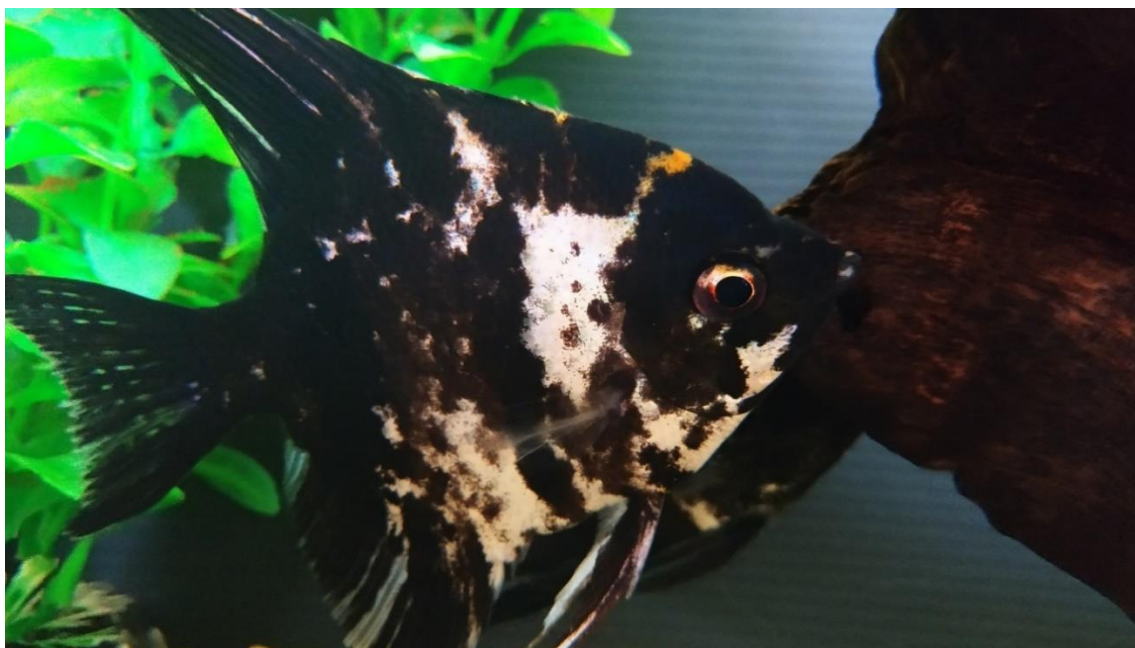
Pertence à:

- Classe: Actinopterygii;
- Ordem: Perciformes;
- Família: Cichlidae;
- Género: *Pterophyllum*.

Etimologia *Pterophyllum scalare*:

- Do greco pteron (barbatana ou vela) + phyllon (folha).
- Do latim *scalare* (em degraus).
-

Figura 1 - *Pterophyllum scalare*, linhagem Marmorato

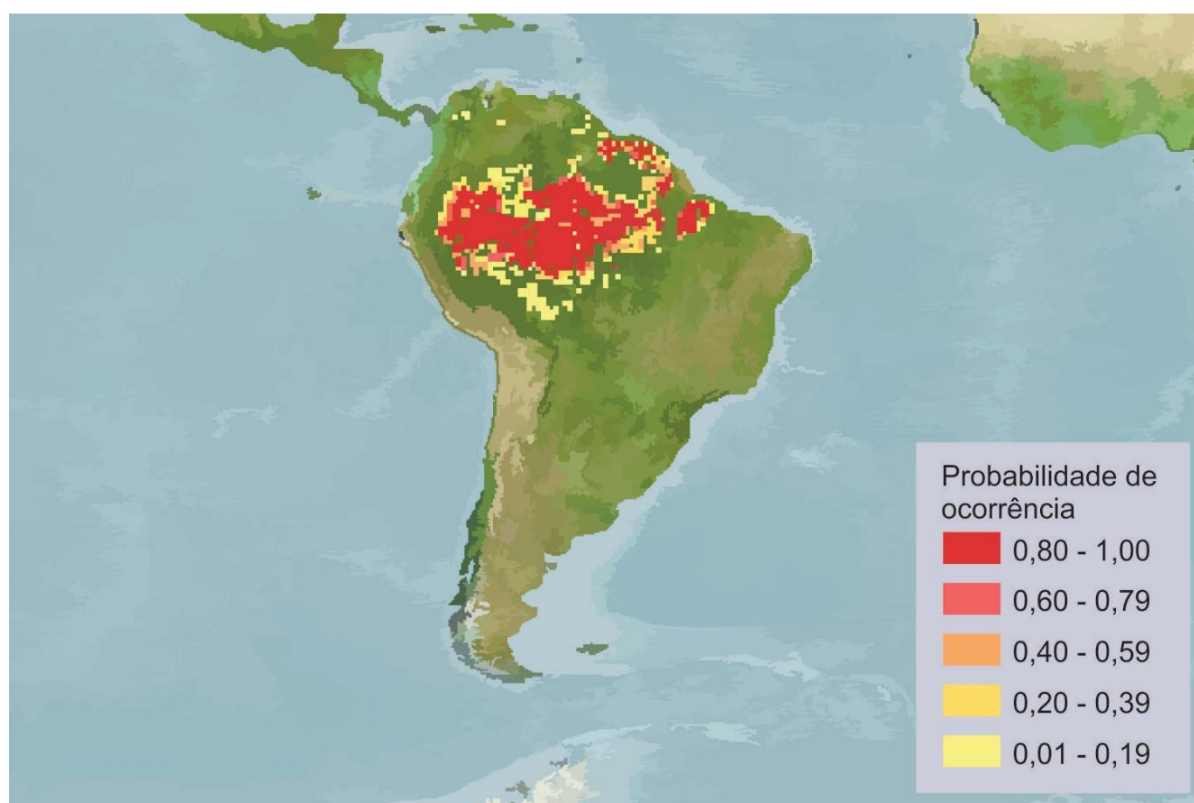


Fonte: o próprio autor

2.6.2 Distribuição

O *Pterophyllum scalare* é um peixe neotropical de água doce levemente ácidas e com baixa dureza, popularmente conhecido no Brasil com Acará-Bandeira e no exterior como Angelfish, que apresenta distribuição na América do Sul, compreendendo a bacia do rio Amazonas, no Peru, Colômbia e Brasil, ao longo dos rios Ucayali, Solimões e Amazonas, rios do Amapá, rio Oyapock na Guiana Francesa e rio Essequibo na Guiana (Figura 2) (KULLANDER et al., 2003).

Figura 2: Distribuição do *Pterophyllum scalare* na América do Sul



Fonte: Aquamaps (KASCHNER et al., 2016).

2.6.3 Reprodução

Atinge a maturidade sexual por volta de 8 meses a um ano (CACHO; YAMAMOTO; CHELLAPPA, 1999). Durante o período de reprodução o macho corteja a fêmea e formam um casal que será mantido por todo o período reprodutivo, apresentam cuidado parental e com seu parceiro (a) até a eclosão dos ovos (YAMAMOTO et al., 1999).

2.7 PESQUISAS COM *PTEROPHYLLUM SCALARE*

Atualmente muitos trabalhos com o Acará-Bandeira estão focado em aspectos nutricionais, reprodutivos e estéticos como: Fujimoto et al. (2015) estudando os aminoácidos essenciais na formulação de ração, Pai e Altaf (2016) verificando o requerimento de proteína na dieta, Langroudi et al. (2009) estudando os efeitos do uso de artêmia enriquecidas com ácidos graxos insaturados e vitamina C nos aspectos reprodutivos, Shelar et al. (2014) avaliando o efeito da substituição de alimentos vivos por alimentos formulados no desempenho reprodutivo, (Kouba et al. (2013) analisou o efeitos de dietas ricas em carotenoides afetam as cores, e Mattos et al. (2017) testou o efeito do extrato de própolis no desempenho de larvas e transporte de Acará-Bandeira. Entre vários outros autores que trabalharam o mesmo tema.

Porém poucos autores fizeram pesquisas no campo da genética utilizando o Acará-Bandeira, temos como exemplo o estudo citogenético realizado por Nascimento et al. (2006) onde constataram que a espécie possui o número cromossômico de $2n$ igual a 48 e não detectaram diferença no cariótipo entre machos e fêmeas, indicando a ausência de cromossomos sexuais mitóticos morfologicamente diferenciados.

Apenas Schneider et al. (2015) analisou a distribuição de repetições de microssatélites nos cromossomos do Acará-Bandeira, tendo encontrado cinco microssatélites, três di ((CA)₁₆, (GT)₁₃ e (GA)₁₂) e dois pentanucleotídeos ((GAATA)₈ e (GAGAA)₁₂), os autores concluem que os microssatélites estão dispersos no cromossomo com marcas notáveis nas regiões centroméricas ou teloméricas, sugerindo que as sequências contribuem para a estrutura do cromossomo e podem ter desempenhado um papel na evolução da famílias *Cichlidae*. Entretanto os autores não levantam dados sobre a estrutura genética das populações estudadas.

3 REFERÊNCIAS

ABDUL-MUNEER, P. M. Application of Microsatellite Markers in Conservation Genetics and Fisheries Management: Recent Advances in Population Structure Analysis and Conservation Strategies. **Genetics research international**, v. 2014, p. 691759, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1155/2014/691759>>. Acesso em: 10 dez. 2018.

ABDUL MUNEER, P. M. et al. Genetic variation and population structure of endemic yellow catfish, *Horabagrus brachysoma* (Bagridae) among three populations of Western Ghat region using RAPD and microsatellite markers. **Molecular Biology Reports**, v. 36, n. 7, p. 1779–1791, 2 set. 2009. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s11033-008-9381-6>>. Acesso em: 10 dez. 2018.

BERED, F.; BARBOSA NETO, J. F.; CARVALHO, F. I. F. de. Marcadores moleculares e sua aplicação no melhoramento genético de plantas. **Ciência Rural**, v. 27, n. 3, p. 513–520, ago. 1997. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-84781997000300026&lng=pt&tlng=pt>. Acesso em: 10 dez. 2018.

BOTELHO, G. **Síntese da História da Aquariorfilia**. Rio de Janeiro: Interciência, 1990.

BRONDANI, R. P. V et al. A microsatellite-based consensus linkage map for species of *Eucalyptus* and a novel set of 230 microsatellite markers for the genus. **BMC Plant Biology**, v. 6, 2006. Disponível em: <<http://www.biomedcentral.com/1471-2229/6/20>>. Acesso em: 10 dez. 2018.

CACHO, M. do S. R. .; YAMAMOTO, M. E.; CHELLAPPA, S. Comportamento reprodutivo do acará bandeira, *Pterophyllum scalare* Cuvier & Valenciennes (Osteichthyes, Cichlidae). **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 16, n. 3, p. 653–664, 1999. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0101-81751999000300006&lng=pt&tlng=pt>. Acesso em: 10 dez. 2018.

CASTRO, P. L. de et al. Cross-amplification of heterologous microsatellite markers in Piracanjuba. **Ciência Rural**, v. 47, n. 12, 30 nov. 2017. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-84782017001200402&lng=en&tlng=en>. Acesso em: 11 dez. 2018.

CHAO, N. L. (ed. . et al. **Conservation and management of ornamental fish resources of the Rio Negro Basin, Amazonia, Brazil. (Project Piaba)** Manaus (Brazil) Editora da Universidade do Amazonas, , 2001. . Disponível em: <<http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=XF2015028992>>. Acesso em: 9 dez. 2018.

CHASE, M.; KESSELI, R.; BAWA, K. Microsatellite markers for population and conservation genetics of tropical trees. **American Journal of Botany**, v. 83, n. 1, p. 51–57, 1996.

CRAMPTON, W. G. R. The impact of the ornamental fish trade on the discus *Symphysodon aequifasciatus*: A case study from the floodplain Forest of Estação

Ecológica Mamirauá. In: PADOCH, C. et al. (Ed.). **Várzea – Diversity, Development, and Conservation of Amazonia’s Whitewater Floodplains**. New York: New York Botanical Garden Press, 1999. 13p. 29–44.

DEY, V. K. The Global Trade in Ornamental Fish. **INFOFISH**, v. 4, p. 52–55, 2016. Disponível em: <http://www.unep-wcmc.org/biodiversity-series-9_116.html>.

FALEIRO, F. G. **Marcadores genético-moleculares aplicados a programas de conservação e uso de recursos genéticos**. 1ª ed. Planaltina, DF: EMBRAPA CERRADOS, 2007.

FALEIRO, F. G. Aplicações de marcadores moleculares como ferramenta auxiliar em programas de conservação, caracterização e uso de germoplasma e melhoramento genético vegetal. In: FALEIRO, F. G. (Ed.). **Biotecnologia: estado da arte e aplicações na agropecuária**. 1ª ed. Planaltina, DF: EMBRAPA CERRADOS, 2011. p. 55–120.

FILCEK, K. B. et al. Discriminating Lamprey Species Using Multilocus Microsatellite Genotypes. **North American Journal of Fisheries Management**, v. 25, n. 2, p. 502–509, 2005. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1577/M03-206.1>>.

FRANKHAM, R. Genetics and conservation biology. **Comptes rendus biologies**, v. 326 Suppl, p. S22-9, ago. 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14558445>>. Acesso em: 10 dez. 2018.

FUJIMOTO, R. Y. et al. Relação entre Aminoácidos Essenciais como Ferramenta para Formulação de Rações para Acará-Bandeira (*Pterophyllum scalare*). **Embrapa Tabuleiros Costeiros**, p. 4, 2015.

GEMAYEL, R. et al. Variable Tandem Repeats Accelerate Evolution of Coding and Regulatory Sequences. **Annual Review of Genetics**, v. 44, n. 1, p. 445–477, 3 dez. 2010. Disponível em: <<http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev-genet-072610-155046>>. Acesso em: 10 dez. 2018.

GEMAYEL, R. et al. Beyond junk-variable tandem repeats as facilitators of rapid evolution of regulatory and coding sequences. **Genes**, v. 3, n. 3, p. 461–80, 26 jul. 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24704980>>. Acesso em: 8 dez. 2018.

GOLDSTEIN, D. B.; POLLOCK, D. D. Launching Microsatellites: A Review of Mutation Processes and Methods of Phylogenetic Inference. **Journal of Heredity**, v. 88, n. 5, p. 335–342, 1997. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9378905>>. Acesso em: 10 dez. 2018.

INCODER, I. C. de D. R.; TRAFFIC, A. del S.; WWF, C. **Aspectos Socioeconômicos y de Manejo Sostenible del Comercio Internacional de Peces Ornamentales de Agua Dulce en el Norte de Sudamérica**. 1ª ed. Bogotá: TRAFFIC, América del Sur WWF, Colombia INCODER, Instituto Colombiano de Desarrollo Rural, 2006.

KASCHNER, K. J. et al. **AquaMaps: Predicted range maps for aquatic species.**, 2016. . Disponível em: <<https://www.aquamaps.org>>.

KASHI, Y.; KING, D. Simple sequence repeats as advantageous mutators in evolution. **Trends in Genetics**, v. 22, n. 5, p. 253–259, maio 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16567018>>. Acesso em: 10 dez. 2018.

KASIRI, M.; FARAHI, A.; SUDAGAR, M. Effects of supplemented diets by levamisole and Echinacea purpurea extract on growth and reproductive parameters in angelfish (*Pterophyllum scalare*). **AAFL Bioflux**, v. 4, n. 1, p. 46–51, 2011.

KOUBA, A. et al. Colour intensity in angelfish (*Pterophyllum scalare*) as influenced by dietary microalgae addition. **Journal of Applied Ichthyology**, v. 29, n. 1, p. 193–199, 2013.

KULLANDER, S. O. et al. **Check list of the freshwater fishes of South and Central America**. Porto Alegre: EDIPUCRS, 2003.

LANGROUDI, H. E. et al. Effect of diets containing artemia enriched with unsaturated fatty acids and vitamin C on angel fish *Pterophyllum scalare* propagation. n. December, p. 1–7, 2009.

LI, Y.; LUDWIG, A.; PENG, Z. Geographical differentiation of the *Euchiloglanis* fish complex (Teleostei: Siluriformes) in the Hengduan Mountain Region, China: Phylogeographic evidence of altered drainage patterns. **Ecology and Evolution**, v. 7, n. 3, p. 928–940, 2017. Disponível em: <www.ecolevol.org>. Acesso em: 10 dez. 2018.

LIMA, A. O potencial de mercado para algumas espécies de peixes ornamentais: formas alternativas de diversificação da produção na aquicultura brasileira. **Panorama da Aquicultura**, v. 13, p. 23–29, 2003.

LOPERA-BARRERO, N. M. Conservation of *Brycon orbignyanus* natural populations and stocks for their reproductive, genetic, environmental sustainability: A model for threatened species of extinction. **Ciencia e Investigación Agraria**, v. 36, n. 2, p. 191–208, 2009.

LOPERA-BARRERO, N. M. et al. Cross-amplification of heterologous microsatellite markers in *Rhamdia quelen* and *Leporinus elongatus*. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 37, n. 1, p. 517–524, 29 fev. 2016. Disponível em: <<http://www.uel.br/revistas/uel/index.php/semagrarias/article/view/22603>>. Acesso em: 11 dez. 2018.

MASON, A. S. SSR Genotyping. In: BATLEY, J. (Ed.). **Plant Genotyping Methods and Protocols**. New York: Humana Press, 2015. p. 77–89.

MATTOS, D. D. C. et al. Effect of propolis extract on angelfish larval performance and transport. Efeito do extrato de própolis no desempenho de larvas e transporte de acará bandeira. Resumo. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 38, n. 3, p. 1451–1460, 2017.

MCCUSKER, M. R.; PATERSON, I. G.; BENTZEN, P. Microsatellite markers discriminate three species of North Atlantic wolffishes (*Anarhichas* spp.). **Journal of Fish Biology**, v. 72, n. 2, p. 375–385, 1 fev. 2008. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1095-8649.2007.01701.x>>. Acesso em: 10 dez. 2018.

MDIC - MINISTÉRIO DA INDÚSTRIA COMÉRCIO EXTERIOR E SERVIÇOS. **COMEX**

STAT. Disponível em: <<http://comexstat.mdic.gov.br/pt/home>>. Acesso em: 5 dez. 2018.

NASCIMENTO, A. L. et al. Cytogenetic analysis on *Pterophyllum scalare* (Perciformes, Cichlidae) from Jari River, Pará state. **Carylogia**, v. 59, n. 2, p. 138–143, 2006. Disponível em: <<http://repositorio.inpa.gov.br/handle/123/2554>>. Acesso em: 11 dez. 2018.

OCHOA, L. E. et al. Genetic structure and historical diversification of catfish *Brachyplatystoma platynemum* (Siluriformes: Pimelodidae) in the Amazon basin with implications for its conservation. **Ecology and Evolution**, v. 5, n. 10, p. 2005–2020, 2015. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4449755/pdf/ece30005-2005.pdf>>. Acesso em: 10 dez. 2018.

OLIVIER, K. The ornamental fish market. **FAO/GLOBEFISH Research programme**, v. 67, p. 91, 2001.

PADHI, B. K. (Bhaja K.; MANDAL, R. K. (Radha K. **Applied fish genetics**. Visakhapatnam, India : Fishing Chimes, 2000.

PAI, I. K.; ALTAF, M. S. Protein requirement of angel fish *Pterophyllum scalare* (Schultze 1823) (Perciformes : Cichlidae). **Journal of Bioresources**, v. 3, n. 1, p. 30–34, 2016.

PEREIRA, S. L. et al. Diferentes estratégias alimentares na larvicultura do acará-bandeira (*Pterophyllum scalare*, Cichlidae). **ACTA AMAZONICA**, v. 46, n. 1, p. 91–98, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/1809-4392201500472>>. Acesso em: 11 dez. 2018.

PÉREZ-JIMÉNEZ, M. et al. Varietal Tracing of Virgin Olive Oils Based on Plastid DNA Variation Profiling. **PLoS ONE**, v. 8, n. 8, p. e70507, 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23950947>>. Acesso em: 8 dez. 2018.

PHUMICHAJ, C.; PHUMICHAJ, T.; WONGKAEW, A. Novel Chloroplast Microsatellite (cpSSR) Markers for Genetic Diversity Assessment of Cultivated and Wild Hevea Rubber. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 33, n. 5, p. 1486–1498, 2015.

RACEY, P. A. et al. Microsatellite DNA polymorphism confirms reproductive isolation and reveals differences in population genetic structure of cryptic pipistrelle bat species. **Biological Journal of the Linnean Society**, v. 90, n. 3, p. 539–550, 20 fev. 2007. Disponível em: <<https://academic.oup.com/biolinnean/article-lookup/doi/10.1111/j.1095-8312.2007.00746.x>>. Acesso em: 10 dez. 2018.

REILLY, A.; WARD, R. D. Microsatellite loci to determine population structure of the Patagonian toothfish *Dissostichus eleginoides*. **Molecular Ecology**, v. 8, n. 10, p. 1753–1754, out. 1999. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1046/j.1365-294x.1999.00723.x>>. Acesso em: 10 dez. 2018.

RIBEIRO, F. D. A. S.; PRETO, B. D. L.; FERNANDES, J. B. K. Sistemas de criação para o acará-bandeira (*Pterophyllum scalare*). **Acta Scientiarum. Animal Sciences**, v. 30, n. 4, p. 459–466, 2009. Disponível em:

<<http://periodicos.uem.br/ojs/index.php/ActaSciAnimSci/article/view/685>>.

RIBEIRO, F. de A. S. et al. Cadeia produtiva do peixe ornamental. **Panorama da Aquicultura**, v. 19, n. 112, p. 36–45, 2009.

RIBEIRO, F. de A. S.; CARVALHO JÚNIOR, J. R.; FERNANDES, J. B. K. Comércio brasileiro de peixes ornamentais. **Panorama da Aquicultura**, v. 6, p. 54–59, 2008.

RIBEIRO, F. de A. S.; RODRIGUES, L. A.; FERNANDES, J. B. K. Desempenho de juvenis de Acará-Bandeira (*Pterophyllum scalare*) com diferentes níveis de proteína bruta na dieta. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 33, n. 2, p. 195–203, 2007.

ROSSONI, F.; FERREIRA, E.; ZUANON, J. A pesca e o conhecimento ecológico local dos pescadores de acará-disco (*Symphysodon aequifasciatus*, Pellegrin 1904: Cichlidae) na Reserva de Desenvolvimento Sustentável Piagaçu-Purus, baixo rio Purus, Brasil. **Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi: Ciências Humanas**, v. 9, n. 1, p. 109–128, abr. 2014. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1981-81222014000100008&lng=pt&tlng=pt>. Acesso em: 5 dez. 2018.

SCHNEIDER, C. H. et al. Chromosomal distribution of microsatellite repeats in Amazon cichlids genome (Pisces, Cichlidae). **CompCytogen**, v. 9, n. 4, p. 595–605, 2015. Disponível em: <<http://zoobank.org/663D53CE-DFC1-47D1-B0D7-782AB3168A03>>. Acesso em: 11 dez. 2018.

SEABRA-CARVALHO, N. A. S. et al. Uma proposta de mudança no ensino fundamental em comunidades ribeirinhas no médio rio Xingu, Pará. In: VII CNNECIN, Belém. **Anais...** Belém: EDUFPA, 2004.

SHELAR, G. S. et al. Effect of Replacement of Live Food by Formulated Feed on Reproductive Performance of Freshwater Angelfish , *Pterophyllum scalare* (Shcultze , Effect of Replacement of Live Food by Formulated Feed on Reproductive Performance of Freshwater Angelfish , Ptero. **The Israeli Journal of Aquaculture - Bamidgeh**, p. 11, 2014.

SONAY, T. B. et al. Tandem repeat variation in human and great ape populations and its impact on gene expression divergence. **Genome Research**, v. 25, n. 11, p. 1591–1599, 1 nov. 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26290536>>. Acesso em: 10 dez. 2018.

TAUTZ, D. Hipervariability of simple sequences of a general source for polymorphic DNA markers. **Nucleic Acids Research**, v. 17, p. 6463–6471, 1989. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC318341/pdf/nar00133-0040.pdf>>. Acesso em: 10 dez. 2018.

TAKATSUKA, V.; NAVARRO, R. D. Economic And Logistical Viability of Production of Freshwater Angelfish (*Pterophyllum Scalare*). **Brazilian Journal of Aquatic Science and Technology**, v. 22, n. 1, 2019.

WASKO, A. P. A importância do monitoramento genético em estoques cultivados de matrinxã e piracanjuba. **Panorama da Aquicultura**, v. 15, n. 88, p. 47–49, 2005.

WEBSTER, M. S.; REICHART, L. Use of Microsatellites for Parentage and Kinship Analyses in Animals. **Methods in Enzymology**, v. 395, p. 222–238, 1 jan. 2005. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0076687905950143>>. Acesso em: 10 dez. 2018.

YAMAMOTO, M. E. et al. Mate guarding in an Amazonian cichlid, *Pterophyllum scalare*. **Journal of Fish Biology**, v. 55, n. 4, p. 888–891, out. 1999. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1095-8649.1999.tb00727.x>>. Acesso em: 10 dez. 2018.

ZARDOYA, R. et al. Evolutionary conservation of microsatellite flanking regions and their use in resolving the phylogeny of cichlid fishes (Pisces: Perciformes). **Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences**, v. 263, n. 1376, p. 1589–1598, 22 nov. 1996. Disponível em: <<http://rspb.royalsocietypublishing.org/lookup/doi/10.1098/rspb.1996.0233>>. Acesso em: 10 dez. 2018.

ZUCCHI, M. I.; VENCOVSKY, R. **Análise da estrutura genética de *Eugenia dysenterica* DC utilizando marcadores RAPD e ISSR**. 2002. Doutorado Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2002. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/11/11137/tde-17032003-144316/>>. Acesso em: 10 dez. 2018.

4 HIPÓTESE

Os *primers* microssatélites desenvolvidos neste estudo são ferramentas eficazes no estudo da variabilidade genética e estrutura populacional do *Pterophyllum scalare*.

5 OBJETIVOS

5.1 OBJETIVO GERAL

Construir bibliotecas enriquecidas com microssatélites para *Pterophyllum scalare*.

5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Desenvolver *primers* espécie-específicos para *Pterophyllum scalare* a partir das bibliotecas enriquecidas com microssatélites.

Obter dados de variabilidade e estrutura genética de uma população natural e três estoques comerciais.

6 ARTIGO A - NORMAS DA REVISTA HYDROBIOLOGIA

Development of microsatellite markers and evaluation of genetic diversity of the amazonian ornamental fish *Pterophyllum scalare*

ABSTRACT: The objective of the present work was to develop species-specific microsatellite *primers* for *P. scalare* and to analyze the diversity and genetic structure of a wild population, from the Amazon River, and three commercial stocks (common, marble and clown lineages), from farmers in Vieras - Minas Gerais. Through microsatellite-enriched genetic libraries, 11 microsatellite markers with adequate amplification patterns were characterized. Population genetic analysis identified eight polymorphic loci that generated 66 alleles ranging from one allele (PSCA1B3) to nine (PSCA2H1). The polymorphic information content ranged from 0.031 to 0.827. High genetic differentiation was observed between the wild population and the stocks, and moderate differentiation between the three stocks. Deviation in the Hardy-Weinberg equilibrium was observed in one *locus* in the wild population, in five *loci* in the common lineage, in two in the marble lineage and in two in the clown lineage. Bayesian analysis of genetic structure revealed the existence of two clusters, one represented by the natural population and the other by the stocks. The developed *primers* serve as a tool for the analysis of diversity and genetic structure and conservation studies of *P. scalare*.

Keywords: Genetic Conservation. Molecular Marker. Ornamental Aquaculture. Population Structure. SSR.

INTRODUCTION

According to data from the Brazilian Association of the Pet Products Industry, the population of ornamental fishes in Brazil totals 18 million individuals (ABINPET, 2018). Within the Cichlid family, the angelfish (*Pterophyllum scalare* (Lichtenstein, 1823)) is one of the most important ornamental species (Kasiri et al., 2011) and has a high demand in the market. This species is a tropical freshwater fish that is distributed in several regions of South America, being naturally present in the Amazon River basin, in Brazil, Colombia, Guyana and Peru (Pereira et al., 2016). In nature they inhabit places where the water is slightly acidic and with low hardness, and the vegetation is riparian and dense, that serve as shelter against predators, such as swamps or wetlands (Ribeiro et al., 2007). Due to its beauty and variety of colors, this species is widely sought in the national and international market, having several strains that classify them as coloring. Among the most sought lineages in aquarium stores are marble, wild/ common, golden and clown (Ribeiro et al., 2009; Takatsuka & Navarro, 2019).

Despite the biological and economic importance of this species, and the increasing human pressures caused mainly by overfishing and habitat fragmentation, no genetic studies characterizing wild populations or stocks have been conducted on the species. It is known that genetic information such as the degree of heterozygosity and structuring between populations are important for genetic maintenance of commercial stocks, restocking programs, and genetic improvement programs, since they provide guidelines for fish production with high genetic variability, a fundamental characteristic for conservation purposes, and assist in the control of inbreeding and selection of phenotypic characteristics, important in commercial production (Frankham et al., 2004; Ribeiro et al., 2016; Coimbra et al., 2017; Souza et al., 2017),

Among the molecular markers most used today in the genetic analysis of populations, microsatellites stand out, as they allow the generation of a large amount of information due to their high polymorphism and their codominant characteristic (Abdul-Muneer, 2014), being widely used in molecular ecology, conservation genetics (Allendorf & Luikart, 2007), population structure (Bowcock et al., 1994), kinship (Queller et al., 1993) and phylogeny (Zhu et al., 2000).

A study with the ornamental species clown knife fish (*Chitala chitala* (Hamilton, 1822)) showed that with the development and application of microsatellite markers for the species, it was possible to genetically characterize wild populations of clown knife fish throughout its natural distribution, showing differences in the genetic structure of populations (Dutta et al., 2019). However, for the use of this marker, prior genome information and species-specific primers are required, which limits the use of this technique to those individuals who do not have them. Some studies choose to use primers described for a species in related species that do not yet have synthesized microsatellite sequences, called heterologous primers (Lopera-Barrero et al., 2016; Castro et al., 2017), however, even with promising results observed in some published research, there are difficulties in its use, related to non-specific amplifications, the low number of alleles and the presence of null alleles. Therefore, it is necessary to develop species-specific primers to optimize and improve genetic analyzes in species that do not have them.

Thus, this work was carried out with the objective of developing species-specific primers for *P. scalare* and through them to carry out the analysis of the variability and genetic structure of three strains of this species.

MATERIAL AND METHODS

The methodologies used were approved by the Animal Use Ethics Committee of the State University of Londrina (CEUA_UEL n° 110/2018).

DNA extraction

For the extraction of genomic DNA from *P. scalare*, the protocol described by Lopera-Barrero et al. (2008) was used. Product quality from DNA extraction was verified by agarose gel electrophoresis (1%) in 1X TBE buffer, performed for one hour at 100 V and 400 mA.

Development and characterization of microsatellite primers

The microsatellite enriched library was developed using the hybridization capture method, according to the protocol described by Billotte et al. (1999), with probes (AGA)₅, (CT)₈ and (GT)₈ in the enrichment stage. The genomic DNA (5 µg) of *P. scalare* was digested with 50 U of the type II *RsaI* restriction enzyme (Promega, Madison, USA) and later the fragments were connected to the simple tape adapters (10 µM) *Rsa21* (5' - CTCTTGCTTACGCGTGGACTA - 3') and *Rsa25* (5' - TAGTCCACGCGTAAGCAAGAGCACA - 3') with T4 DNA ligase (Promega). For the occurrence of the connection, the incubation was performed at 20 °C for two hours. The fragments were selected by hybridization with biotinylated oligonucleotides, complementary to the microsatellite sequences, and then were recovered using streptavidin-coated magnetic spheres (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA). The microsatellite enriched fragments were amplified via PCR with the primers *Rsa21*, cloned into the pGEM-T Easy vector (Promega) and transformed into competent *Escherichia coli* JM109 cells (Promega). Plasmids were isolated from single colonies and the inserts were sequenced using the Big Dye Terminator sequencing kit version 3.1 (Applied Biosystems, Foster City, CA) in automatic sequencer (ABI 3500xL, Applied Biosystems) using the M13 *primer*.

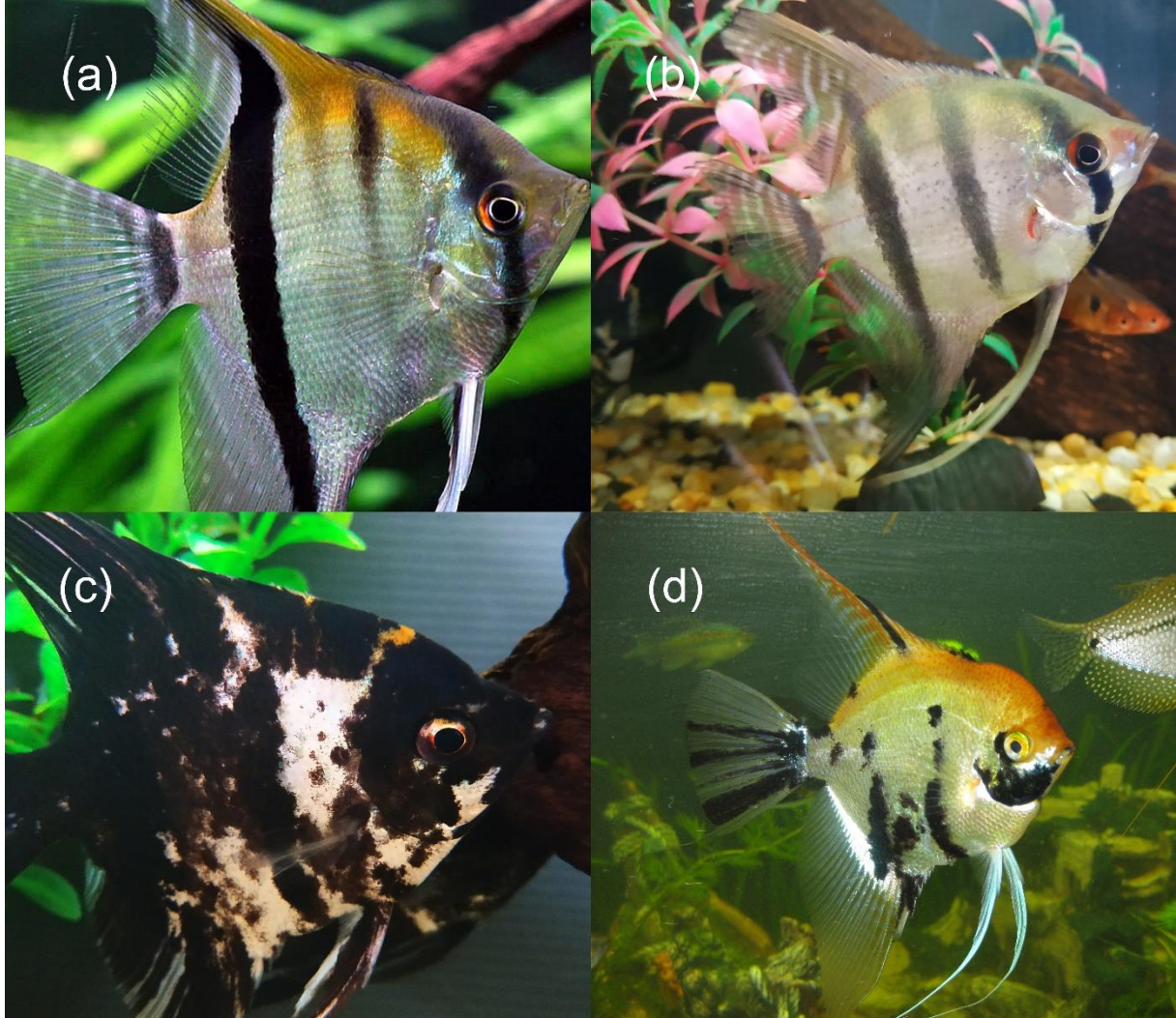
For reading and analysis of the sequences, the software MEGA version 6.0 (Tamura et al., 2013) was used. The design of primers was performed using Primer3 software version 0.4.0 (Rozen & Skaletsky, 2000). The designed primers were synthesized and tested on nine samples of *P. scalare* (three samples for each temperature tested) to standardize the best annealing temperature for each *primer*. The products were verified on 10% polyacrylamide gel (stained with silver nitrate). After the selection of the best annealing temperatures, based on the best resolution of bands in the gel and disposal of *primers* that showed nonspecificity, the population analysis was performed.

Population analysis

For the population analysis, three commercial lineages from *Pterophyllum scalare* stocks (Common angelfish - COM, Marble angelfish - MAR and Clown angelfish - CLO) and a wild population (Wild type angelfish - WIL) were used. Twenty-four specimens from each of the four groups (WIL, COM, MAR and CLO) were used (Fig1), totaling 96 individuals. The COM, MAR and CLO lineages were acquired from farmers

in the municipality of Vieiras - MG and the WIL population was acquired in a stretch of the Amazon River (0°05'28.1" N, 51°01'07" W) (Fig2) from fishermen near the city of Macapá in the state of Amapá.

Fig1 *Pterophyllum scalare* wild type (a), common lineage (b), marble lineage (c) and (d) clown lineage



Source: (a) wallpaperflare.com, (b and c) the author, (d) tropicalfishsite.com

The amplification of the fragments was performed in a final reaction volume of 15 μ L, consisting of 1X Tris-KCl buffer, 2.0 mM $MgCl_2$, 0.2 μ M of each dNTP, 0.4 μ M of each *primer* (*forward* and *reverse*), one Hot Start Taq DNA Polymerase unit (LGC Biotecnologia, Cotia, São Paulo, Brazil) and 60 ng of DNA. PCR was performed under the following conditions: four minutes of initial denaturation at 95 °C, followed by 35 cycles of 60 s of denaturation at 95 °C, 45 s of annealing (variable temperature for each *primer* in Table 1), 60 s of extension at 72 °C, and a final extension, after the 35 cycles, for fifteen minutes at 72 °C.

The PCR results were submitted to electrophoresis in an ABI 3500xL automatic sequencer using the GeneScan 47-600 Liz (Thermo Fisher Scientific) as a size standard. The alleles were visualized in the GeneMarker software version 2.6.3 (SoftGenetics LLC).

Fig2 Collection point for the WIL population in the stretch of the Amazon River 0°05'28.1"N, 51°01'07"W, indicated by the red dot



GeoEye, Earthstar Geographics | Esri, HERE, Garmin, METI/NASA, USGS

The observed (H_o) and expected (H_e) heterozygosity, Hardy-Wainberg equilibrium, Analysis of Molecular Variance (AMOVA), pairwise fixation index (F_{ST}), and allele frequencies, were calculated with the GenAlex software version 6.5 (Peakall & Smouse, 2012). As a method of differentiating F_{ST} values, the definition of Wright (1978) was used, where values between 0.00 to 0.05; 0.051 to 0.15; 0.151 to 0.25 and > 0.25 , indicate small, moderate, high and very high genetic differentiation, respectively. The allelic richness (A_r) and the inbreeding coefficient (F_{IS}) were calculated using the FSTAT software version 2.9.3.2 (Goudet, 2005). The presence of null alleles was tested with the Micro-Cheker software (Van Oosterhout et al., 2004). The genetic bottleneck was calculated using the Bottleneck 1.2.02 software (Cornuet & Luikart, 1996), using the IAM (Infinite allele model), TPM (Two-phase Mutation Model) and SMM (Stepwise Mutation Model) models. The Polymorphic Information Content (PIC) was calculated using Cervus software version 3.0.7 (Kalinowski et al., 2007) and classified according to Botstein et al. (1980), where $PIC > 0.5$, $0.5 > PIC > 0.25$ and $PIC < 0.25$, indicate that they are highly informative, reasonably informative and little informative, respectively. An analysis of the Bayesian structure was performed using the Parallel Structure software (Besnier & Glover, 2013; Pritchard et al., 2000) to verify the existence of possible clusters (K) between populations, following the mixed model of clusters with a period of burn-in of 250.000 and 1,000.000 repetitions of MCMC (Markov Chain Monte Carlo), with 20 runs for each hypothetical K value, with K ranging from one to eight ($K = 1 - 8$). The number of *clusters* was determined by the method proposed by (EVANNO; REGNAUT; GOUDET, 2005) implemented on the Structure Harvester website (Earl & Vonholdt, 2012). The factorial correspondence analysis (FCA) based on the allele frequencies was elaborated by the GENETIX software version 4.05 (Belkhir et al., 2004).

RESULTS

Among the 14 *loci* tested, 11 showed adequate amplification patterns, with eight *loci* showing polymorphism. These primers were registered in GenBank (accession numbers MT084609–MT084619). The eight *loci* produced a total of 66 alleles, which ranged from 119 bp (PSCA2A1) to 349 bp (PSCA1H2). The polymorphic information content (PIC) was highly informative for five of the eight *loci* (PSCA1F1, PSCA1H1, PSCA1H2, PSCA2A1 and PSCA2H1), reasonably informative for two of the eight *loci* (PSCA1D1 and PSCA2C1) and little informative for only one *locus* (PSCA1B3), ranging from 0.031 (PSCA1B3) to 0.827 (PSCA2H1) (Table 1). The PSCA1B3 *locus* was monomorphic for the COM and CLO lineages. No null alleles were found.

The mean number of alleles per *locus* per population/stock ranged from 4.250 (WIL), 4.625 (COM), 4.500 (MAR) and 4.625 (CLO). The *loci* that presented the highest number of effective alleles per population/stock were PSCA2H1 (6.194) for WIL, PSCA2H1 (4.484) for COM, PSCA2A1 (4.608) for MAR and PSCA2A1 (4.412) for CLO. The highest values of allelic richness were observed in the *loci* PSCA2H1 (7.541) for the WIL population, PSCA2H1 (7.456) for the COM stock, PSCA2A1 (6.299) for the MAR stock and PSCA2H1 (9.184) for the CLO stock.

The mean value for the observed heterozygosity (H_o) was smaller than expected (H_e) for COM, MAR and CLO, with mean values ranging between 0.562 (WIL), 0.376 (COM), 0.412 (MAR) and 0.523 (CLO). The deviation from Hardy-Weinberg equilibrium ($p < 0.05$) was found for one *locus* (PSCA1H1) in the WIL population, in five *loci* (PSCA1H1, PSCA1H2, PSCA2A1, PSCA2C1 and PSCA2H1) in COM, in two *loci* (PSCA1D1 and PSCA1H2) in MAR and in two *loci* (PSCA1D1 and PSCA1H2) in CLO. The p value of F_{IS} was compared with alpha 0.05 after the adjusted nominal level of 0.00156, and the result was positive and significant ($p < 0.05$) in two *loci* for COM (PSCA1H2 and PSCA2C1) and in two *loci* for MAR (PSCA1D1 and PSCA1H2), with the mean of F_{IS} being positive and significant ($p < 0.05$) for COM (0.292) and MAR (0.222).

Exclusive and low-frequency alleles (frequency < 0.100) were observed in the WIL population and in the COM, MAR and CLO stocks. The WIL population showed a greater number of exclusive alleles, with 15 alleles, while COM presented a higher number of low-frequency alleles (16 alleles) (Table 3).

The genetic bottleneck analysis showed an excess of heterozygotes ($p < 0.05$) in the COM stock in the SMM model, and CLO in the IAM model. AMOVA showed a variation of 16.012% between population/stocks, the F_{ST} being high (0.16) and significant ($p < 0.05$) (Table 5). The genetic differentiation index (F_{ST}), paired between the population and stocks, was high for the combinations WIL x COM ($F_{ST} = 0.230$), WIL x MAR ($F_{ST} = 0.235$), WIL x CLO ($F_{ST} = 0.220$), and moderate for combinations COM x MAR ($F_{ST} = 0.058$), COM x CLO ($F_{ST} = 0.089$), MAR x CLO ($F_{ST} = 0.098$). A parallel AMOVA was performed comparing the wild population with the three stocks together (WIL x COM + MAR + CLO), and demonstrated a high differentiation ($F_{ST} = 0.197$) according to the definition of Wright (1978).

The factorial correspondence analysis (FCA) demonstrated that there was no overlap between the wild population and stocks (Fig3a). On the other hand, stocks showed areas of overlap for some individuals, mainly between COM and MAR. The analysis of population structure indicated the presence of two genetic clusters, one consisting of WIL and the other composed by COM + MAR + CLO (Fig3b). Supporting information in Appendix Fig4) shows that the model $K = 2$ is the most suitable.

Fig3 Graphical representation of the factorial correspondence analysis (FCA), yellow squares: WIL, blue circles: COM, red triangles: MAR and gray stars: CLO. (b) Cluster analysis of (*Pterophyllum scalare*)

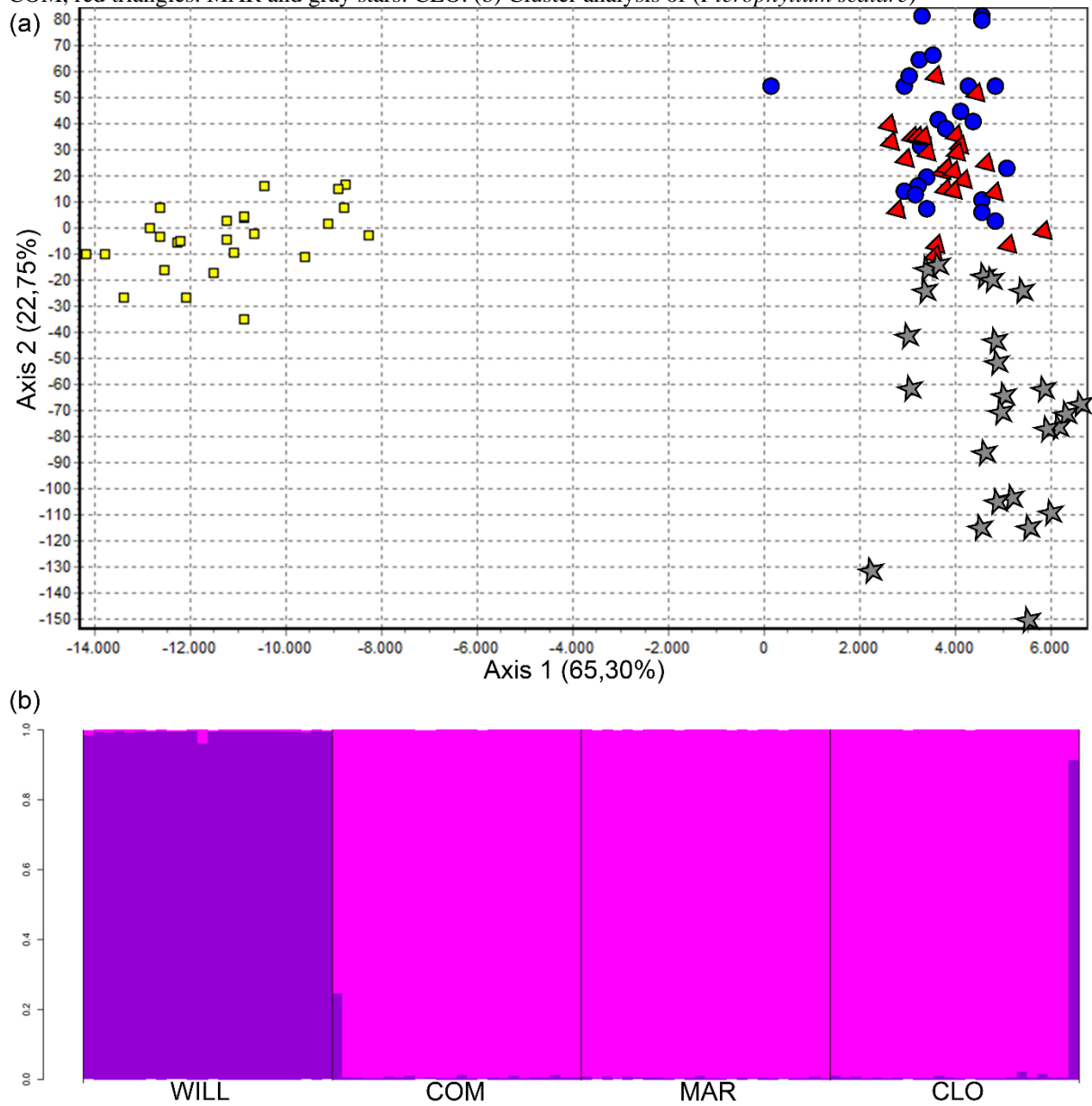


Table 1 - Characterization of *Locus*/Genebank /Class, Repetition and motif, Size of alleles (bp), Annealing temperature (Ta°C) and Polymorphic information content of the *primers* used in the analysis of a population (WIL) and three stocks (COM, MAR and CLO) of *Pterophyllum scalare*

<i>Locus Genebank Class</i>	<i>Sequence 5' – 3'</i>	<i>Rep. and motif</i>	<i>Size (pb)</i>	<i>Ta (°C)</i>	<i>PIC</i>
PSCA1B3 MT084610 Complex	F: TTCCCTCCATTACCTGCTC R: CACCTCGCTAAACTCCCC	(GT) ₂ CC(TG) ₃	254 264	59	0.031
PSCA1D1 MT084612 Complex	F: CTTGCAGTGAACGGTGGAAA R: GCCTGTGAAGAATGCTGTGC	(GT) ₄ TT(GT) ₄ GC(GT) ₆ (GGT) ₃ N(GT) ₄	313 339	62	0.420
PSCA1F1 MT084613 Complex	F: CCTGTGTTTGGCTCCAGATG R: TGACCTGTTGCATGGATCTG	(TG) ₃ TA(TG) ₁₂	187 222	62	0.667
PSCA1H1 MT084615 Di-	F: GTTCTATGTCAGCACGCACC R: TCCTTTGCAGACTCCAGTGT	(AC) ₁₇	241 273	59	0.788
PSCA1H2 MT084616 Di-	F: TTTGCAGGACCCTCAAGCT R: CACTGTGTAGGGCTAATGTGC	(GT) ₁₇	273 349	59	0.790
PSCA2A1 MT084617 Complex	F: CCCCATCTGGTCTCACTCG R: CATTTCGCTGCTTCCCTCTG	(CA) ₇ AA(CA) ₁₆ AA(CA) ₇	119 139	59	0.773
PSCA2C1 MT084618 Complex	F: AGTCTGAGCCTTGGCCAC R: CCTTTAATGTCAAACACTCGGC	(TG) ₃ N(GT) ₃ N(GT) ₈ N(GT) ₃	221 255	56	0.403
PSCA2H1 MT084619 Complex	F: GACTAAGCGAATGACACTCT R: ATTCCCTGAAAATCGCACTTG	(CA) ₆ CG(CA) ₈ CG(CA) ₁₀ N(CA) ₄ TA(CA) ₅	222 264	59	0.827

WIL: *Pterophyllum scalare* Wild population, COM: *Pterophyllum scalare* Common lineage, MAR: *Pterophyllum scalare* Marble lineage, CLO: *Pterophyllum scalare* Clown lineage.

Table 2 - Number of alleles (Na), number of effective alleles (Ne), allelic richness (Ar), observed heterozygosity (Ho), expected heterozygosity (He), Hardy-Weinberg equilibrium (p value) (Hw), Coefficient of inbreeding (F_{IS}) by population (WIL)/stocks (COM, MAR and CLO) by *locus*

WIL							
<i>Locus</i>	Na	Ne	Ra	Ho	He	Hw	F_{IS}
PSCA1B3	2	1.087	1.755	0.083	0.080	0.831	-0.022
PSCA1D1	3	1.880	2.914	0.455	0.468	0.405	0.052
PSCA1F1	3	1.358	2.514	0.304	0.264	0.864	-0.132
PSCA1H1	7	5.261	6.661	0.682	0.810	0.001*	0.181
PSCA1H2	3	1.772	2.522	0.391	0.436	0.435	0.124
PSCA2A1	6	3.388	4.883	0.958	0.705	0.071	-0.341
PSCA2C1	2	1.986	2.000	0.667	0.497	0.093	-0.324
PSCA2H1	8	6.194	7.541	0.958	0.839	0.090	-0.122
Mean	4.250	2.866	3.849	0.562	0.512		-0.076
COM							
<i>Locus</i>	Na	Ne	Ra	Ho	He	Hw	F_{IS}
PSCA1B3	1	1.000	1.000	0.000	0.000	NA	NA
PSCA1D1	3	1.317	2.531	0.273	0.241	0.908	-0.110
PSCA1F1	3	2.169	2.883	0.375	0.539	0.233	0.324
PSCA1H1	5	2.817	4.627	0.583	0.645	0.045*	0.117
PSCA1H2	5	2.617	4.366	0.286	0.618	0.000*	0.555*
PSCA2A1	7	4.069	6.230	0.696	0.754	0.038*	0.100
PSCA2C1	4	2.181	3.840	0.059	0.542	0.000*	0.897*
PSCA2H1	9	4.484	7.456	0.737	0.777	0.005*	0.079
Mean	4.625	2.582	4.117	0.376	0.514		0.292*
MAR							
<i>Locus</i>	Na	Ne	Ra	Ho	He	Hw	F_{IS}
PSCA1B3	2	1.046	1.545	0.045	0.044	0.913	0.000
PSCA1D1	5	1.297	3.383	0.125	0.229	0.003*	0.471*
PSCA1F1	4	1.923	3.255	0.417	0.480	0.715	0.153
PSCA1H1	5	3.646	4.488	0.625	0.726	0.697	0.160
PSCA1H2	6	4.034	5.488	0.211	0.752	0.000*	0.733*
PSCA2A1	7	4.608	6.299	0.917	0.783	0.247	-0.150
PSCA2C1	2	1.882	2.000	0.333	0.469	0.157	0.308
PSCA2H1	5	2.769	4.254	0.625	0.639	0.669	0.043
Mean	4.500	2.651	3.839	0.412	0.515		0.222*
CLO							
<i>Locus</i>	Na	Ne	Ra	Ho	He	Hw	F_{IS}
PSCA1B3	1	1.000	1.341	0.000	0.000	NA	NA
PSCA1D1	5	3.021	4.354	0.579	0.669	0.001*	0.161
PSCA1F1	4	2.030	5.561	0.450	0.508	0.431	0.139
PSCA1H1	6	3.746	7.625	0.833	0.733	0.539	-0.109
PSCA1H2	6	2.642	6.972	0.417	0.622	0.001*	0.368
PSCA2A1	7	4.412	6.820	0.941	0.773	0.079	-0.188
PSCA2C1	2	2.000	2.544	0.294	0.500	0.090	0.437
PSCA2H1	6	3.852	9.184	0.667	0.740	0.130	0.124
Mean	4.625	2.838	5.55	0.523	0.568		0.110

WIL: *Pterophyllum scalare* Wild population, COM: *Pterophyllum scalare* Common lineage, MAR: *Pterophyllum scalare* Marble lineage, CLO: *Pterophyllum scalare* Clown lineage.

* $p < 0.05$

Table 3 - Exclusive alleles and low-frequency alleles observed in a population (WIL) and three stocks (COM, MAR and CLO) of *Pterophyllum scalare*

	PSCA1B3	PSCA1D1	PSCA1F1	PSCA1H1	PSCA1H2	PSCA2A1	PSCA2C1	PSCA2H1
Exclusive alleles								
WIL		319 (0.250)	211 (0.130), 216 (0.848), 222 (0.022)	257 (0.091), 267 (0.068), 269 (0.273), 273 (0.045)	283 (0.696), 295 (0.283)	121 (0.063)		240 (0.125), 242 (0.271), 254 (0.146), 256 (0.063)
COM				259 (0.063)			221 (0.059), 241 (0.059)	
MAR		325 (0.021)						
CLO		339 (0.053)	189 (0.125)	241 (0.222), 251 (0.167)	273 (0.083), 323 (0.042)	125 (0.059)		
Low-frequency alleles								
WIL	254 (0.042)	323 (0.068)	222 (0.022)	257 (0.091), 267 (0.068), 273 (0.045)	285 (0.022)	121 (0.063), 127 (0.021), 135 (0.021)		246 (0.083), 256 (0.063), 260 (0.042), 222 (0.026), 244 (0.026), 250 (0.026), 258 (0.079), 260 (0.026)
COM			187 (0.063)	247 (0.042), 259 (0.063)	327 (0.095), 331 (0.024), 349 (0.048)	119 (0.022), 133 (0.043), 139 (0.087)	221 (0.059), 241 (0.059)	
MAR	254 (0.023)	323 (0.063) 325 (0.021) 335 (0.021)	193 (0.021), 195 (0.042)	255 (0.021)	331 (0.053), 349 (0.026)	119 (0.021), 129 (0.083), 135 (0.063)		248 (0.042), 264 (0.021)
CLO		339 (0.053)	193 (0.075)	249 (0.056), 255 (0.028),	273 (0.083), 323 (0.042), 325 (0.083), 327 (0.083)	123 (0.059), 125 (0.059), 127 (0.029), 129 (0.059)		246 (0.048), 250 (0.071)

WIL: *Pterophyllum scalare* Wild population, COM: *Pterophyllum scalare* Common lineage, MAR: *Pterophyllum scalare* Marble lineage, CLO: *Pterophyllum scalare* Clown lineage.

<0.100 low-frequency alleles

Table 4 - Signal test for heterozygote excess/deficiency in a population (WIL) and three stocks (COM, MAR and CLO) of *Pterophyllum scalare*

Population	N	IAM ^a		TPM ^b		SMM ^c	
		H _d /H _e	P	H _d /H _e	P	H _d /H _e	P
WIL	24	2/6	0.196	2/6	0.250	5/3	0.844
COM	24	1/6	0.109	4/3	0.938	6/1	0.039*
MAR	24	2/6	0.547	3/5	0.843	4/4	0.547
CLO	24	1/6	0.039*	2/5	0.297	5/2	0.375

N: Number of individuals per population, H_d: Loci with Heterozygote Deficiency, H_e: Loci with Heterozygotes Excess

^aInfinite Allele Model, ^bTwo-phase Mutation Model, ^cStepwise Mutation Model. WIL: *Pterophyllum scalare* Wild population, COM: *Pterophyllum scalare* Common lineage, MAR: *Pterophyllum scalare* Marble lineage, CLO: *Pterophyllum scalare* Clown lineage.

* Significant values of Wilcoxon tests (P<0.05)

Table 5 - Analysis of molecular variance (AMOVA) for a population (WIL) and three stocks (COM, MAR and CLO) of *Pterophyllum scalare*

Variation source	Degrees of freedom	Sum of squares	Variance components	Variation (%)
Between population	3	71,219	0.446	16,012*
Within populations	188	439,667	2,339	83,988
Total	191	510.886	2,785	100

WIL: *Pterophyllum scalare* Wild population, COM: *Pterophyllum scalare* Common lineage, MAR: *Pterophyllum scalare* Marble lineage, CLO: *Pterophyllum scalare* Clown lineage.

*Significant at 5% (9999 permutações), FST = 0.160

DISCUSSION

The value found for the PIC shows that seven of the eight amplified loci provide good information about the polymorphism according to the classification of (Botstein et al., 1980), with only one *locus* (PSCA1B3) being low informative, caused by the fact that this *locus* was monomorphic for COM and CLO stocks. Other authors who developed microsatellite primers for ornamental fish of the *Cichlidae* family found similar PIC values, such as for *Geophagus brasiliensis* Quoy & Gaimard, 1824 (Ferreira et al., 2013) and lower values for *Astronatus crassipinnis* Heckel, 1840 (Sousa et al., 2009). The PIC results demonstrate that seven of the eight developed *loci* are useful for generating data on population genetic diversity for *P. scalare*. In addition, the presence of null alleles, which can occur in studies with microsatellite markers in fish (Henriques et al., 2017; Souza et al., 2018), was not found in the present study, indicating good annealing of the primers in the corresponding regions of *P. scalare* DNA.

The number of alleles per *locus* and the mean values for the observed heterozygosity were similar to other studies with Amazonian cichlids, such as *Symphysodon discus* Heckel, 1840 (Amado et al., 2008) and *Astronatus crassipinnis* (Sousa et al., 2009). Together with the PIC values, the number of alleles and the heterozygosity indexes in the loci reinforce that the developed microsatellite primers can be used in genetic studies of *P. scalare*.

The mean values found for H_o were lower when compared to H_e in the stocks COM, MAR and CLO, evidencing a deficit of heterozygotes in these stocks. However, this deficit shown by the FIS index (inbreeding coefficient) was significant only in COM and MAR. The lower values of H_o compared to H_e are normally expected for captive stocks, since they are formed by a reduced number of individuals (founder effect), and the random sampling of these stocks favors the detection of high and significant FIS values (Oliveira et al., 2017). At the same time, the selection of phenotypic characteristics seeking standardization of colors, which represents the economic importance for this species, can provide for the involvement or exclusion of alleles through the mating of related individuals. As highlighted by Aguiar et al. (2018), the loss of variability may be accentuated by the lack of mating control. However, for the WIL population, a deficiency of heterozygotes should not be expected because they are individuals originating from the nature. The mean FIS for this population did not differ statistically from 0 ($p > 0.05$). However, the importance of genetic evaluation of more collection points near Macapá (AP) is highlighted, since factors such as overfishing, due to the proximity of the collection point with the metropolitan region of the city of Macapá, or due to the effects of dams along the Amazon River that are retaining sediment along the course of the river and damaging the ecosystem balance (Latrubesse et al., 2017), may contribute to the fall of these values of diversity in the future.

The Bottleneck analysis, which revealed a recent reduction in the effective size in the COM stock, by the SMM model, showing a deficiency of heterozygotes, and in CLO stock, by the IAM model, evidenced by the excess of heterozygotes (Cornuet & Luikart, 1996), together with the high presence of low frequency alleles in these stocks (16 in COM and 14 in CLO), alert to a possible loss of genetic variability in the future. Before this occurs, the introduction of new breeders (with prior genetic analysis) must be considered in order to introduce genetic diversity in stocks (Souza et al., 2017), and to avoid losses due to inbreeding depression.

Controlling genetic variability in stocks may not only be beneficial to fish farms that market these fish, but also for natural populations, since captive production is an alternative to relieve the demand for wild

specimens, decreasing the pressure of overfishing (Oliveira et al., 2017). In the present work, even with the phenotypic similarity between the wild population of *P. scalare* and the Common lineage, the use of COM in conservation programs is not recommended due to their high genetic differentiation in relation to WIL. According to Coimbra et al. (2017) and Frankham et al. (2004), the introduction of new individuals with high genetic differentiation could lead to a disturbance in the local genetic diversity and a decrease in the reproductive success of the population, reducing their ability to evolve in response to changes in the environment, factor resulting from the change in the force of natural selection, such as favoring meekness, behaviors of food capture and escape from predators, are no longer selected, together with hygiene and prophylaxis activities in captivity, which prevent the selection for resistance to parasites and diseases. Even so, genetic evaluations in fish stocks of *P. scalare* from regions of the Macapá region, could find individuals genetically similar to WIL and with high genetic variability, which would be useful for use in conservation programs. And this is very important because, for WIL, the bottleneck effect is not yet present, but it may become a future problem, as evidenced by the number of exclusive and low-frequency alleles (15 and 13 alleles respectively). According to Abdul-Muneer (2014) the actions that must be taken to increase the genetic diversity of fish species must follow some genetic principles, including, keeping the effective population size as large as possible, so that the number of adults participating in reproduction helps to maintain genetic variability. Another principle, as discussed, would be not to create an artificial flow of genes between different stocks through random programs of stocking or restocking, being that the restocking programs must be able to monitor the environmental impact of the program, what can be done by tracking populations using genetic markers like microsatellites.

The FCA demonstrated that there was no overlap in the distribution of genetic variability between the WIL population and the COM, MAR and CLO stocks, which corroborates with a high genetic differentiation ($F_{ST} = 0.160$) between them. The analysis of genetic structuring by Parallel Structure revealed two distinct genetic clusters ($K = 2$), formed by WIL and COM + MAR + CLO, being strengthened by the high number of exclusive alleles present in WIL.

This high genetic differentiation (WIL x COM, MAR and CLO, $F_{ST} = 0.197$) it occurs mainly due to the effect of the formation of stocks and the different selection forces acting on these populations (Frankham et al., 2004). Stocks are more subject to inbreeding processes due to the limited number of breeders, and the selection for color patterns can corroborate this differentiation. However, when comparing only stocks between them, a moderate F_{ST} can be observed. This can be explained by the limited gene flow between them and the search for maintaining the desirable phenotypic characteristics for each strain.

For the stocks COM and MAR, which presented positive and significant values of F_{IS} , and for CLO, some measures can be implemented to reduce the deficit of heterozygotes in these stocks. A increase in the number of animals participating in reproduction, targeting of mating, and constant genetic evaluation of the fingerlings produced, for example, can decrease this deficit and assist in the productive management of these stocks (Frankham et al., 2004; Ribeiro et al., 2016; Souza et al., 2017).

The maintenance of genetic variability in commercial stocks is important so that these animals can adapt to different environments, considering that the vast majority of these fish are intended for aquarists, where they will be exposed to a wide variety of variables related to its maintenance, such as the diversity of their aquarium fauna, type of feed available and water characteristics. On the other hand, the search for increasingly uniform patterns of color and shape can accelerate the manifestation of the deleterious effects of

inbreeding, impairing the survival of fish in these environments. Therefore, in the search for breeding stock with high economic value, inbreeding processes are often inevitable, and tools such as microsatellite markers can help control these processes.

CONCLUSION

These new developed microsatellite *primers* serve as tools for the analysis of diversity and genetic structure of *Pterophyllum scalare*, for natural populations and stocks kept in captivity, and also for genetic conservation studies. The four groups studied in this work showed high genetic differentiation, being divided into two structured groups, the first characterized by the wild population and the second by the three commercial stocks. However, these data are new and studies with samples covering the entire area of occurrence are necessary to characterize the genetic structure of *Pterophyllum scalare* in the hydrographic basins of its occurrence.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors would like to thank the 'CAPES' and the 'Programa de Pós Graduação em Ciência Animal' (State University of Londrina).

7 CONCLUSÃO

Foi possível obter o sucesso na construção de oito *locus* microssátelites polimórficos (PSCA1B3, PSCA1D1, PSCA1F1, PSCA1H1, PSCA1H2, PSCA2A1, PSCA2C1 e PSCA2H1) para *Pterophyllum scalare* que forneceram dados úteis para as análises de estrutura genética e conservação. A maior diferenciação genética foi observada entre a população selvagem e as três linhagens comerciais, resultado corroborado pela análise agrupamentos onde foi definido dois grupos estruturados, sendo eles SEL e COM + MAR + PAL. Porém para uma análise de estrutura genética mais robusta é necessário um número maior de populações selvagens e linhagens comerciais.

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 Hindawi Limited* 2014: 691759.
- ABINPET, 2018. Mercado PET Brasil 2018. Associação Brasileira da Indústria de Produtos para Animais de Estimação 1: 1–8.
- Allendorf, F. W., & G. Luikart, 2007. *Conservation and the Genetics of Populations*. Blackwell Publishing Ltd, Oxford.
- Aguiar, J. D. P., Gomes, P. F. F., Hamoy, I. G., Santos, S. E. B. D., Schneider, H., & Sampaio, I. (2018). Loss of genetic variability in the captive stocks of tambaqui, *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818), at breeding centers in Brazil, and their divergence from wild populations. *Aquaculture Research*, 49(5), 1914–1925
- Amado, M. V., T. Hrbek, W. Gravena, C. Fantin, E. N. De Assunção, S. Astolfi-Filho, & I. P. Farias, 2008. Isolation and characterization of microsatellite markers for the ornamental discus fish *Symphysodon discus* and cross-species amplification in other *Heroini* cichlid species. *Molecular Ecology Resources* 8: 1451–1453.
- Belkhir, K., P. Borsa, L. Chikhi, N. Raufaste, & F. Bonhomme, 2004. GENETIX 4.05, logiciel sous Windows TM pour la génétique des populations. Laboratoire Génome, Populations, Interactions, CNRS UMR 5000. Université de Montpellier II, Montpellier (France).
- Besnier, F., & K. A. Glover, 2013. ParallelStructure: A R Package to Distribute Parallel Runs of the Population Genetics Program STRUCTURE on Multi-Core Computers. *PLoS ONE Public Library of Science* 8: e70651.
- Billotte, N., P. J. L. Lagoda, a M. Risterucci, & F. C. Baurens, 1999. Microsatellite-enriched libraries: applied methodology for the development of SSR markers in tropical crops. *Fruits (Paris)* 54: 277–288.
- Botstein, D., R. L. White, M. Skolnick, & R. W. Davis, 1980. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *American Journal of Human Genetics* 32: 314–331.
- Bowcock, A. M., A. Ruiz-Linares, J. Tomfohrde, E. Minch, J. R. Kidd, & L. L. Cavalli-Sforza, 1994. High resolution of human evolutionary trees with polymorphic microsatellites. *Nature* 368: 455–457.
- Castro, P. L. de, R. P. Ribeiro, S. C. A. dos Santos, E. S. dos R. Goes, F. P. de Souza, A. R. Poveda-Parra, L. Vargas, A. M. Urrea-Rojas, & N. M. Lopera-Barrero, 2017. Cross-amplification of heterologous microsatellite markers in Piracanjuba. *Ciência Rural Universidade Federal de Santa Maria* 47:.
- Coimbra, M. R. M., A. P. S. Lima, K. K. C. Oliveira, & W. Severi, 2017. Microsatellite assessment of the genetic diversity in indigenous populations of curimba (*Prochilodus argenteus*) in the São Francisco river (Brazil). *Conservation Genetics Springer Netherlands* 18: 965–975.
- Cornuet, J. M., & G. Luikart, 1996. Description and Power Analysis of Two Tests for Detecting Recent Population Bottlenecks From Allele Frequency Data. *Genetics* 144: 2001–2014.
- Dutta, N., R. K. Singh, V. Mohindra, A. Pathak, R. Kumar, P. Sah, S. Mandal, G. Kaur, & K. K. Lal, 2019. Microsatellite marker set for genetic diversity assessment of primitive *Chitala chitala* (Hamilton, 1822) derived through SMRT sequencing technology. *Molecular Biology Reports Springer Netherlands* 46: 41–49
- Earl, D. A., & B. M. von Holdt, 2012. STRUCTURE HARVESTER: A website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conservation Genetics Resources* 4: 359–361.
- Evanno, G., S. Regnaut, & J. Goudet, 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: A simulation study. *Molecular Ecology* 14: 2611–2620.
- Excoffier, L., & H. E. L. Lischer, 2010. Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources* 10: 564–567.
- Ferreira, D. G., B. A. Galindo, A. N. Alves, F. S. Almeida, C. F. Ruas, & S. H. Sofia, 2013. Development and

characterization of 14 microsatellite loci in the Neotropical fish *Geophagus brasiliensis* (Perciformes, Cichlidae). *Journal of fish biology* 83: 1430–1438.

Frankham, R., J. D. Ballou, D. A. Briscoe, & K. H. McInnes, 2004. *A Primer of Conservation Genetics. A Primer of Conservation Genetics*. Cambridge University Press, Cambridge.

GOUDET, J., 2005. FSTAT: A program to estimate and test gene diversities and fixation indices (version 2.9.3.2). Lausanne: UNIL – Department of Ecology and Evolution.

Henriques, R., E. S. Nielsen, D. Durholtz, D. Japp, & S. von der Heyden, 2017. Genetic population sub-structuring of kingklip (*Genypterus capensis* – Ophidiidae), a commercially exploited demersal fish off South Africa. *Fisheries Research Elsevier B.V.* 187: 86–95.

Kalinowski, S. T., M. L. Taper, & T. C. Marshall, 2007. Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. *Molecular Ecology* 16: 1099–1106.

Kasiri, M., A. Farahi, & M. Sudagar, 2011. Effects of supplemented diets by levamisole and Echinacea purpurea extract on growth and reproductive parameters in angelfish (*Pterophyllum scalare*). *AAFL Bioflux* 4: 46–51.

Latrubesse, E. M., E. Y. Arima, T. Dunne, E. Park, V. R. Baker, F. M. D’Horta, C. Wight, F. Wittmann, J. Zuanon, P. A. Baker, C. C. Ribas, R. B. Norgaard, N. Filizola, A. Ansar, B. Flyvbjerg, & J. C. Stevaux, 2017. Damming the rivers of the Amazon basin. *Nature* 546: 363–369.

Lopera-Barrero, N. M., J. A. Povh, R. P. Ribeiro, P. C. Gomes, C. B. Jacometo, & T. da Silva Lopes, 2008. Comparación de protocolos de extracción de ADN con muestras de aleta y larva de peces: extracción modificada con cloruro de sodio. *Ciencia e investigación agraria* 35: 15–24.

Lopera-Barrero, N. M., F. Tanamati, M. Del Pilar Rodriguez-Rodriguez, J. A. Povh, A. R. Poveda-Parra, R. A. A. Otonel, P. L. De Castro, E. S. Dos Reis Goes, P. J. Furlan, & R. P. Ribeiro, 2016. Cross-amplification of heterologous microsatellite markers in *Rhamdia quelen* and *Leporinus elongatus*. *Semina: Ciências Agrárias* 37: 517–524.

Oliveira, R. C., Santos, M. D. C. F., Bernardino, G., Hrbek, T., & Farias, I. P. (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.

Peakall, R., & P. E. Smouse, 2012. GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research--an update. *Bioinformatics (Oxford, England) Oxford University Press* 28: 2537–2539.

Pereira, S. L., L. Pedro, G. Junior, R. Vieira De Azevedo, M. Darós Matielo, P. Del, C. Selvatici, I. R. Amorim, & P. P. Mendonça, 2016. Diferentes estratégias alimentares na larvicultura do acará-bandeira (*Pterophyllum scalare*, Cichlidae). *ACTA AMAZONICA* 46: 91–98.

Pritchard, J. K., M. Stephens, & P. Donnelly, 2000. Inference of Population Structure Using Multilocus Genotype Data. .

Queller, D. C., J. E. Strassmann, & C. R. Hughes, 1993. Microsatellites and kinship. *Trends in Ecology and Evolution*. , 285–288.

Ribeiro, F. D. A. S., B. D. L. Preto, & J. B. K. Fernandes, 2009. Sistemas de criação para o acará-bandeira (*Pterophyllum scalare*). *Acta Scientiarum. Animal Sciences* 30: 459–466.

Ribeiro, F. de A. S., L. A. Rodrigues, & J. B. K. Fernandes, 2007. Desempenho de juvenis de Acará-Bandeira (*Pterophyllum scalare*) com diferentes níveis de proteína bruta na dieta. *Boletim do Instituto de Pesca* 33: 195–203.

Ribeiro, R. P., M. Pilar Rodriguez-Rodriguez, E. K. Resende, F. P. Souza, J. A. Povh, A. R. Poveda-Parra, E. S. R. Goes, J. M. Galo, M. B. Junior & N. M. Lopera-Barrero, 2016. Genetic characteristics of Tambaqui broodstocks in the state of Rondônia, Brazil: implications on production and conservation. *Semina: Ciências Agrárias*, 37: 2375-2386

Rozen, S., & H. Skaletsky, 2000. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods*

in molecular biology (Clifton, N.J.) 132: 365–386.

Sousa, C. F. S., C. H. A. Santos, A. C. B. Sousa, M. N. Paula-Silva, A. P. Souza, I. P. Farias, M. S. Ferreira-Nozawa, & V. M. F. Almeida-Val, 2009. Development and characterization of microsatellite markers in *Astronotus crassipinis* (Heckel, 1840). *Conservation Genetics Resources* 1: 277–280.

Souza, F. P. de, P. L. de Castro, E. S. dos R. Goes, R. P. Ribeiro, S. C. A. dos Santos, E. C. S. de Lima, P. J. F. Murari, & N. M. Lopera-Barrero, 2017. Genetic variability of *Prochilodus lineatus* in artificial and semi-natural reproduction. *Italian Journal of Animal Science*, 17: 321–325.

Souza, F. P. de, A. M. Urrea-Rojas, C. de F. Ruas, J. A. Povh, R. P. Ribeiro, E. A. Ruas, R. M. Giacomini, B. D. Goes, P. L. de Castro, & N. M. Lopera-Barrero, 2018. Novel microsatellite markers for the endangered neotropical fish *Brycon orbignyanus* and cross-amplification in related species. *Italian Journal of Animal Science* 17: 916–920.

Takatsuka, V., & R. D. Navarro, 2019. Economic And Logistical Viability of Production of Freshwater Angelfish (*Pterophyllum Scalare*). *Brazilian Journal of Aquatic Science and Technology* 22:.

Tamura, K., G. Stecher, D. Peterson, A. Filipinski, & S. Kumar, 2013. MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* 30: 2725–2729.

VAN OOSTERHOUT, C., W. F. HUTCHINSON, D. P. M. WILLS, & P. SHIPLEY, 2004. micro-checker: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes* John Wiley & Sons, Ltd 4: 535–538.

Wright, S., 1978. *Evolution and the Genetics of Populations*. IL: University of Chicago Press, Chicago.

Zhu, Y., D. C. Queller, & J. E. Strassmann, 2000. A phylogenetic perspective on sequence evolution in microsatellite loci. *Journal of Molecular Evolution* 50: 324–338.

APPENDIX

Fig4 Delta K graph of the structure analysis on all assumed K values

