



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

ANGELA MARIA URREA ROJAS

**DESENVOLVIMENTO DE LOCUS MICROSSATÉLITES  
PARA *Brycon orbignyanus* E ANÁLISE GENÉTICA  
POPULACIONAL EM *Brycon amazonicus***

---

Londrina  
2018

ANGELA MARIA URREA ROJAS

**DESENVOLVIMENTO DE LOCUS MICROSSATÉLITES  
PARA *Brycon orbignyanus* E ANÁLISE GENÉTICA  
POPULACIONAL EM *Brycon amazonicus***

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

Orientador: Prof. Dr. Nelson Mauricio Lopera  
Barrero

Co-Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dra. Claudete de  
Fátima Ruas

Londrina  
2018

Urrea-Rojas, Angela Maria.

Desenvolvimento de locus microsatélites para *Brycon orbignyanus* e análise genética populacional em *Brycon amazonicus*/ Angela Maria

Urrea-Rojas. - Londrina, 2018.

63 f. : il.

Orientador: Nelson Mauricio Lopera-Barrero.

Co-Orientadora: Claudete De Fátima Ruas.

Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, 2018.

Inclui bibliografia.

1. Marcadores Moleculares Microsatélites - Tese. 2. Peixes Nativos do Brasil - Tese. 3. Conservação de Peixes - Tese. I. Lopera-Barrero, Nelson Mauricio. II. De Fátima Ruas, Claudete. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programade Pós-Graduação em Ciência Animal. IV. Título.

ANGELA MARIA URREA ROJAS

**DESENVOLVIMENTO DE LOCUS MICROSSATÉLITES PARA *Brycon orbignyana* E ANÁLISE GENÉTICA POPULACIONAL EM *Brycon amazonicus***

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

**BANCA EXAMINADORA**

---

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

---

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

---

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

Londrina, 22 de outubro de 2018.

**Dedico este trabalho às pessoas  
mais importantes da minha vida,  
meus pais, meus irmãos, aos  
meus amigos e ao professor  
Nelson...**

## AGRADECIMENTOS

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

Aos meus pais, Rodrigo Urrea e Martha Rojas, que em todos os momentos estiveram presentes, fazendo de minhas metas as suas e me dando a força necessária para conquistá-las. Aos meus irmãos Diego e Juan David, por serem minha fonte da energia e para quem espero dar o melhor exemplo.

Ao Prof. Dr. Nelson Mauricio Lopera Barrero pela orientação, pela confiança depositada e pela oportunidade de ser sua orientanda no mestrado. Agradeço-o também por ter me recebido em seu laboratório para a realização do estágio no ano 2016, pela compreensão e enorme paciência, pela amizade construída durante esse tempo. Obrigada por tudo!

À Profa. Dr<sup>a</sup>. Claudete de Fátima Ruas pela Co-orientação e permissão de desenvolver este trabalho no Laboratório de Marcadores Moleculares e Citogenética de Plantas -UEL.

Ao Prof. Dr. Jayme Aparecido Povh e à Prof. Dr<sup>a</sup> Ligia Uribe Gonçalves pela ajuda na obtenção das amostras.

A todos os integrantes do grupo NEPAG, Andrei, Diego, Ed, Felipe, Pâmela, Victor, pela constante ajuda e amizade em todo momento.

Aos técnicos de laboratório Lucas, Bruna e Daniela, pela ajuda fornecida durante o desenvolvimento do projeto e amizade formada

Ao meu namorado, Angel Esteban, pelo amor e pelo apoio em todos os momentos, sobretudo nos difíceis. Especialmente por sempre ficar ao meu lado quando chorei e quando sorri. Quero agradecer você, pois sempre fará parte da minha história e da minha vida.

Aos meus amigos Cristian, Carlos, David (Tortuga), Fabian, Julieth e Karol, pela amizade e companhia na distância, também ao Alejandro e ao Gersson pelo tempo de amizade e convivência em Londrina, mostrando sempre a melhor disposição; obrigada pelos momentos agradáveis que passamos juntos aqui.

Um especial reconhecimento ao Angel, à Angela e à Pâmela, por terem me ajudado na elaboração deste trabalho e na escrita em português. A todos os demais amigos, colegas e conhecidos que, de alguma forma, contribuíram para fazer a minha estadia no Brasil melhor e para a realização deste trabalho.

**Grandes realizações nascem de grandes  
sacrifícios e nunca são fruto do egoísmo**  
(Napoleón Hill)

URREA-ROJAS, Angela Maria. **Desenvolvimento de locus microssatélites para *Brycon orbignyianus* e análise genética populacional em *Brycon amazonicus***. 2018. 63 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2018.

## RESUMO

O gênero *Brycon* é um dos maiores gêneros neotropicais Characiformes, contendo 42 espécies amplamente distribuídas na América Central e do Sul. No Brasil, a distribuição do *Brycon orbignyianus* é na bacia hidrográfica do Rio Paraná e o *Brycon amazonicus* no Rio Amazonas e nos seus principais afluentes. Estas espécies têm uma importância ecológica e socioeconômica, no entanto, devido a fatores como a construção de hidroelétricas, captura de indivíduos jovens, pesca predatória e contaminação ambiental, as populações naturais vêm diminuindo. O gênero *Brycon* é o mais representado no Livro Vermelho da Fauna Ameaçada de Extinção, com seis espécies incluídas, sendo a piracanjuba (*B. orbignyianus*) uma entre elas. Para mitigar a diminuição das populações naturais, vêm sendo desenvolvidas pesquisas na área de conservação. Assim, o presente projeto teve como objetivo o desenvolvimento inédito de locus microssatélites para *B. orbignyianus* e análise da diversidade genética de uma população natural da Ilha da Marchantaria (IM) e uma subpopulação estoque de piscicultura de Nova Mutum (NM) *B. amazonicus*. Foram coletadas amostras de nadadeira caudal em *B. orbignyianus* do Rio Tietê, e 68 amostras de *B. amazonicus*: 33 de uma população natural da Ilha da Marchantaria (IM), e 35 de um estoque de piscicultura em Nova Mutum (NM). No desenvolvimento dos locus foi possível a identificação e caracterização de 12 locus microssatélites para a espécie *B. orbignyianus*, identificou-se sete loci polimórficos e 22 alelos, com uma variação de 1 a 3 alelos por locus. O conteúdo de informação polimórfica variou de 0,054 a 0,542, quatro loci apresentaram desvio significativo no Equilíbrio de Hardy-Weinberg. Dois loci apresentaram presença de alelos nulos. Testes de amplificação cruzada em duas espécies próximas revelaram que 11 loci são transferíveis para a espécie *Brycon gouldingi* e nove são transferíveis para *Brycon falcatus*. Na análise de diversidade genética de *B. amazonicus* foi observado um total de 41 alelos com tamanhos entre 187 e 318 pb, com presença de alelos exclusivos e de baixa frequência nas duas populações, com maior predominância em IM. A heterozigose observada ( $H_o$ ) foi maior nos locus Bom13 e Bh6 (IM) e Bh6 (NM) os quais não apresentaram déficit de heterozigotos, resultando em um ( $F_{is}$ ) negativo, porém, os locus Bag22, Bh5, Borg25 e Bag27 (IM) e Bom13, Bag22, Borg59, Bh5 e Bag27 (NM) evidenciaram um déficit de heterozigotos. A Análise da Variância Molecular (AMOVA) mostrou uma maior variação dentro das populações do que entre eles. A diferenciação genética foi moderada e significativa entre as duas populações. A análise Bayesiana realizada pelo programa Structure designou um valor de  $K = 2$ . Como resultado, novos locus microssatélite foram desenvolvidos para *B. orbignyianus* os quais poderão ser utilizados em estudos de variabilidade genética e estruturação populacional neles e em espécies correlacionadas. Quanto à análise da diversidade genética, devem ser adotadas algumas medidas com o fim de aumentar a variabilidade genética, como a incorporação de novos indivíduos, especialmente em NM. O constante monitoramento genético deve ser uma prioridade com o fim de direcionar medidas de controle dos acasalamentos nas pisciculturas.

**Palavras-chave:** Conservação genética. Matrinxã. Microssatélites. Piracanjuba. Variabilidade genética.



URREA-ROJAS, Angela Maria. **Development of microsatellite primers for *Brycon orbignyanus* and population genetic analysis in *Brycon amazonicus***. 2018. 63 p. Dissertation (Master's in Animal Science) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2018.

## ABSTRACT

The genus *Brycon* is one of the largest Neotropical Characiformes genera, contain 42 species widely distributed in the Central and South America. In Brazil, the *Brycon orbignyanus* is originally from the basin of the Paraná River and the *Brycon amazonicus* from the Amazon River and its main streams. These species are ecological and socioeconomic important. However, natural populations are decreasing due to factors such as hydroelectric construction, the capture of young individuals, predatory fishing, and environmental contamination. The *Brycon* is the most represented genus in the Red Book of the Endangered Wildlife with six species including the *B. orbignyanus* (Piracanjuba). Furthermore, research and development in the area of conservation are essential to mitigate the drop in natural populations. The objectives of the present work are to develop novel microsatellite primers for *B. orbignyanus* and to analyzes the genetic diversity in *B. amazonicus*. Samples of caudal fin were collected in *B. orbignyanus* of the Tietê River, and 68 samples of *B. amazonicus* were collected: 33 from a natural population of Marchantaria Island (IM), and 35 from a fish stock in Nova Mutum (NM). This study reports the development and characterization of 12 microsatellite primers of *B. orbignyanus*. Screening 12 markers from 35 samples, identifying seven polymorphic loci and 22 alleles, with one to three alleles per locus. The content of polymorphic information varied from 0.054 to 0.542, four loci showed significant deviation in the Hardy-Weinberg equilibrium. Two loci presented presence of null alleles. Cross-amplification tests on two close species revealed that 11 loci are transferable to *Brycon gouldingi* and nine are transferable to *Brycon falcatus*. In the analysis of genetic diversity of *B. amazonicus*, a total of 41 alleles with sizes between 187 and 318 bp were observed, with the presence of exclusive and low-frequency alleles in both populations, with a greater predominance in IM. The observed heterozygosity ( $H_o$ ) was higher in the Bom13 and Bh6 (IM) and Bh6 (NM) locus, which did not present heterozygous deficits, resulting in a negative ( $F_{is}$ ) locus, but the locus Bag22, Bh5, Borg25 and Bag27) and Bom13, Bag22, Borg59, Bh5 and Bag27 (NM) showed a deficit of heterozygotes. Analysis of molecular variance (AMOVA) showed greater variation within populations than among them. Genetic differentiation was moderate and significant between the two populations. The Bayesian analysis performed by Structure designated a value of  $K = 2$ . As a result, new microsatellite primers were developed for *B. orbignyanus* which could be used in studies of genetic variability and population structuring in them and in correlated species. As for the analysis of genetic diversity, some measures should be adopted in order to increase genetic variability, such as the incorporation of new individuals, especially in NM. The constant genetic monitoring should be a priority in order to direct measures of control of mating in fish farms.

**Keywords:** Genetic conservation. Genetic variability. Matrinxã. Microsatellites. Piracanjuba.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1</b> – Taxonomia da Piracanjuba ( <i>Brycon orbignyanus</i> ).....	20
<b>Figure 2</b> – Taxonomia da Matrinxã ( <i>Brycon amazonicus</i> ) .....	23
<b>Artigo B</b> – <b>Diversidade genética de uma população natural e um estoque de</b> <i>Brycon amazonicus</i> .....	45
<b>Figura 1</b> – Análise estrutural com valor de $K = 2$ .....	53

## LISTA DE TABELAS

<b>Artigo A – Novel microsatellite markers for the endangered neotropical fish <i>Brycon orbignyanus</i> and cross-amplification in related species</b> .....	33
<b>Tabela 1 – Characterization of 12 microsatellite loci genotyped</b> .....	38
<b>Tabela 2 – Cross-species amplification testing</b> .....	39
<b>Artigo B - Diversidade genética de uma população natural e um estoque de <i>Brycon amazonicus</i></b> .....	43
<b>Tabela 1 – Número (N), tamanho dos alelos (pb), e frequência dos alelos</b> .....	48
<b>Tabela 2 – Número de alelos por locus (Na), riqueza alélica (Ra), Alelos efetivos (Ae), heterozigosidade observada (Ho) e esperada (He), teste do equilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE) e coeficiente de endogamia (FIS)</b> .....	50
<b>Tabela 3 – Análise da variância molecular (AMOVA), porcentagem de variação (%V), diferenciação genética (FST), classificação de Wright (Wr)</b> .....	51

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Ae	Alelos efetivos
AMOVA	Análise de Variância Molecular
An	Alelos nulos
FAO	Food and Agriculture Organization
FIS	Índice de fixação
FST	Diferenciação genética
He	Heterozigosidade Esperada
Ho	Heterozigosidade Observada
HWE	Equilíbrio de Hardy-Weinberg
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IM	Ilha da Marchantaria
N	Número
Na	Número de Alelos
NM	Nova Mutum
Pb	Pares de Bases
PIC	Conteúdo de Informação de Polimorfismo
Ra	Riqueza alélica
TA °C	Temperatura de Anelamento

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	13
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	16
2.1 PEIXES E SUA IMPORTÂNCIA NO MUNDO .....	16
2.2 AQUICULTURA NO BRASIL.....	17
2.3 <i>Brycon orbignyana</i> (Valenciennes 1849).....	18
2.4 <i>Brycon amazonicus</i> (Spix & Agassiz, 1829).....	20
2.5 MARCADORES MOLECULARES .....	22
2.5.1 Marcadores Microsatélites (SSR) .....	23
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	24
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	31
3.1 OBJETIVO GERAL.....	31
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	31
<b>4 HIPÓTESE</b> .....	32
<b>5. ARTIGO A - (Novos marcadores microsatélites para o peixe neotropical ameaçado de extinção <i>Brycon orbignyana</i> e amplificação cruzada em espécies relacionadas)</b> .....	33
<b>6. ARTIGO B – (Diversidade genética de uma população natural e um estoque de <i>Brycon amazonicus</i>)</b> .....	43
<b>7. CONCLUSÃO</b> .....	56
<b>8. CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	57
<b>APÊNDICES</b> .....	58
<b>APÊNDICE A</b> .....	59
<b>APÊNDICE B</b> .....	60
<b>APÊNDICE C</b> .....	61
<b>APÊNDICE D</b> .....	62
<b>APÊNDICE E</b> .....	63

## 1. INTRODUÇÃO

Os peixes são os vertebrados mais diversificados do mundo. Eles exibem enorme diversidade morfológica, biológica e de habitats. Essa diversidade é, em parte, o que torna difícil a compreensão de sua história evolutiva e o estabelecimento de uma classificação (NELSON, 2006). Existem aproximadamente 54.711 espécies de peixes e, dentre essas, 7.841 novas espécies foram descritas nos últimos 20 anos; fazendo com que esse grupo de vertebrados se tornasse o maior em número de espécies descritas nas últimas décadas (ESCHMEYER; FONG, 2017).

O Brasil, localizado na Região Neotropical, abriga a ictiofauna de água doce mais rica do mundo (NOGUEIRA et al., 2010). Até o ano de 2006 foram registradas um total de 2.587 espécies de peixes de água doce. Tal número se deve às diversas características e às bacias hidrográficas tropicais e subtropicais (BUCKUP et al., 2007). Entre os gêneros neotropicais de água doce, encontra-se o *Brycon*, que compreende mais de 42 espécies amplamente distribuídas na América Central e do Sul (LIMA, 2003). No Brasil, espécies de *Brycon* foram encontradas nas bacias hidrográficas da Amazônia, Paraná, Paraguai e Araguaia-Tocantins (ANTUNES et al., 2010). Contudo, seis espécies desse gênero estão incluídas na lista do “Livro Vermelho da Fauna Ameaçada de Extinção”, entre elas a *Brycon orbignyanus* (MACHADO et al., 2008).

O desenvolvimento de pesquisas em *Brycon amazonicus* e *Brycon orbignyanus* se deve à sua importância para a pesca e a aquicultura. Essas espécies exibem importantes qualidades zootécnicas, como boa conversão alimentar, excelente qualidade da carne, boa aceitação entre os consumidores e bom rendimento da carcaça (WASKO, 2005; BINI, 2012; LOPERA-BARRERO et al., 2014). No entanto, diversos fatores afetam a dinâmica e a manutenção das populações selvagens de peixes, entre eles poluição, destruição das matas ciliares, pesca predatória e construção de barragens hidroelétricas (OLIVEIRA et al., 2015; POLAZ et al., 2017; RIBEIRO, 2016).

Nos últimos anos, estudos sobre diversidade e caracterização genética vêm se aprimorando na área da conservação (reprodução de estoques em pisciculturas, programas de repovoamento e de melhoramento genético) das espécies econômica e biologicamente importantes (LOPERA-BARRERO et al., 2016). A conservação da variabilidade genética das populações de peixes é fundamental para a manutenção de sua capacidade de adaptação e de resposta às mudanças ambientais (POVH et al., 2008).

Nos programas de repovoamentos, a validação das populações é de grande importância e necessária para a implementação de medidas de preservação das espécies. Castro et al. (2017) analisaram a variabilidade genética de espécimes (*B. orbignyana*), que pertencem ao programa de repovoamento da AES-Tietê, e observaram uma moderada diversidade genética, que pode estar relacionada ao manejo desse programa. Já Lopera-Barrero et al. (2015) avaliaram a diversidade genética em reprodutores de piapara (*Leporinus elongatus*), dourado (*Salminus brasiliensis*), jundiá (*Rhamdia quelen*) e cachara (*Pseudoplatystoma fasciatum*), utilizados em programas de repovoamento dos rios Paranapanema, Iguçu e Paraná e encontraram uma alta variabilidade genética que permitiu a reprodução dessas espécies dentro do programa de repovoamento. Ribeiro et al. (2016), por sua vez, pesquisaram a diversidade genética em estoques de tambaqui no estado de Rondônia e observaram uma alta variabilidade genética que viabilizou o uso desses estoques na produção de alevinos para pisciculturas.

Avaliando seis populações de *Prochilodus lineatus* das usinas hidroelétricas dos rios Prado, Mogi-Guaçu e Tietê, Lopera-Barrero et al. (2016) observaram uma alta variabilidade entre as populações, porém com similaridade genética entre elas, possivelmente causada pelo programa de repovoamento realizado nesses rios. Comparando a variabilidade genética nos parentais e em três gerações consecutivas de tilápia Gift (Genetically improved farmed tilapia), Rodriguez-Rodriguez et al. (2013) realizaram estudos de caracterização genética em gerações de peixes geneticamente melhorados e puderam constatar que não houve perda significativa da variabilidade genética dentro do programa de melhoramento.

Na avaliação da variabilidade genética, são utilizados marcadores moleculares altamente polimórficos, abundantes em distribuição e numerosos dentro do genoma (BOHN et al., 1999). Nesse contexto, os marcadores mais utilizados e implementados na análise genética de populações são os microssatélites, que possibilitam a geração de uma grande quantidade de informações em razão de seu alto polimorfismo e de sua característica co-dominante (MARWAL et al., 2013). Porém, para a utilização desse marcador, são necessárias informações prévias do genoma, o que limita o emprego dessa técnica em indivíduos que não possuem *primers* espécie-específicos, como é o caso do *B. orbignyana*.

Uma alternativa é a utilização de *primers* heterólogos. Entretanto, mesmo com resultados promissores em algumas pesquisas publicadas (LOPERA-BARRERO et al., 2014; ASHIKAGA et al., 2015; LOPERA-BARRERO et al., 2016; CASTRO et al., 2017), observa-se um obstáculo à sua utilização devido às dificuldades de amplificação, ao baixo

número de alelos e à presença de alelos nulos. Sendo assim, é necessário o desenvolvimento de *primers* espécie-específicos, a fim de melhorar as análises genéticas no *B. orbignyanus*.

Segundo o IBGE (2016), o *B. amazonicus* é uma das espécies mais cultivadas, com uma produção anual de 8,77 mil toneladas; logo, de grande importância para a pesca e a piscicultura (GADELHA et al., 2013). Dessa forma, a avaliação da diversidade genética em populações naturais e em estoques de *B. amazonicus* é fundamental, uma vez que permite implementar medidas de manejo dentro das pisciculturas e de conservação da espécie.

Sendo assim, o objetivo do trabalho foi desenvolver, de forma inédita, locus espécie-específicos para o *B. orbignyanus* e analisar a diversidade genética de uma população natural, na Ilha da Marchantaria (AM), e de uma subpopulação estoque, em Nova Mutum (MT), de *B. amazonicus*. Com base nos resultados e nas informações obtidas, espera-se o desenvolvimento de métodos mais eficientes para a conservação das espécies do gênero *Brycon*.



## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 PEIXES E SUA IMPORTÂNCIA NO MUNDO

Dentro do reino animalia, os vertebrados são os mais abundantes e diversificados do mundo, exibindo enorme variação biológica, morfológica e de habitats. Essa diversidade é o que, em parte, torna difícil a compreensão de sua história evolutiva e o estabelecimento de uma classificação. Aproximadamente 54.711 espécies de vertebrados estão descritas. Destes, 27.977 são espécies de peixes, divididas em 515 famílias e 4.494 gêneros, dos quais 11.952 são espécies de peixes de água doce (NELSON, 2006).

Para melhor compreensão e classificação da enorme biodiversidade, o mundo se divide em regiões zoogeográficas, a Neoártica, a Neotropical, a Paleártica, a Africana ou Etiópica, a Oriental e a Australiana, que são definidas e delimitadas pela fauna e suas características. A região mais diversificada e rica em espécies é, sem dúvida, a Neotropical, que se estende desde o Deserto de Sonora até a América do Sul (HOLT et al., 2013), representando 10% da diversidade faunística do mundo (REIS, 2013). Nela, há uma ictiofauna de peixes de água doce de 4.475 espécies, das quais 1.550 ainda precisam ser descritas (REIS, 2013).

Os peixes são os animais aquáticos com maior contribuição nos ecossistemas e representam uma função importante nos ciclos alimentares dentro dos habitats, armazenando, ministrando e transportando uma grande quantidade de nutrientes. A perda da biodiversidade deve-se a causas naturais e antropogênicas, que podem alterar a cadeia trófica quanto a disposição de nutrientes nos mares e em águas internas (ALLGEIER et al., 2013; MATTOCKS et al., 2017).

Devido à importância dos peixes para os ecossistemas, a produção de alimentos aquáticos deixou de ser baseada na captura de peixes em ambientes naturais para promover a criação de espécies cultivadas. Segundo a FAO (2018), a produção mundial de pescado chegou a 171 milhões toneladas no 2016, das quais 47% pertence à aquicultura; a qual representa uma importante fonte de alimentação e de sustentação econômica à população humana. Ainda, a carne de pescado é um componente importante na dieta, oferecendo 20% da proteína animal a 3,1 bilhões de habitantes e sendo a única fonte dietética direta de ômega e ácido docosaenoico (TACON; METIAN, 2018). Socialmente, estima-se que 59,6 milhões de pessoas estão empregadas no setor primário da pesca de captura e da aquicultura. No que

se refere à economia, o valor total da venda da produção pesqueira e aquícola foi estimado em US \$ 362 bilhões; dos quais US \$ 232 bilhões vieram da produção aquícola (FAO, 2018).

## 2.2 AQUICULTURA NO BRASIL

Localizado na região Neotropical, o Brasil é o quinto maior país do mundo (com aproximadamente 8.515.770 km<sup>2</sup>), apresentando uma topografia diversificada, que inclui morros, montanhas, planícies, planaltos e cerrados, e uma variação dos climas tropicais e subtropicais. A grande extensão do território brasileiro e sua diversidade de ecossistemas e climas renderam ao país o título de megadiverso; no qual se observam seis importantes biomas com características distintas: Amazônia, Caatinga, Cerrado, Mata Atlântica, Pampa e Pantanal (BRAZIL, 1999).

No Brasil, encontra-se o maior sistema fluvial do mundo. Com 55.457 km<sup>2</sup>, ele é formado por oito grandes bacias hidrográficas, que representam o 12% da água doce do planeta. Os rios mais importantes desse sistema são o Amazonas (6.437 km), o Paraná (4.700), o Madeira (4.000 km) e o Purus (3.200 km).

No que se refere à aquicultura brasileira, ela pode ser dividida em seis setores: peixes de água doce, camarão marinho, moluscos, ostras, camarão gigante de água doce e rãs (ROUBACH et al., 2003); com foco, sobretudo, na produção de peixes de água doce. No Brasil, a atividade está entre as produções agrárias com maior crescimento nos últimos anos, passando de 578.8 mil toneladas em 2014 a 691.7 mil toneladas em 2017 (BAPTISTA et al., 2018).

Dentro das espécies nativas mais cultivadas no país, encontra-se o Tambaqui e seus híbridos (137 mil toneladas); a Carpa (20 mil toneladas); o Pintado e seus híbridos (15 mil toneladas); o Pacu (13 mil toneladas); e o Matrinxã (8 mil toneladas) (IBGE, 2016). Os maiores produtores de peixes nativos são os estado de Rondônia (77 mil toneladas), Mato Grosso (60 mil toneladas) e Amazonas (28 mil toneladas) (BAPTISTA et al., 2018).

## 2.3 *BRYCON ORBIGNYANUS* (VALENCIENNES 1849)

Piracanjuba - *Brycon orbignyanus* (Valenciennes, 1849), conhecido também no Brasil como Bracanjuba ou Piracanjuba (OLIVEIRA et al., 2017), é uma espécie de água doce neotropical com ampla distribuição geográfica, encontrado principalmente na bacia do rio da Prata e no sudeste da América do Sul (ASHIKAGA et al., 2015; CARMO et al., 2015).

O peixe conta com presença de escamas, ele é um peixe de porte médio a grande, alongado e lateralmente comprimido, com boca terminal e dentes cônicos, dorso castanho escuro clareando no sentido do ventre, cauda com mancha negra que se estende do pedúnculo caudal até os raios medianos da nadadeira caudal e nadadeiras, anal e ventrais avermelhadas (Figura 1) (SHIBATTA et al., 2006; CASTRO, 2015).

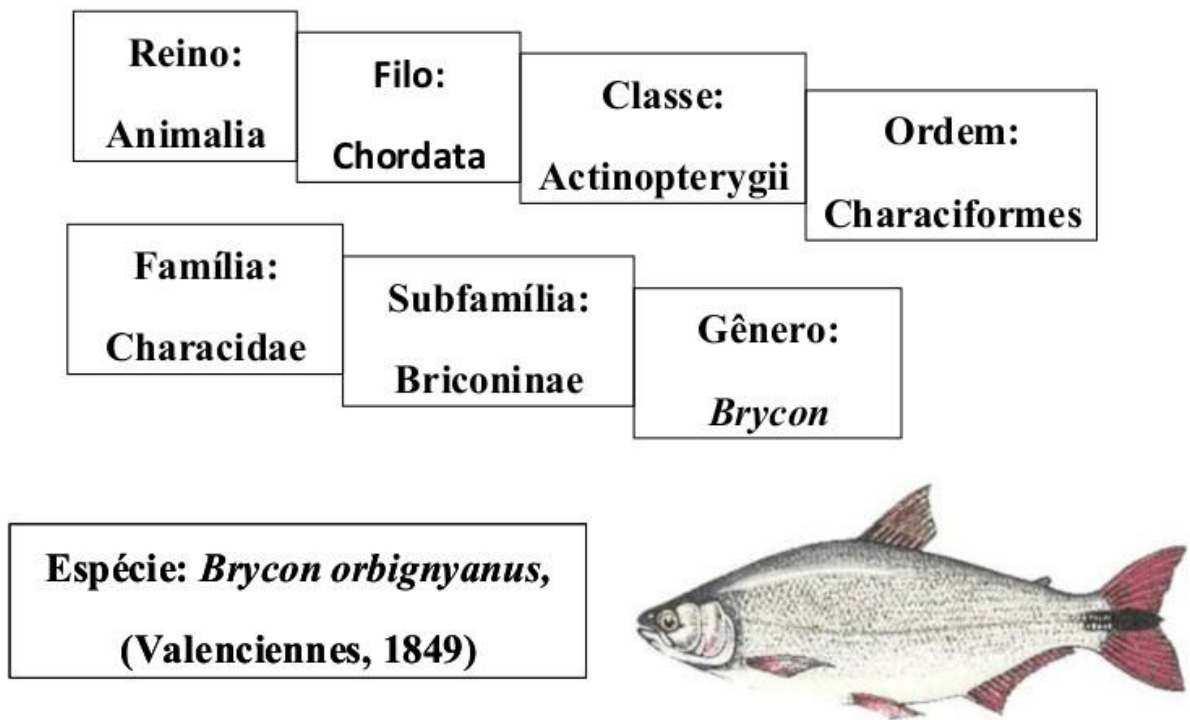


Figura 1. Taxonomia da Piracanjuba (*Brycon orbignyanus*)

Fonte: Próprio autor

Piracanjuba é um peixe presente em diversos estados brasileiros, como Mato Grosso do Sul, São Paulo, Minas Gerais, Paraná e Goiás (LÓPEZ et al., 2009). Habita águas claras, canais de rios, em áreas próximas às margens, em locais de corredeiras e, principalmente, em locais onde as árvores estão presentes na beira do rio. Em ambientes lóticos, onde se alimenta de insetos, frutas e sementes, a Piracanjuba realiza migração reprodutiva entre setembro e outubro, preferencialmente em trechos com fluxo contínuo de água, caracterizando-se como uma espécie reofílica (SHIBATTA et al., 2006; CASTRO, 2015).

Em ambiente natural, os machos, geralmente, estão prontos para realizar a fecundação aos dois anos, quando atingem aproximadamente 20 centímetros de comprimento; as fêmeas, por sua vez, atingem a maturidade sexual mais tarde, por volta dos três anos de idade e com 25 centímetros de comprimento. A desova é completa com o esvaziamento total gonadal e o

processo de fertilização é externo sem cuidado parental; os ovos apresentam aparência semidensa e as larvas têm hábitos carnívoros inicialmente (OLIVEIRA et al., 2017).

Graças aos bons índices zootécnicos e ao alto valor comercial, devido às características na qualidade da carne: apresenta pigmentação avermelhada no filé, alto rendimento na carcaça e bom gosto na carne, a Piracanjuba é uma das espécies nativas no Brasil com grande interesse econômico. Ainda, é famoso na pesca esportiva por sua voracidade na hora da pesca (FELIZARDO et al., 2010; ASHIKAGA et al., 2015; CASTRO, 2015).

Diferentes estudos vêm sendo realizados para o aprimoramento das tecnologias de cultivo da Piracanjuba em cativeiro, principalmente no que concerne à alimentação e nutrição (BORBA et al., 2006; SGNAULIN et al., 2018), e à fisiologia (NOGUEIRA et al., 2014). Uma das grandes áreas pesquisadas é a reprodução induzida e artificial, que permite a produção de alevinos com a menor quantidade de dose inseminante. Além disso, os alevinos apresentam valor elevado dentro das pisciculturas, em razão da dificuldade de reprodução (FELIZARDO et al., 2010; OLIVEIRA et al., 2015; VIVEIROS et al., 2015; CHIACCHIO et al., 2017).

Recentemente, a Piracanjuba foi catalogado como espécie em risco de extinção (MACHADO et al., 2008) em razão da diminuição e do desaparecimento das populações em seus locais naturais, causados por fatores antrópicos como desmatamento, introdução de espécies exóticas, pesca excessiva e construção de barragens, que impede a migração natural dos peixes; direcionando, assim, as pesquisas à área de conservação.

Para auxiliar nas pesquisas de conservação, tem-se utilizado ferramentas como os marcadores moleculares. Panarari-Antunes et al. (2011) compararam espécimes cultivadas e naturais, mediante RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*). Ashikaga et al. (2015) desenvolveram um estudo com microssatélites com fins conservacionista das espécies selvagens. Carmo et al. (2015) mostraram a importância do desenvolvimento de *primers* espécie-específicos para garantir uma amplificação satisfatória. Nesse estudo, foram testados trinta e um *primers* heterólogos dos quais só quatro foram informativos. Lopera-Barrero et al., (2014) estudaram a paternidade em progênies de diferentes sistemas reprodutivos por meio de marcadores microssatélites, resumindo a dificuldade na utilização dos *loci* heterólogos.

#### 2.4 *BRYCON AMAZONICUS* (SPIX & AGASSIZ, 1829)

A espécie *Brycon amazonicus* é conhecida como Matrinxã, Jatuarana ou Yamú; é um peixe neotropical presente nos rios lóticos, amplamente distribuída na bacia Amazônica, mas pode ser encontrada no Rio Orinoco e no Rio Essequibo na Guiana. Considerado “salmão da Amazônia”, o Matrinxã vive em diversos habitats e realiza várias migrações ao longo de sua vida. A espécie se caracteriza por ter corpo alongado, alcança cerca de 40 cm, tem a boca pequena, dentes multicuspidados em 3 a 4 fileiras no maxilar superior e duas fileiras no maxilar inferior, e os olhos bem desenvolvidos. Sua coloração é cinza-amarelado, mais claro no ventre, apresenta escamas com bordas escuras formando linhas contínuas sinuosas. De forma geral, o corpo apresenta uma pigmentação ligeiramente mais escura na parte dorsal, que se inicia na cabeça e tinge o lado superior do pedúnculo caudal, as nadadeiras têm pigmentações pretas (Figura 2) (BALDISSEROTTO et al., 2005; REIS et al., 2009; BINI, 2012; DORIA; LIMA, 2015; RISSOLI et al., 2017).

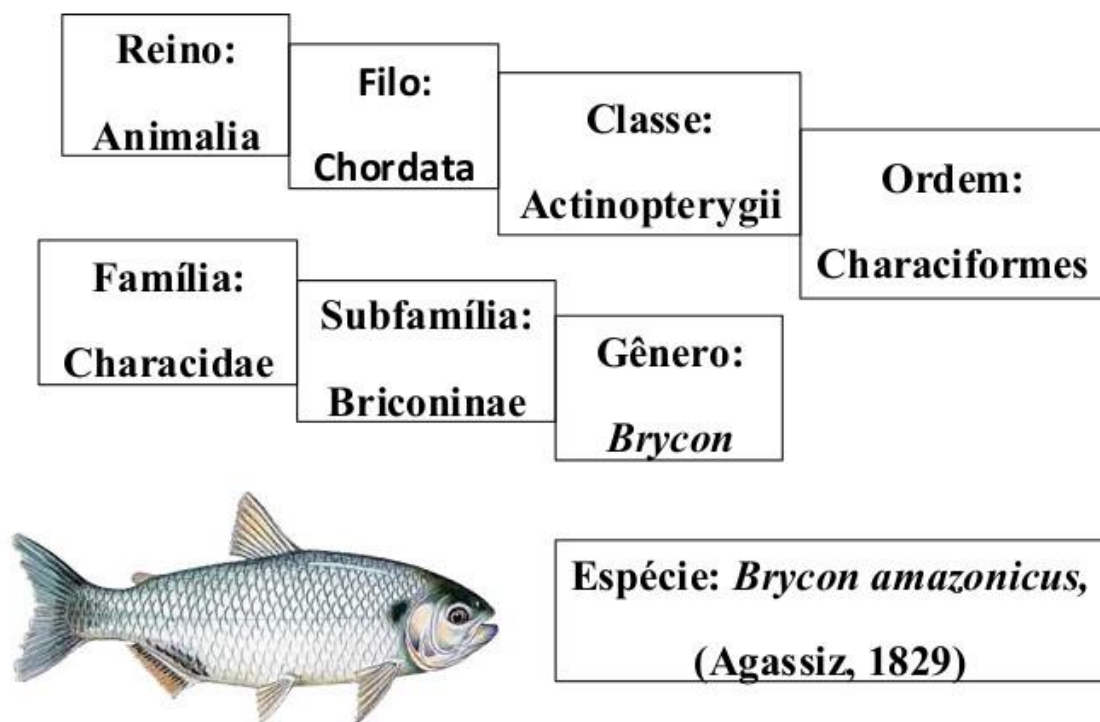


Figura 2. Taxonomia do Matrinxã (*Brycon amazonicus*)

Fonte: Próprio autor

Matrinxã é um peixe migrador de desova total, que faz migração no início da enchente saindo dos lagos e igarapés, formando imensos cardumes e migrando até o sitio da desova. O período de desova na natureza é restrito aos meses de fevereiro a maio, quando sobe os rios na Região Amazônica. Após a desova, Matrinxã se dirige para as

florestas inundadas para se alimentar, onde permanece de 4 até 6 meses. Seu hábito alimentar é onívoro, alimentando-se de sementes, flores, frutos, restos vegetais, insetos, restos de peixes. A maturação sexual ocorre com aproximadamente três anos de idade (BALDISSEROTTO et al., 2005; SANTOS et al., 2006).

A espécie *Brycon amazonicus* é um recurso pesqueiro extremamente importante na região amazônica, sendo considerada uma das promissoras para a aquicultura no Brasil (MONTROYA et al., 2017). Ela apresenta alto valor comercial, boa aceitação do consumidor e grande potencial para criação em cativeiro, com rápido crescimento, boa conversão alimentar e bom gosto na carne; além de alcançar bons preços de mercado. A espécie está se tornando cada vez mais popular devido às suas características na pesca esportiva (briguenta) (REIS; LIMA, 2009; SANTOS et al., 2009; CLIMACO, 2012).

Ainda, Matrinxã desperta um grande interesse nos pesquisadores por seu temperamento ativo reativo, sendo de predileção nos estudos de estresse fisiológico durante e após a captura na natureza (HOSHIBA et al., 2009; MONTROYA et al., 2017). Nas pisciculturas, vêm sendo desenvolvidas pesquisas na fisiologia e no comportamento durante o transporte (CARNEIRO; URBINATI, 2001; ABREU; URBINATI, 2006; BENDHACK; URBINATI, 2009). A reprodução induzida dessa espécie é outra das grandes áreas de interesse, pois possibilita e auxilia na criação em cativeiro.

É estudada na reprodução assistida (SILVA et al., 2017), na criopreservação do sêmen (VELASCO-SANTAMARÍA et al., 2006) e na qualidade espermática (CRUZ-CASALLAS et al., 2007). 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 pelo desaparecimento dos *Brycon* (BALDISSEROTTO, 2002).

A conservação das espécies, mediante avaliação da diversidade genética dos estoques naturais e cultivados, tem como objetivo manter a maior quantidade de peixes diversificado geneticamente. Nos últimos anos, diferentes técnicas que empregam análises de DNA encontram-se disponíveis para acessar a diversidade genética de espécies de peixes e vêm sendo empregadas em estudos na aquicultura (WASKO, 2005).

## 2.5 MARCADORES MOLECULARES

As técnicas moleculares permitem a detecção de variações ou polimorfismos que existem entre indivíduos em regiões específicas de DNA (MARWAL;

SAHU; GAUR, 2013). Esses polimorfismos podem ser usados para a construção de mapas genéticos avaliando as diferenças na expressão de características particulares em uma família que possam indicar um efeito direto na genética (TURCHETTO-ZOLET et al., 2017). A função comum dos marcadores moleculares é expor a variabilidade do genoma (PASSARI et al., 2018).

Segundo Marwal et al. (2013), existem, principalmente, dois tipos de marcadores moleculares. Em primeiro lugar, os marcadores que representam as sequências conservadas evolutivas de codificação como, por exemplo, RFLPs (do inglês *Restriction Fragment Length Polymorphism*) e SSLPs (do inglês *Simple Sequence Length Polymorphisms*), úteis em estratégias de mapeamento comparativos, onde o polimorfismo não é um pré-requisito essencial. No entanto, esses são, sobretudo, locus únicos e dialélicos e, portanto, não são úteis para a análise de ligação. O segundo grupo de marcadores, como os marcadores de microssatélites, tem maior conteúdo de informação de polimorfismo do que os RFLPs convencionais e podem ser gerados com muita facilidade e rapidez.

Na década de 1990, diversos marcadores moleculares foram utilizados em estudos genéticos populacionais. A variação genética entre indivíduos é um requisito em todas as aplicações de marcadores genéticos na biologia, e seu uso mais comum é para determinar se os indivíduos de populações naturais ou estoques são geneticamente diferenciados uns dos outros (PIORSKI et al., 2008). Também são utilizados na caracterização de diferentes espécies no caso de disputas taxonômicas.

Os marcadores de DNA polimórficos podem fornecer aos pesquisadores novos conhecimentos sobre o comportamento, ecologia e estrutura genética das populações (ABDUL-MUNEER, 2014). Eles têm sido exitosos no monitoramento genético em peixes, no direcionamento dos cruzamentos, na identificação da diversidade e estrutura genética, promovendo a conservação da biodiversidade, melhorando a taxa de crescimento, a resistência à doença e tolerância ao frio (HAHN VON HESSBERG et al., 2015).

Polimorfismos de nucleotídeo único SNPs (*Single Nucleotide Polymorphisms*, siglas em inglês) e SSRs (*Simple Sequence Repeats*, siglas em inglês) são os marcadores de DNA mais comuns para estudos genéticos (ELTAHER et al., 2018). No entanto, os microssatélites são um dos melhores marcadores genéticos nas análises da estrutura das populações (ABDUL-MUNEER, 2014).

### 2.5.1 Marcadores Microsatélites (SSR)

Os microsatélites são sequências curtas de um a seis pares de bases (pb), repetidas em *tandem*. SSR tem sido identificado tanto em procariotos como eucariotos, sendo denominados também (*STRs – Short Tandem Repeats*) (TURCHETTO-ZOLET et al., 2017). Alelos em microsatélites podem ser amplificados pela reação em cadeia da polimerase, a partir de pequenas amostras de DNA genômico. Os alelos podem ser separados por eletroforese, sendo possível observar uma ou duas bandas. Estas podem ser usadas para quantificar variações genéticas dentro e entre populações de espécies de peixes (ABDUL-MUNEER, 2014). Sendo encontrados em regiões codificantes e não codificantes, possuem características co-dominantes, com altos níveis de polimorfismos sendo encontrados em relativa abundância no genoma (FALEIRO, 2007; CASTRO, 2015).

Os SSR são amplamente utilizados na análise da variabilidade genética, em diferentes espécies de peixes com resultados satisfatórios. Barroso et al. (2005) analisaram a estrutura genética em *Brycon cephalus*; Aho et al. (2006) realizaram estudos em trutas (marrons) *Salmo trutta L*; Aguiar et al. (2013) e Santos et al. (2016) os implementaram no *Colossoma macropomum*; Prado et al. (2018) realizaram um estudo no *Pseudoplatystoma corruscans*. Os estudos de variabilidade genética são primordiais na conservação das espécies, pois permitem a implementação de estratégias conservacionistas na pesca e aquicultura (SANTOS et al., 2009; ABDUL-MUNEER, 2014). A conservação da variabilidade genética das populações de peixes é fundamental para manutenção da sua habilidade de adaptação e resposta às mudanças ambientais (POVH et al., 2008).

## 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. 1–11, 2014.
- ABREU, J. S. De; URBINATI, E. C. Physiological responses of matrinxã (*Brycon amazonicus*) fed different levels of vitamin C and submitted to air exposure. **Acta Amazonica**, v. 36, n. 4, p. 519–524, 2006.
- AGUIAR, J.; SCHNEIDER, H.; GOMES, F.; CARNEIRO, J.; SANTOS, S.; RODRIGUES, L. R.; SAMPAIO, I. Genetic variation in native and farmed populations of Tambaqui (*Colossoma macropomum*) in the Brazilian Amazon: regional discrepancies in farming systems. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 85, n. 4, p. 1439–1447, 2013.



AHO, T.; RÖNN, J.; PIIRONEN, J.; BJÖRKLUND, M. Impacts of effective population size on genetic diversity in hatchery reared Brown trout (*Salmo trutta* L.) populations. **Aquaculture**, v. 253, n. 1–4, p. 244–248, 2006.

ALLGEIER, J. E.; YEAGER, L. A.; LAYMAN, C. A. Consumers regulate nutrient limitation regimes and primary production in seagrass ecosystems. **Ecology**, v. 94, n. 2, p. 521–529, 2013.

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. 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.

ASHIKAGA, F. Y.; ORSI, M. L.; OLIVEIRA, C.; SENHORINI, J. A.; FORESTI, F. The endangered species *Brycon orbignyanus*: genetic analysis and definition of priority areas for conservation. **Environmental Biology of Fishes**, v. 98, n. 7, p. 1845–1855, 2015.

BALDISSEROTTO, B. **Fisiologia de peixes aplicada à piscicultura**. Santa Maria: UFSM. 2002.

BALDISSEROTTO, B.; DE CARVALHO, L. **Espécies Nativas para a Piscicultura no Brasil**. Espécies Nativas para a Piscicultura no Brasil, 2005.

BAPTISTA, C.; DELLOVA, D.; DONATI, G.; CEZÁRIO, G.; REAL, J. V.; LINO, J.; ALBUQUERQUE, L.; SANTOS, M.; OLIVEIRA, M.; VIEIRA, R. **Anuário peixe BR da piscicultura 2018**.

BARROSO, R.; HILSDORF, A. W. S.; MOREIRA, H. L. M.; CABELLO, P. H.; TRAUB-CSEKO, Y. M. Genetic diversity of wild and cultured populations of *Brycon opalinus* (Cuvier, 1819) (Characiforme, Characidae, Bryconinae) using microsatellites. **Aquaculture**, v. 247, n. 1–4, p. 51–65, 2005.

BENDHACK, F.; URBINATI, E. C. Mitigating stress effects during transportation of matrinxã (*Brycon amazonicus* Günther, 1869; Characidae) through the application of calcium sulfate. **Journal of Applied Ichthyology**, v. 25, n. 2, p. 201–205, 2009.

BINI, E. **Peixes do Brasil - de Rios, Lagoas e Riachos**. 1. ed. Itapema, SC: HOMEM-PÁSSARO PUBLICAÇÕES, 2012.

BOHN, M.; UTZ, H. F.; MELCHINGER, A. E. Genetic Similarities among Winter Wheat Cultivars Determined on the Basis of RFLPs, AFLPs, and SSRs and Their Use for Predicting Progeny Variance. **Crop Science**, v. 39, n. 1, p. 228, 1999.

BORBA, M. R.; FRACALOSSO, D. M.; PEZZATO, L. E. Dietary energy requirement of piracanjuba fingerlings, *Brycon orbignyanus*, and relative utilization of dietary carbohydrate and lipid. **Aquaculture Nutrition**, v. 12, n. 3, p. 183–191, 2006.

BRAZIL, M. **First National Report for the Convention on Biological Diversity, Brazil**. (1999). Disponível em: <[http://www.mma.gov.br/estruturas/chm/\\_arquivos/chapter2a.pdf](http://www.mma.gov.br/estruturas/chm/_arquivos/chapter2a.pdf)>.

BUCKUP, P. A.; MENEZES, N. A.; GHAZZI, M. S. **Catálogo das espécies de peixes de**

**água doce do Brasil**, v. 1. Rio de Janeiro: Museu Nacional, 2007.

CARMO, F. M. D. S.; POLO, É. M.; SILVA, M. A. da; YAZBECK, G. de M. Optimization of heterologous microsatellites in Piracanjuba. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 50, n. 12, p. 1236–1239, 2015.

CARNEIRO, P. C. F.; URBINATI, E. C. Salt as a stress response mitigator of matrinxa, *Brycon cephalus* (Gunther), during transport. **Aquaculture Research**, v. 32, n. 4, p. 297–304, 2001.

CASTRO, P. L. de; RIBEIRO, R. P.; SANTOS, S. C. A. dos; GOES, E. S. dos R.; SOUZA, F. P. de; POVEDA-PARRA, A. R.; VARGAS, L.; URREA-ROJAS, A. M.; LOPERA-BARRERO, N. M. Cross-amplification of heterologous microsatellite markers in Piracanjuba. **Ciência Rural**, v. 47, n. 12, 2017.

CASTRO, P. L. **CONTRIBUIÇÃO GENÉTICA E REPRODUTIVA DE PIRACANJUBA (*Brycon orbignyanus*) SUBMETIDOS AOS SISTEMAS DE REPRODUÇÃO SEMINATURAL E EXTRUSÃO**. Tese de Mestrado, Universidad de Maringá, 2015

CHIACCHIO, I. M.; ALMEIDA, I. L. G.; LEAL, M. C.; VIVEIROS, A. T. M. Sperm quality and its freezing ability throughout the spawning season in *Prochilodus lineatus* and *Brycon orbignyanus*. **Theriogenology**, v. 90, p. 284–288, 2017.

CLIMACO, G. **Isolamento, caracterização de locos microssatélites e estimativa da variabilidade genética de *Brycon amazonicus* (Spix & Agassiz, 1829) (Characidae: Bryconinae) em ambiente natural e cativo**. Tese de Mestrado, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, 2012.

CRUZ-CASALLAS, P. E.; MEDINA-ROBLES, V. M.; VELASCO-SANTAMARÍA, Y. M. Seasonal Variation of Sperm Quality and the Relationship between Spermatocrit and Sperm Concentration in Yamú *Brycon amazonicus*. **North American Journal of Aquaculture**, v. 69, n. 2, p. 159–165, 2007.

DORIA, C. R. D. C.; LIMA, M. A. L. **RIO MADEIRA: SEUS PEIXES E SUA PESCA**. Porto Velho: EDUFRO, 2015. Co-edição: RiMa Editora, 2015.

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, n. March, p. 1–9, 12, 2018.

ESCHMEYER, B. W. N.; FONG, J. D. **Species by family/subfamily in the catalago of fishes**, 2017. Disponível em: <http://researcharchive.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/fishcatmain.asp.%0ASpecies>>.

FALEIRO, G. **MARCADORES GENÉTICO-MOLECULARES aplicados a programas de conservação e uso de recursos genéticos**. Embrapa Cerrados, 2007.

FELIZARDO, V. D. O.; MURGAS, L. D. S.; DRUMOND, M. M.; SILVA, J. de A. Dose inseminante utilizada na fertilização artificial de ovócito de piracanjuba (*Brycon orbignyanus*). **Rev. Ceres**, v. 57, n. 5, p. 648–652, 2010.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS - FAO. **El estado mundial de la pesca y la acuicultura: Cumplir los objetivos de desarrollo sostenible**. 2018.

GADELHA, E. S.; DA, J.; ARAÚJO, C. PUBVET, Publicações em Medicina Veterinária e Zootecnia. Criação de Matrinxã em cativeiro. v. 7, n. 5, p. 1507, 2013.

HAHN VON HESSBERG, C.; VÉLEZ, M.; GRAJALES, A. Utilización De La Biología Molecular Como Medio Para Optimizar La Producción Piscícola Y Repoblamiento De Medios Naturales. **Boletín científico. Centro de Museos. Museo de História Natural**, v. 19, n. 1, p. 85–102, 2015.

HILSDORF, A. W. S. **Marcadores moleculares e a caracterização dos recursos genéticos de peixes: desenvolvimento sustentável da aquicultura e da pesca de espécies nativas de água doce no Brasil**. Tesis Doctoral. Universidade de São Paulo, 2013.

HOLT, B. G.; LESSARD, J.-P.; BORREGAARD, M. K.; FRITZ, S. A.; ARAUJO, M. B.; DIMITROV, D.; FABRE, P.-H.; GRAHAM, C. H.; GRAVES, G. R.; JONSSON, K. A.; NOGUES-BRAVO, D.; WANG, Z.; WHITTAKER, R. J.; FJELDSA, J.; RAHBEK, C. An Update of Wallace's Zoogeographic Regions of the World. **Science**, v. 339, n. 6115, p. 74–78, 2013.

HOSHIBA, M. A.; GONÇALVES, F. D.; URBINATI, E. C. Respostas fisiológicas de estresse no matrinxã (*Brycon amazonicus*) após exercício físico intenso durante a captura. **Acta Amazonica**, v. 39(2), p. 445–452, 2009.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE. **Produção da Pecuária Municipal**. 2016.

LIMA, F. C. T. Subfamily Bryconinae (Characins, Tetras). In Reis, R. E., S. O. Kullander & C. J. Ferraris (eds), **Check List of the Freshwater Fishes of South and Central America**. EDPURCS, Porto Alegre: 174–181, 2003.

LOPERA-BARRERO, N. M.; ALVAREZ, C. A. R.; RODRIGUEZ-RODRIGUEZ, M. D. P.; POVH, J. A.; VARGAS, L.; STREIT JÚNIOR, D. P.; SIROL, R. N.; RIBEIRO, R. P. Diversidade genética e paternidade de progênes de *Brycon orbignyanus* obtidas por diferentes sistemas reprodutivos. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 35, n. 1, p. 541, 2014.

LOPERA-BARRERO, N.; LIMA, E.; FILHO, L.; GOES, E.; CASTRO, P.; ZARDIN, A.; POVEDA-PARRA, A.; RIBEIRO, R. Genetic variability of broodstocks of restocking programs in Brazil. **Revista MVZ Cordoba**, v. 20, n. 3, p. 4677–4687, 2015.

LOPERA-BARRERO, N. M.; TANAMATI, F.; RODRIGUEZ-RODRIGUEZ, M. D. P.; POVH, J. A.; POVEDA-PARRA, A. R.; OTONEL, R. A. A.; CASTRO, P. L. de; GOES, E. S. dos R.; FURLAN, P. J.; RIBEIRO, R. P. Amplificação cruzada de marcadores microsatélites heterólogos em *Rhamdia quelen* e *Leporinus elongatus*. **Semina: Ciências**

**Agrárias**, v. 37, n. 1, p. 517, 29, 2016.

LÓPEZ, H. L.; NADALIN, D. O.; GÓMEZ, P. Peces continentales de la Argentina: Iconografía. *Brycon orbignyanus*. **ProBiota**, v. 12, n. 03, p. 1–31, 2009.

MACHADO, A. B. M.; DRUMMOND, G. M.; PAGLIA, A. P. **Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção**, 2008

MARWAL, A.; SAHU, A. K.; GAUR, R. K. Molecular Markers. In: **Animal Biotechnology**. Elsevier, 2013. 2014p. 289–305.

MATTOCKS, S.; HALL, C. J.; JORDAAN, A. Damming, Lost Connectivity, and the Historical Role of Anadromous Fish in Freshwater Ecosystem Dynamics. **BioScience**, v. 67, n. 8, p. 713–728, 2017.

MONTOYA, L. N.; MARTINS, T. P.; GIMBO, R. Y.; ZANUZZO, F. S.; URBINATI, E. C.  $\beta$ -Glucan-induced cortisol levels improve the early immune response in matrinxã (*Brycon amazonicus*). **Fish & Shellfish Immunology**, v. 60, p. 197–204, 2017.

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

NOGUEIRA, C.; BUCKUP, P. A.; MENEZES, N. A.; OYAKAWA, O. T.; KASECKER, T. P.; NETO, M. B. R.; DA SILVA, J. M. C. Restricted-range fishes and the conservation of Brazilian freshwaters. **PLoS ONE**, v. 5, n. 6, p. 1–10, 2010.

NOGUEIRA, L. B.; GODINHO, A. L.; GODINHO, H. P. Early development and allometric growth in hatchery-reared characin *Brycon orbignyanus*. **Aquaculture Research**, v. 45, n. 6, p. 1004–1011, 2014.

OLIVEIRA, D. J.; ASHIKAGA, F. Y.; FORESTI, F.; SENHORINI, J. A. Conservation Status of the “Piracanjuba” *Brycon orbignyanus* (Valenciennes, 1850) (Characiformes, Bryconidae): Basis for Management Programs. **Biodiversidade Brasileira**, v. 7, n. 1, p. 18–33, 2017.

OLIVEIRA, D. J. de; ASHIKAGA, F. Y.; FORESTI, F.; SENHORINI, J. A. INDUÇÃO A REPRODUÇÃO ARTIFICIAL E CARACTERIZAÇÃO ESPERMÁTICA DA PIRACANJUBA *Brycon orbignyanus* (BRYCONIDAE, CHARACIFORMES), ESPÉCIE EM PERIGO DE EXTINÇÃO. *Evolução e Conservação da Biodiversidade*, v. 5, n. 2, p. 10–19, 2015.

PANARARI-ANTUNES, R. de S.; PRIOLI, A. J.; PRIOLI, S. M. A. P.; GALDINO, A. S.; JÚLIO JUNIOR, H. F.; PRIOLI, L. M. Genetic variability of *Brycon orbignyanus* (valenciennes, 1850) (characiformes: characidae) in cultivated and natural populations of the upper paraná river, and implications for the conservation of the species. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 54, n. 4, p. 839–848, 2011.

PASSARI, A. K.; MISHRA, V. K.; ZOTHANPUIA; SINGH, B. P. Molecular Markers Used for Identification and Genomic Profiling of Plant Associated Endophytic Actinobacteria. In: **New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering**. Elsevier, 2018. p. 43–65.

PIORSKI, N. M.; SANCHES, A.; CARVALHO-COSTA, L. F.; HATANAKA, T.;

CARRILLO-AVILA, M.; FREITAS, P. D.; GALETTI JR, P. M. Contribution of conservation genetics in assessing neotropical freshwater fish biodiversity. **Brazilian Journal of Biology**, v. 68, n. 4, S, p. 1039–1050, 2008.

POLAZ, C. N.; RIBEIRO, K. T. Conservação de Peixes Continentais e Manejo de Unidades de Conservação. **Biodiversidade Brasileira**, v. 7, n. 1, p. 1-3, 2017.

POVH, J. A.; RIBEIRO, R. P.; SIROL, R. N.; STREIT JÚNIOR, D. P.; LOPERA-BARRERO, N. M.; VARGAS, L.; GOMES, P. C.; LOPES, T. D. S. Diversidade genética de pacu do Rio Paranapanema e do estoque de um programa de repovoamento. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 43, n. 2, p. 201–206, 2008.

PRADO, F. D.; FERNANDEZ-CEBRIÁN, R.; FORESTI, F.; OLIVEIRA, C.; MARTÍNEZ, P.; PORTO-FORESTI, F. Genetic structure and evidence of anthropogenic effects on wild populations of two neotropical catfishes: baselines for conservation. **Journal of Fish Biology**, v. 92, n. 1, p. 55–72, 2018.

REIS, R. E. Conserving the freshwater fishes of South America. **International Zoo Yearbook**, v. 47, n. 1, p. 65–70, 2013.

REIS, R.; LIMA, F. 2009. *Brycon amazonicus*. **The IUCN Red List of Threatened Species 2009**: e.T167645A6362017. <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2009-2.RLTS.T167645A6362017.en>.

RIBEIRO, R. P.; RODRIGUEZ-RODRIGUEZ, M. D. P.; RESENDE, E. K. de; SOUZA, F. P. de; POVH, J. A.; POVEDA-PARRA, A. R.; GOES, E. S. dos R.; GALO, J. M.; BERNARDO JUNIOR, M.; LOPERA-BARRERO, N. M. Genetic characteristics of Tambaqui broodstocks in the state of Rondônia, Brazil: implications on production and conservation. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 37, n. 4, p. 2375, 2, 2016.

RISSOLI, R. Z.; VASCONCELOS, E. S. D.; RANTIN, F. T.; KALININ, A. L. Effects of exercise training on excitation-contraction coupling, calcium dynamics and protein expression in the heart of the neotropical fish *Brycon amazonicus*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, v. 214, p. 85–93, 2017.

RODRIGUEZ-RODRIGUEZ, M. D. P.; LOPERA-BARRERO, N. M.; VARGAS, L.; ALBUQUERQUE, D. M.; GOES, E. S. R. D.; PRADO, O. P. P. D.; RIBEIRO, R. P. Caracterização genética de gerações de tilápia Gift por meio de marcadores microssatélites. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 48, n. 10, p. 1385–1393, 2013.

ROUBACH, R.; CORREIA, E. S.; ZAIDEN, S.; MARTINO, R. C.; CAVALLI, R. O. Aquicultura Brasileira. **Panorama da Aquicultura**, v. 34, p. 47–57, 2003.

SANTOS, C. H. A.; SANTANA, G. X.; SÁ LEITÃO, C. S.; PAULA-SILVA, M. N.; ALMEIDA-VAL, V. M. F. Loss of genetic diversity in farmed populations of *Colossoma macropomum* estimated by microsatellites. **Animal Genetics**, v. 47, n. 3, p. 373–376, 2016.

SANTOS FILHO, L. C. D.; BATISTA, V. D. S. Dinâmica populacional da matrinxã *Brycon amazonicus* (Characidae) na Amazônia Central. **Zoologia (Curitiba)**, v. 26, n. 2, p. 195–203, 2009.

SANTOS, G.; FERREIRA, E.; ZUANON, J. **Peixes comerciais de Manaus**, Ibama/AM,

ProVárzea, p. 144, 2006.

SANTOS, M. D. C. F.; HRBEK, T.; FARIAS, I. P. Microsatellite markers for the tambaqui (*Colossoma macropomum*, Serrasalminae, Characiformes), an economically important keystone species of the Amazon River floodplain. **Molecular Ecology Resources**, v. 9, n. 3, p. 874–876, 2009.

SERAPHIM GASQUES, L.; BELONI, K. P.; DE OLIVEIRA, J. R. Os marcadores moleculares em peixes e suas aplicações em publicações da base de dados do scielo. **Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da UNIPAR**, v. 16, n. 1, p. 47–50, 2013.

SGNAULIN, T.; DE MELLO, G. L.; THOMAS, M. C.; GARCIA, J. R. E.; OCA, G. A. R. M.; EMERENCIANO, M. G. C. Biofloc technology (BFT): An alternative aquaculture system for piracanjuba *Brycon orbignyanus*? **Aquaculture**, v. 485, p. 119–123, 2018.

SHIBATTA, O. A and DIAS, J. H. P. **Peixes do Brasil: CESP 40 anos**. Rio de Janeiro, Editora Doiis, p. 207, 2006.

SILVA, R. C.; DOS SANTOS, P. M.; SENHORINI, J. A.; PAES, M. D. C. F.; VALENTIN, F. N.; FUJIMOTO, T.; DO NASCIMENTO, N. F.; YASUI, G. S.; NAKAGHI, L. S. O. The effect of temperature on the initial development of *Brycon amazonicus* Spix & Agassiz, 1829 as tool for micromanipulation of embryos. **Zygote**, v. 25, n. 05, p. 637–651, 2017.

TACON, A. G. J.; METIAN, M. Food Matters: Fish, Income, and Food Supply—A Comparative Analysis. **Reviews in Fisheries Science and Aquaculture**, v. 26, n. 1, p. 15–28, 2018.

TURCHETTO-ZOLET, A. C.; PASSAIA, G.; FREDERICO, C.; MENCK, M. **Marcadores Moleculares na Era Genômica: Metodologias e Aplicações**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, p. 181, 2017.

VELASCO-SANTAMARÍA, Y. M.; MEDINA-ROBLES, V. M.; CRUZ-CASALLAS, P. E. Cryopreservation of yamú (*Brycon amazonicus*) sperm for large scale fertilization. **Aquaculture**, v. 256, n. 1–4, p. 264–271, 2006.

VIVEIROS, A. T. M.; GONÇALVES, A. C. S.; NASCIMENTO, A. F.; LEAL, M. C. Fresh, equilibrated and post-thaw sperm quality of *Brycon orbignyanus* (Valenciennes, 1850) and *Prochilodus lineatus* (Valenciennes, 1837) treated with either salmon GnRH $\alpha$  and domperidone or pituitary extract. **Neotropical Ichthyology**, v. 13, n. 1, p. 157–164, 2015.

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

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver de forma inédita locus microssatélites para o *Brycon orbignyanus* e avaliar a diversidade genética em *Brycon amazonicus* empregando marcadores moleculares.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Desenvolver *primers* espécie-específicos para o *B. orbignyanus*, para o uso da análise da diversidade na espécie e em espécies correlacionas em populações naturais ou de cativeiro.
- Analisar, comparar e avaliar a variabilidade e a estrutura genética em *B. amazonicus*, de uma população natural da Ilha da Marchantaria (IM) e uma subpopulação estoque de piscicultura de Nova Mutum (NM).

#### **4. HIPÓTESE**

Mediante a técnica da biblioteca enriquecida é possível obter novos locus microssatélites para o *Brycon orbignyanus*. E a avaliação da análise genética populacional empregando marcadores microssatélites em *Brycon amazonicus*.



**5. ARTIGO A - (Publicado na revista Italian Journal of Animal Science)**

**NOVEL MICROSATELLITE MARKERS FOR THE ENDANGERED  
NEOTROPICAL FISH *Brycon orbignyanus* AND CROSS AMPLIFICATION IN  
RELATED SPECIES**

**NOVOS MARCADORES MICROSSATÉLITES PARA O PEIXE NEOTROPICAL  
AMEAÇADO DE EXTINÇÃO *Brycon orbignyanus* E AMPLIFICAÇÃO CRUZADA  
EM ESPÉCIES RELACIONADAS**

**RESUMO** –*Brycon orbignyanus* é um peixe neotropical distribuído em diversos países sul-americanos. Essa espécie possui elevado valor econômico e ecológico e está incluída na lista de peixes ameaçados de extinção. Neste trabalho reportamos a identificação e caracterização de 12 *primers* de microsatélites para a espécie *B. orbignyanus*, tendo em vista a aplicação em estudos genéticos futuros. Screening dos 12 marcadores desenvolvidos em uma amostra de 35 indivíduos identificou sete loci polimórficos e 22 alelos, com uma variação de 1 a 3 alelos por locus. O conteúdo de informação polimórfica variou de 0,054 a 0,542, com quatro loci apresentando desvio significativo no Equilíbrio de Hardy-Weinberg. Dois loci apresentaram presença de alelos nulos. Testes de amplificação cruzada em duas espécies próximas revelaram que 11 loci são transferíveis para a espécie *B. gouldingi* e nove são transferíveis para *B. falcatus*. Os *primers* microsatélites desenvolvidos poderão ser utilizados para estudos de variabilidade genética e estruturação populacional de *B. orbignyanus* e das duas espécies relacionadas.

**Palavras-Chave:** Conservação genética, Diversidade genética, Marcador molecular, Piracanjuba, SSR.

**ABSTRACT** - *Brycon orbignyanus* is a neotropical fish found in several South American countries. This species has high ecological importance and is included in the list of fish threatened with extinction. In this study, we report the development and characterization of 12 microsatellite primers of *B. orbignyanus* for future genetic studies. Screening of the 12 markers in a sample of 35 individuals identified seven polymorphic loci and 22 alleles, with one to three alleles per locus. The polymorphic information content ranged from 0.054 to 0.542, with four loci showing significant deviation from Hardy–Weinberg equilibrium. Two loci possessed null alleles. Cross-species amplification tests in two closely related species showed that 11 loci are transferrable to *Brycon gouldingi* (*B. gouldingi*) and nine are transferrable to *B. falcatus*. The microsatellite primers designed may be used for genetic variability and population structure studies in wild populations, fish farms and restocking programmes of *B. orbignyanus* and the two-related species.

**Key-Words:** Genetic conservation, Genetic diversity, Molecular marker, Piracanjuba, SSR.

## Introduction

*Brycon orbignyanus* Characiformes: Characidae) (Valenciennes, 1850) or Piracanjuba, is a neotropical migrant fish distributed along the La Plata River basin, covering several South American countries (Reis et al. 2003; Antunes et al. 2010). This species has an excellent growth rate and is highly valued by consumers. Therefore, it is suitable for captive breeding (Borba et al. 2006) and sport fishing from fish farms. However, anthropic factors, including overfishing, pollution and habitat fragmentation for hydroelectricity generation have caused a significant decrease in the natural populations of this species (Ashikaga et al. 2015; Lima 2017), making it critically endangered in specific locations (Lima 2017).

The occurrence of these factors underlies the need for genetic monitoring of natural stocks, thereby enabling biodiversity and ecosystem conservation (Van Herwerden et al. 2006), and guiding management activities towards captive breeding and conservation management programmes (Ribeiro et al. 2016). Despite the economic and ecological importance of this species, few studies have been conducted to estimate the genetic variability in natural populations or restocking programmes. One reason is the difficulty of using molecular markers in *B. orbignyanus*, owing to the lack of data on the standardization of species-specific markers, which limits studies on genetic stocks.

Microsatellite markers are widely used for genetic studies in fish, mainly due to their ease of use and high resolving power, which makes them valuable for analyses of population structure (Abdul-Muneer 2014). However, previous data on the genome of the species being studied are necessary, and the use of microsatellites is restricted when species-specific primers are not available for genetic studies. Recently, the effort to use heterologous loci in *B. orbignyanus* has hampered the work of researchers, limiting the number of loci used (Lopera-Barrero et al. 2014; Ashikaga et al. 2015), due to the occurrence of null alleles (Henriques et al. 2017). Thus, efforts that enable the design and use of molecular markers to evaluate genetic variability in populations and guide conservation programmes are valuable.

Considering the difficulty of using heterologous primers, and the economic and ecological importance of *B. orbignyanus*, the objective of this study was to develop and characterize microsatellite primer specific for *B. orbignyanus*, and to assess cross-species amplification in two-related species (*Brycon gouldingi* and *Brycon falcatus*).

## Materials and Methods

The methodologies were approved by the Ethics Committee on the use of Animals of the State University of Londrina (CEUA\_UEL n. 11679.2017.46). The genomic DNA of *B. orbignyana* was extracted from the caudal fin according to the protocol described by Lopera-Barrero et al. (2008). DNA quality was assessed by agarose gel (1%) electrophoresis in TBE 1X buffer, run for 2 h at 80 V, and subsequent staining with SYBR Safe™ DNA Gel Stain (Invitrogen, Carlsbad, CA).

A microsatellite-enriched library was prepared using the hybridization capture method, according to the protocol described by Billotte et al. (1999), with the probes (AGA)<sub>5</sub>, (CT)<sub>8</sub> and (GT)<sub>8</sub> in the enrichment step. Briefly, genomic DNA (5 µg) from *B. orbignyana* was digested with 50 U of the type II restriction enzyme RsaI and the resulting fragments were ligated to the single-strand adaptors (10mm each) Rsa21 (50-CTCTT GCTTACGCGTGGACTA-30) and Rsa25 (50-TAGTCCACG CGTAAGCAAGAGCACA-30) with T4 DNA ligase (Promega, Madison, WI). Ligation was performed by incubation at 20 C for 2 h. Fragments with AGA, CT and GT repeats were selected by hybridization with biotinylated oligonucleotides, complementary to the microsatellite sequences, and recovered using streptavidin-coated magnetic beads (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA). The microsatellite-enriched fragments were amplified by PCR with the primers Rsa21, cloned into the pGEM-T Easy vector (Promega, Madison, WI) and transformed into competent *Escherichia coli* JM109 cells (Promega). Plasmids from single colonies were isolated and the inserts were sequenced using the sequencing kit Big Dye Terminator version 3.1 (Applied Biosystems, Foster City, CA) and an automated sequencer (ABI 3500xL, Applied Biosystems).

The software MEGA version 6.0 (Tamura et al. 2013) was used to read the sequences. The primers were designed using the software Primer3 version 0.4.0 (Rozen and Skaletsky 2000). The designed primers were tested in three *B. orbignyana* specimens for PCR standardization. An annealing temperature of 55 C resulted in the best visualization resolution on polyacrylamide gel (stained with silver nitrate) for all primers tested.

The microsatellite primers designed were amplified in 10 mL PCR reactions containing 4.5 mL 0.9 GoTaq Green Master (Promega), 0.08 IL 5 pmol forward primer and 0.32 IL 5 pmol reverse primer, 0.32 mL 0.5 IM M13 primer labelled with FAM, HEX, NED or PET probes (Applied Biosystems), 30 ng genomic DNA and 2.78 mL ultrapure water (Schuelke 2000). The following PCR conditions were used: 94 C for 4 min for initial denaturation, followed by 35 cycles at 94 C for 1 min, 55 C for 45 s, 72 C for 1 min and lastly, a final extension at 72 C for 10 min. The PCR products were subjected to

electrophoresis in an ABI3500xL automated sequencer (Applied Biosystems) using GeneScan 600 Liz dye (Thermo Fisher Scientific) as a size standard.

A population sample with 35 *B. orbignyanus* specimens from the Tietê River was used to validate the microsatellite primers. The specimens were collected from stock at the hydrobiology station (21 19001.200S and 49 47022.800W) located in the city of Promissão, in São Paulo, Brazil. Cross-species amplification was tested in eight individuals of each of the two *Brycon* species tested: *B. gouldingi* and *B. falcatus*, from the Araguaia river basin (15 53021.5200S and 52 14047.7900W), in Mato Grosso, Brazil. DNA extraction and PCR were performed according to the conditions mentioned above.

Observed ( $H_o$ ) and expected ( $H_e$ ) heterozygosity, and deviations from the Hardy–Weinberg equilibrium were calculated for each locus using the software GenAlex version 6.5 (Peakall and Smouse 2012). The polymorphic information content (PIC) was calculated using the software Cervus version 3.0.7 (Kalinowski et al. 2007). The inbreeding coefficient ( $F_{IS}$ ) was calculated using the software FSTAT version 2.9.3 (University of Lausanne, Lausanne, Switzerland) (Goudet 2005), and the linkage disequilibrium ( $p < 0.05$ ) was assessed using the software Arlequin version 3.5 (Excoffier and Lischer 2010). The presence of null alleles was tested using the software Micro-Checker (Van Oosterhout et al. 2004).

## Results

Ninety-six clones were sequenced, of which 18 had microsatellite regions and were selected for primer design. Primer screening identified 12 loci with potential for cross-amplification; these were selected for characterization and registered in GenBank (accession numbers MF510255–MF510266). A total of 22 alleles were obtained from the 12 loci amplified among the 35 *B. orbignyanus* individuals analyzed, of which seven loci were polymorphic (Borg9, Borg10, Borg25, Borg54, Borg56, Borg59 and Borg65) (Table 1). Allele size ranged from 139 (Borg59) to 413 (Borg9) and the number of alleles per locus ranged from one (Borg4, Borg12, Borg13, Borg17 and Borg55) to three (Borg9, Borg59, and Borg65). The Borg13 locus, although monomorphic for *B. orbignyanus* samples, was polymorphic in the two-species tested for cross-species amplification, with two alleles in *B. gouldingi* and three in *B. falcatus*. All 12 loci showed transferability to *B. gouldingi* or *B. falcatus*. However, one (Borg55) and three (Borg10, Borg12, and Borg65) loci failed to amplify in *B. gouldingi* and *B. falcatus*, respectively. Six loci were polymorphic to *B.*

*gouldingi* (Borg9, Borg, 13, Borg25, Borg56, Borg59, and Borg65) and two were polymorphic to *B. falcatus* (Borg13 and Borg59) (Table 2).

The mean values of observed ( $H_o$ ) and expected ( $H_e$ ) heterozygosity ranged from 0.000 (Borg10 and Borg54) to 0.958 (Borg65), and from 0.056 (Borg54) to 0.612 (Borg65), respectively. The inbreeding coefficient ( $F_{IS}$ ) was positive and significant ( $p < 0.05$ ) in three loci (Borg9, Borg10, and Borg54) and negative and significant ( $p < .05$ ) in four loci (Borg25, Borg56, Borg59 and Borg65). The PIC ranged from 0.054 (Borg54) to 0.542 (Borg65). Deviation from Hardy–Weinberg equilibrium ( $p < 0.05$ ) occurred at the Borg10, Borg54, Borg59 and Borg65 loci (Table 1). Null alleles ( $p < 0.05$ ) were observed in the Borg10 and Borg54 loci. Linkage disequilibrium of Borg9 with Borg10, Borg56 and Borg59; Borg10 with Borg54, Borg56, Borg59 and Borg65; Borg25 with Borg59; and Borg54 with Borg59 was detected ( $p < 0.05$ ).

**Table 1.** Characterization of 12 microsatellite loci genotyped in *Brycon orbignyanus*

Locus/ GenBank	Primer sequences (5'-3')	Allele size (pb)	Repeat Motif	Na	Ho	He	F <sub>IS</sub>	Hw (p)	PIC
Borg4/ MF510255	F: ACTATACTGTTGCTGCGGGT R: GTTTGATTCGGCCTTCCTGA	229	(TG) <sub>6</sub>	1	-	-	-	-	-
Borg9/ MF510256	F: CAGTCTGCGGCACTTACTTC R: ACAGTGTCTATGTTGTGCAGT	395-413	(TG) <sub>4</sub> (TA) <sub>2</sub> CTG (TA) <sub>2</sub> CTG(TA) <sub>2</sub>	3	0.147	0.189	0.236	0.228	0.179
Borg10/ MF510257	F: GAGGTACAGACATGCAGTGC R: TTCGGATGCCCTGAAGG	198-248	(TCTAA) <sub>3</sub> (CA) <sub>2</sub>	2	0.000	0.057	1.000	0.000*	0.055
Borg12/ MF510258	F: ACCATTTTACAAAGCCGGGT R: TGGGTGTTTTAAGTGCTGACC	291	(AT) <sub>4</sub>	1	-	-	-	-	-
Borg13/ MF510259	F: TCAAATAAGCCCAAACACCCT R: CTGATGGTTTCGGCACTGC	358	(CA) <sub>6</sub> TT(CA) <sub>3</sub> (CT) <sub>2</sub>	1	-	-	-	-	-
Borg17/ MF510260	F: CTCTTGCCCTCCTTCTGCA R: TGTTCTGGTATGGCTGAAGTG	126	(GA) <sub>3</sub> GCAC(CA) <sub>3</sub>	1	-	-	-	-	-
Borg25/ MF510261	F: AAGGTGCTTTGAGTGATGCC R: ACCGACCCTTTTGACTCGTA	286-288	(GA) <sub>4</sub>	2	0.348	0.287	-0.189	0.313	0.246
Borg54/ MF510262	F: ACTCAACTGACTCTGTGGCT R: AAAGCACCCCTAAATCTAACCCCT	139-188	(TTTA) <sub>3</sub> T(TTTA)	2	0.000	0.056	1.000	0.000*	0.054
Borg55/ MF510263	F: TCCAGCACAGTTTGGGTATCT R: CAGTTGTGGTGAGGCGTATT	307	(ATC) <sub>3</sub>	1	-	-	-	-	-
Borg56/ MF510264	F: ATCTGCACAAGGGGAGCTAA R: TGATAGTCAGCTGAGATTGTTCA	332-338	(TC) <sub>2</sub> T(TC) <sub>3</sub>	2	0.471	0.360	-0.294	0.073	0.295
Borg59/ MF510265	F: TCCCTCTCTGTCCAAATGTCT R: GAAGTCAAGGTTAGAGCGGC	166-172	(CT) <sub>4</sub> CC(CT) <sub>5</sub> TT (CT) <sub>5</sub> (CA) <sub>9</sub> (CT) <sub>3</sub> N(CT) <sub>7</sub>	3	0.567	0.512	-0.091	0.000*	0.411
Borg65/ MF510266	F: ACAGGCTCAGACGTGGTTTA R: GACACTAAGCCCCTCTCCAC	286-293	(CT) <sub>7</sub> (GT) <sub>7</sub> (TG) <sub>2</sub>	3	0.958	0.612	-0.551	0.000*	0.542

Bp: base pairs; Na: number of alleles; Ho: observed heterozygosity; He: expected heterozygosity; Hw: Hardy–Weinberg equilibrium; F<sub>IS</sub>: inbreeding coefficient; PIC: polymorphic information content \*Significant at P<0.05

**Table 2.** Cross-species amplification testing of 12 microsatellite loci from *Brycon orbignyanus*

Locus	Species			
	<i>Brycon gouldingi</i>		<i>Brycon falcatus</i>	
	Na	Allele size (bp)	Na	Allele size (bp)
Borg4	1	229	1	336
Borg9	2	401-413	1	418
Borg10	1	198	0	-
Borg12	1	291	0	-
Borg13	2	349-401	3	356-365
Borg17	1	126	1	126
Borg25	2	286-288	1	286
Borg54	1	139	1	159
Borg55	0	-	1	307
Borg56	3	328-338	1	338
Borg59	2	166-169	3	180-222
Borg65	3	227-281	0	-

Na: Number of alleles

## Discussion

The deviation from Hardy–Weinberg equilibrium observed for Borg10 and Borg54 can be attributed to the presence of null alleles at these loci, which might have led to the erroneous detection of homozygous genotypes and thus the underestimation of heterozygotes (Aung et al. 2010). In addition, linkage disequilibrium showed genetic drift and suggested a deviation from the Hardy–Weinberg equilibrium, particularly when considering small populations, where the effect of drift accentuates random changes in allele frequencies over time (Frankham et al. 2014). In addition, the positive and significant  $F_{IS}$  in three loci (heterozygotes deficit) can suggest inbreeding; however, the four negative values suggest that this did not occur (Okazaki et al. 2017).

The genus *Brycon* includes more than 40 species, which are widespread in the South and Central American basins, including the Amazonas, Parana, Paraguay and Araguaia basins (Reis et al. 2003; Antunes et al. 2010), which are key components of the continental ichthyofauna. However, to date, genetic studies of species from the Araguaia basin, including

*B. gouldingi* and *B. falcatus*, are scarce. This study designed 12 markers with potential for use in three *Brycon* species, including one with high economic and ecological importance (*B. orbignyanus*). Although five loci were monomorphic, it is presumed that evaluation in populations from different basins will reveal additional polymorphic loci.

River pollution, deforestation and particularly the construction of dams to generate hydroelectricity, contribute to the decline in natural populations of *B. orbignyanus*, making the species threatened in key Brazilian and Argentinian river basins (Lima 2017). Therefore, this species is of great interest for conservation programmes on the South American continent. The microsatellite markers developed and validated in this study will facilitate genetic diversity and population structure studies and contribute the production of valuable data for *B. orbignyanus* conservation and management programmes. The validation of those markers in the two-related species (*B. gouldingi* and *B. falcatus*) will enable further genetic studies to be carried out on those species.

## **Conclusions**

These new microsatellite primers can be used to analyze genetic diversity and structure in restocking programmes, natural stocks and fish farms of *B. orbignyanus*. Cross-amplification of these primers was validated for two species of *Brycon* (*B. gouldingi* and *B. falcatus*).

## **Ethical Approval**

The methodologies used in this study complied with the ethical principles postulated by the National Council for the Control of Animal Experimentation and were approved by the Ethics Committee on the use of animals of the State University of Londrina (CEUA\_UEL n. 11679.2017.46).

## **Acknowledgments**

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



## References

- 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. 1–11, 2014.
- 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, p. 674–684, 2010.
- ASHIKAGA, F. Y.; ORSI, M. L.; OLIVEIRA, C.; SENHORINI, J. A.; FORESTI, F. The endangered species *Brycon orbignyanus*: genetic analysis and definition of priority areas for conservation. **Environmental Biology of Fishes**. v. 98, n. 7, p. 1845–1855, 2015.
- AUNG, O.; NGUYEN, T. T. T.; POOMPUANG, S.; KAMONRAT, W. Microsatellite DNA markers revealed genetic population structure among captive stocks and wild populations of mrigal, *Cirrhinus cirrhosus* in Myanmar. **Aquaculture**. v. 299, n. 1-4, p. 7–43, 2010.
- BILLOTTE, N.; LAGODA, P. J. R.; RISTERUCCI, A. M.; BAURENS, F. C. Microsatellite-enriched libraries: applied methodology for the development of SSR markers in tropical crops. **Fruits**. v. 54, n. 4, p. 277–288, 1999.
- BORBA, M. R.; FRACALOSSO, D. M.; PEZZATO, L. E. Dietary energy requirement of piracanjuba fingerlings, *Brycon orbignyanus*, and relative utilization of dietary carbohydrate and lipid. **Aquaculture Nutrition**. v. 12, n. 3, p. 183–191. 2006.
- EXCOFFIER, L.; LISCHER, H. E. L. Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. **Molecular ecology resources**. v. 10, n. 3, p. 564–567, 2010.
- FRANKHAM, R.; BRADSHAW, C. J. A.; BROOK, B. W. Genetics in conservation management: revised recommendations for the 50/500 rules, red list criteria and population viability analyses. **Biological Conservation**, v. 170, p. 56–63, 2014.
- 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. Available from: <https://www2.unil.ch/popgen/software/fstat.htm>.
- HENRIQUES, R.; NIELSEN, E. S.; DURHOLTZ, D.; JAPP, D.; HEYDEN, SVD. Genetic population sub-structuring of kingklip (*genypterus capensis* – ophidiidae), a commercially exploited demersal fish off South Africa. **Fisheries Research**. v. 187, p. 86–95, 2017.
- KALINOWSKI, S. T.; TAPER, M. L.; MARSHALL, T. C. Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. **Molecular Ecology**. v. 16, n. 5, p. 1099–1106, 2007.
- 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.

LOPERA-BARRERO, N. M.; POVH, J. A.; RIBEIRO, R. P.; GOMES, P. C.; JACOMETO, C. B.; SILVA, T. L. Comparison of DNA extraction protocols of fish fin and larvae samples: modified salt (NaCl) extraction. **Ciencia e Investigación Agraria**. v. 35, p. 77-86, 2008.

LOPERA-BARRERO, N. M.; ALVAREZ, C. A. R.; RODRIGUEZ-RODRIGUEZ, M. D. P.; POVH, J. A.; VARGAS, L.; STREIT JUNIOR, D. P.; SIROL, R. N.; RIBEIRO, R. P. Genetic diversity and paternity of Brycon orbignyanus offspring obtained for different reproductive systems. **Semina: Ciências Agrárias**. v. 35, n. 1, p. 541-554, 2014.

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

PEAKALL, R.; SMOUSE, P. E. GenALEx 6.5: genetic analysis in excel. Population genetic software for teaching and research-an update. **Bioinformatics**. v. 28, p. 2537–2539, 2012.

REIS, R. E.; KULLANDER, S. O.; FERRARIS, C. J. 2003. **Checklist of the freshwater fishes of South and Central America**. Porto Alegre: Edipucrs.

RIBEIRO, R. P.; RODRIGUEZ-RODRIGUEZ, M. P.; RESENDE, E. K.; SOUZA, F.P.; POVH, J. A.; POVEDA-PARRA, A. R.; GOES, E. S. R.; GALO, J. M.; BERNARDO, M.; LOPERA-BARRERO, N. M. Genetic characteristics of Tambaqui broodstocks in the state of Rondônia, Brazil: implications on production and conservation. **Semina: Ciências Agrárias**. v. 37, n. 4, p. 2375-2385, 2016.

ROZEN, S.; SKALETSKY, H. J. PRIMER 3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: **Bioinformatics methods and protocols: methods in molecular biology**. Berlin, Germany: Springer, 2000.

SCHUELKE, M. Na economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. **Nature Biotechnology**. v.18, p.233–234, 2000.

TAMURA, K.; STECHER, G.; PETERSON, D.; FILIPSKI, A.; KUMAR, S. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. **Molecular Biology and Evolution**. v. 30, p. 2725–2729, 2013.

VAN HERWERDEN, L.; MCILWAIN, J.; AL-OUFI, H.; AL-AMRY, W.; REYES, A. Development and application of microsatellite markers for scomberomorus commerson (perciformes; teleostei) to a population genetic study of Arabian Peninsula stocks. **Fisheries Research**. v. 79, p. 258–266, 2006.

VAN OOSTERHOUT, C.; HUTCHINSON, W. F.; WILLS, D. P. M.; SHIPLEY, P. MICRO-CHECKER: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. **Molecular Ecology Notes**. v. 4, p. 535–538, 2004.

## 6. ARTIGO B – (Para submissão na revista *Genetics and Molecular Research*)

### **Diversidade genética de uma população natural e uma subpopulação de *Brycon amazonicus*.**

#### **Genetic diversity of a natural population and a subpopulation of *Brycon amazonicus*.**

**Resumo** - O objetivo deste estudo foi avaliar a diversidade genética de uma população natural da Ilha da Marchantaria (IM) e uma subpopulação de Nova Mutum (NM) de *Brycon amazonicus*, mediante amplificação de locus espécie-específicos e heterólogos. Utilizaram-se sete marcadores microssatélites SSR para analisar um total de 68 reprodutores. No total, foram encontrados 41 alelos variando entre 187 e 318 pb, com a presença de alelos exclusivos e de baixa frequência com maior predominância em IM. Os valores médios de heterozigosidade observada (0.545 IM e 0.475 NM) foram menores em comparação a heterozigosidade esperada (0.659 IM e 0.547 NM). Os valores médios de  $F_{IS}$  foram positivos, mas não significativos (0.245 IM e 0.110 NM), evidenciando-se um déficit de heterozigotos. A análise da variância molecular (AMOVA) mostrou maior variação entre as populações do que dentro delas. A diferenciação genética ( $F_{ST}$ ) foi moderada e significativa entre as populações. A análise Bayesiana realizada pelo programa Structure designou um valor de  $K = 2$ , com presença de estruturação. Como resultado os estoques apresentaram uma diversidade genética moderada. Recomenda-se a incorporação de novos indivíduos especialmente em NM. O constante monitoramento genético deve ser uma prioridade com o fim de direcionar medidas de controle dos acasalamentos nas pisciculturas.

**Palavras chaves:** Conservação; Matrinxã; Microssatélites; SSR; Variabilidade genética.

**Abstract** – The objective of this study was to evaluate the genetic diversity of a natural population from Marchantaria Island (IM) and a subpopulation from Nova Mutum (NM) of *Brycon amazonicus*, through amplification of species-specific and heterologous locus. Seven SSR microsatellite markers were used to analyze a total of 68 reproducers. In total, 41 alleles were found between 187 and 318 bp, with the presence of exclusive and low-frequency alleles with higher occurrence in the MI population. The mean values of heterozygosity observed (0.545 MI and 0.475 NM) were lower in comparison with the expected heterozygosity (0.659 MI and 0.547 NM). The mean  $F_{IS}$  values were positive but not significant (0.245 MI and 0.110 NM), evidencing a deficit of heterozygotes. The analysis of molecular variance (AMOVA) had a greater variation between population than within them. Genetic differentiation ( $F_{ST}$ ) was moderate and significant among populations. A Bayesian analysis performed by the Structure program projected a value of  $K = 2$ , showing structured. It recommended the incorporation of new individuals, especially in NM. Genetic monitoring should be a priority to direct the management of mating in fish farms.

**Keywords:** Conservation; Matrinxã; Microsatellites; SSR; Genetic variability.

## Introdução

Entre os principais peixes migratórios neotropicais de água doce encontra-se o gênero *Brycon* (Nelson, 2006). Contém cerca de 40 espécies amplamente distribuídas na América Central e do Sul, no Brasil encontra-se nas bacias Amazônica, Paraná, Paraguai e Araguaia-Tocantins (Antunes et al., 2010). As espécies do gênero *Brycon* são uma fonte de alimento e de importância na pesca comercial e na aquicultura (Silva et al., 2017). Contudo, seis espécies estão incluídas na lista do Livro Vermelho da Fauna Ameaçada de Extinção (Machado et al., 2008). A qual está relacionada a fatores antrópicos os quais modificam seus habitats, como a deflorestação, a pesca excessiva e a construção e operação de barragens hidroelétricas, (Barroso et al., 2003; Soares et al., 2017).

*Brycon amazonicus* (Spix & Agassiz, 1829) é conhecida com o nome vulgar de Matrinxã, Salmão brasileiro, Yamú. Encontra-se no Rio Amazonas e seus principais afluentes, a espécie é reofílica. Migradora e onívora com período de reprodução entre setembro e fevereiro. A produção de alevinos é restrita a alguns meses do ano (Santos et al., 2009; Silva et al., 2017). Tem alto valor comercial e grande potencial na aquicultura por apresentar rápido crescimento (Abreu et al., 2006; Soares et al., 2017), sendo a segunda espécie mais criada na região amazônica (Oliveira et al., 2018), é uma das espécies mais cultivadas no Brasil com uma produção anual de 8,77 mil toneladas no ano de 2016 (IBGE, 2016).

As práticas de aquicultura podem inadvertidamente diminuir a variabilidade genética presente nos animais cultivados pela seleção e criação de indivíduos relacionados ou pelo uso de um pequeno número de pais como reprodutores. Assim a análise da variabilidade genética é importante para evitar problemas de depressão endogamia (Ribeiro et al., 2016; Wasko et al., 2014). Também a caracterização genética das populações naturais provê um ponto de referência para os estoques mantidos em pisciculturas, sendo importante na conservação das espécies, pois permitem manter a habilidade de adaptação e a sobrevivência da prole às mudanças ambientais (Oliveira et al., 2018; Povh et al., 2008).

Nesse contexto, diferentes técnicas moleculares vêm sendo utilizadas em estudos de diversidade genética e, dentre elas, os marcadores microssatélites (SSR- Simple sequence repeats), provaram ser úteis na análise e caracterização da diversidade e estrutura populacional (Matsumoto; Hilsdorf, 2009). Uma vez que fornecem grande quantidade de informação devido ao alto polimorfismo e características co-dominantes (Castro et al., 2017). Por tal fato, a manutenção de estoques de reprodutores da espécie pode ser vantajosa na geração de alevinos tanto para programas de melhoramento genético, quanto para

conservação. Assim, o presente estudo teve como objetivo avaliar a diversidade genética de uma população natural da Ilha da Marchantaria (IM) e uma subpopulação de Nova Mutum (NM) *Brycon amazonicus*, através de marcadores moleculares microsatélites.

## Material e métodos

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Estadual de Londrina 99/2017 (CEUA\_UEL nº11679.2017.46). Foram coletadas aleatoriamente amostras de nadadeira caudal (0,5 cm<sup>2</sup> aproximadamente) em dois locais diferentes: 33 amostras oriundas da Ilha da Marchantaria (IM) (3°14'57.5"S 59°58'18.4"O), no encontro das águas dos Rios Negro e Solimões no estado de Amazonas, e 35 amostras de uma piscicultura em Nova Mutum (NM) (13°44'57.1"S 56°05'10.5"O), Mato Grosso. A primeira população (IM) é constituída totalmente por animais selvagens, diretamente coletadas do ambiente natural e mantidas em cativeiro pelo Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA). As duas populações têm como finalidade a produção de alevinos para pisciculturas.

A extração de DNA foi realizada através do protocolo de NaCl de acordo com a metodologia descrita por Lopera-Barrero et al. (2008). O DNA foi quantificado mediante o espectrofotômetro SLIPQ 026 -Quantificador L-Quant (Loccus Biotecnologia, Ribeirão Preto, Brasil). As amostras foram diluídas para 30 ng/μL. A integridade do DNA foi verificada por eletroforese em gel de agarose 1% corado com SYBR Safe™ DNA Gel Stain (Invitrogen, Carlsbad CA, USA), e corrido a 100 volts durante 60 minutos. O gel foi visualizado no transiluminador com luz ultravioleta e foi fotografado com uma câmera Kodak EDAS (1D Image Analysis 3.5 Kodak, EUA).

Foram testados 20 pares de *primers* SSR (Apêndice A), dos quais 4 foram desenvolvidos para *Brycon amazonicus*, Bag22 (JQ993454), Bag25 (JQ993457), Bag27 (JQ993459) e Bam11 (JQ993451) (Climaco, 2012), e os outros 16 para diferentes espécies do gênero: dois para *Brycon opalinus* Bom13 (AF513628) e Bom 6 (AF513624) Barroso et al. (2003); dois para *Brycon hillari*: Bh6 (DQ408243.1) e Bh5 (DQ408242.1) Sanches et al. (2006); e doze para *Brycon orbignyanus*: Borg4 (MF510255.1), Borg9 (MF510256.1), Borg10 (MF510257.1), Borg12 (MF510258.1), Borg13 (MF510259.1), Borg17 (MF510260.1), Borg25 (MF510261.1), Borg54 (MF510262.1), Borg55 (MF510263.1), Borg56 (MF510264.1), Borg59 (MF510265.1) e Borg69 (MF510266.1) (Souza et al., 2018a).

Reações de PCR foram realizadas a volume final de 10 μL contendo: 2,78 μL de H<sub>2</sub>O ultrapura, 4,5 μL de GoTaq Green Master (Promega), 0,08 μL de *primer* forward e 0,32 μL de

*primer* reverse, 0,32  $\mu$ L de *primer* M13 marcado com sondas FAM, HEX, NED ou PET (Applied Biosystems) e 2  $\mu$ L de DNA. O DNA foi desnaturado a 94 °C durante 4 minutos, seguido de 35 ciclos de 35 segundos cada a 94 °C, continuando com 1 minuto de anelamento e 60 segundos de extensão a 72 °C; e finalmente 10 min de extensão final a 72 °C no termociclador Veriti® (Applied Biosystems®, Austin, TX, E.U.A).

Dos produtos amplificados 2  $\mu$ L foram misturados com 16  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O ultrapura; e desta mistura 1  $\mu$ L foi adicionado a 8,8  $\mu$ L de formamida Hi-Di (Applied Biosystems) e 0,2  $\mu$ L de *size standard* 600-LIZ (*GeneScan* v2.0), utilizado como padrão de peso molecular. Em seguida as amostras foram desnaturadas a 95 °C por 3 minutos e imediatamente colocadas no gelo, sendo submetidas à eletroforese capilar em sistema automatizado ABI 3500 xL *Genetic Analyzer* (Applied Biosystems, CA). A determinação do tamanho dos fragmentos foi realizada com o programa GeneMarker® 2.4.0.

O número de alelos, a frequência alélica, a riqueza alélica ( $R_a$ ) e o coeficiente de endogamia ( $F_{IS}$ ) foram calculados usando o programa FSTAT 2.9.3 (Goudet, 2005), aplicando a correção de Bonferroni avaliando a significância ( $P < 0,05$ ). A heterozigose esperada ( $H_e$ ), a heterozigose observada ( $H_o$ ), o teste do equilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE), a análise de variância molecular – AMOVA e a diferenciação genética ( $F_{ST}$ ) foram estimados pelo programa Arlequin 3.5 (Excoffier et al., 2010). A presença de alelos nulos foi estimada mediante o programa FreeNA (Chapuis & Soup 2007). O FreeNA foi implementado para verificar os valores de  $F_{ST}$  em presença de alelos nulos (Weir 1996). O número de alelos efetivos ( $A_e$ ) foi calculado para cada locus usando o programa GenAlex versão 6.5 (Peakall and Smouse, 2012).

Como método de diferenciação dos valores de  $F_{ST}$  foi utilizada a definição de Wright, (1978), onde valores entre 0.00 a 0.05; 0.05 a 0.15; 0.15 a 0.25 e  $> 0.25$  indicam pequena, moderada, alta e elevada diferenciação genética, respectivamente. A presença de alelos nulos foi testada pelo programa Micro-Checker (Van Oosterhout et al., 2004). O conteúdo de informação polimórfica (PIC) Foi calculado pelo Cervus 3.0.7 (Kalinowski et al., 2007).

O programa STRUCTURE v.2.3.3 (Pritchard et al., 2000) foi utilizado para verificar a existência de possíveis agrupamentos (K) de populações geneticamente similares, seguindo o modelo misto de clusters com burning de 250,000 cadeias de Markov e Monte-Carlo (MCMC) e comprimento de corrida de 1,000,000 MCMC. As estimativas de K (número de clusters) foram obtidas a partir de simulações realizadas com K variando de um a cinco (K = 1-5), reproduzindo 20 interações para cada valor testado de K. O número de clusters foi

determinado pelo método proposto por Evanno et al. (2005) implementado no website Structure Harvester (Earl and VonHoldt 2012).

## Resultados e Discussão

Dos 20 pares de *primers* testados, sete mostraram resultados satisfatórios, sendo cinco heterólogos: (*B. opalinus* -Bom13), (*B. hillari* -Bh5, e Bh6) e (*B. orbignyanus* -Borg25, e Borg59) e dois espécie-específicos (*B. amazonicus* -Bag22, e Bag27). Os loci amplificados geraram 41 alelos, onde o número total de alelos por loco variou de três (Borg25) a nove (Bom13), com tamanhos entre 187 pb (Bom13) a 318 pb (Bag22) (Tabela 1). O tamanho dos alelos produzidos foi semelhante aos encontrados em pesquisas anteriores em *B. opalinus* (Barroso et al., 2003), *B. amazonicus* (Climaco, 2012), *B. hillari* (Sanches; Galetti, 2006), e *B. orbignyanus* (Souza et al., 2018a) (Tabela 1).

Esse resultado mostra que a região flanqueada pelos *primers* mantém seu tamanho ligeiramente constante (tamanhos similares), apesar das variações no sítio de anelamento permitindo amplificação cruzada (heteróloga), concordando com outros autores os quais também realizaram uma amplificação heteróloga em *B. orbignyanus* (Castro et al., 2017; Souza et al., 2018a). O conteúdo de informação polimórfica (PIC) variou de 0,135 (Borg25) a 0,782 (Bh6). Segundo a escala de classificação de PIC proposta por Botstein et al. (1980), seis loci no presente estudo são altamente informativos (PIC>0,500) e apenas um (Borg25) é pouco informativo (PIC<0,250).

O número total de alelos encontrados na população natural (IM 39) foi maior em comparação a população estoque (NM 25), sendo que o número de alelos por locus em NM variou de 2 a 5 e em IM variou de 2 a 9, correspondendo praticamente ao dobro. Esse fato, reforçado pelos valores médios de  $H_o$ , demonstram uma menor variabilidade genética nos indivíduos de NM, possivelmente devido aos manejos reprodutivos adotados nessa piscicultura. Alelos exclusivos e alelos de baixa frequência (alelos com frequência < 0,1) foram observados nas duas populações, tendo maior predominância na população de IM, com 18 alelos exclusivos e 15 alelos de baixa frequência.

**Tabela 1.** Caracterização dos sete loci microssatélites, Temperatura de anelamento (TA °C), Conteúdo de informação polimórfica (PIC), Tamanho dos alelos no presente estudo (pb), e Tamanho dos alelos da literatura (pb\*).

<i>Locus</i>	GenBank acesso	SSR motif	Sequencia <i>Primer</i> (5'-3')	TA (°C)	PIC	pb	pb*	Espécie	Referência
Bom13	AF513628	(CT)11	F: CATTTCCTCAGTCCTTTTCAGC R: CCCACTTAGGGTCGCAC	47	0.766	154- 176	187- 205	<i>B. opalinus</i>	Barroso et al., 2003
Bag22	JQ993454	(GA)14	F:TGTAGTAGTTCTGTCTGCTG R:TGGAGTTGTTGGTGTGAATC	60	0.716	314- 332	318- 326	<i>B. amazonicus</i>	Climaco et al.,2012
Bag27	JQ993459	(CA)5GA(CA)4	F:CACAGACACAGTCCCTCATT R:CACACCCCAGAAAGAATGAC	63	0.727	186- 236	297- 317	<i>B. amazonicus</i>	Climaco et al.,2012
Bh6	DQ408243.1	(GT)14	F: GCGTTGCGTGTGTATGTAA R: AGAGGTGTCCACAAAGTTTT	55	0.782	204- 220	188- 205	<i>B. hillari</i>	Sanches and Galeti Jr, 2006
Bh5	DQ408242.1	(AC)13	F: CTTCCTACTCATACCGGCACT R: ACATCTGGCATTAGGCATAG	55	0.748	160- 184	221- 235	<i>B. hillari</i>	Sanches and Galeti Jr, 2006
Borg25	MF510261.1	(GA)4	F: AAGGTGCTTTGAGTGATGCC R: ACCGACCCTTTTGACTCGTA	55	0.135	286- 288	273- 287	<i>B. orbignyanus</i>	Souza et al.,2018
Borg59	MF510265.1	(CT)4CC(CT)5TT (CT)5(CA)9(CT)3N(CT)7	F: TCCCTCTCTGTCCAAATGTCT R: GAAGTCAAGGTTAGAGCGGC	55	0.73	166- 172	212- 224	<i>B. orbignyanus</i>	Souza et al.,2018



O alto número de alelos exclusivos em IM demonstra um distanciamento genético entre os dois estoques e uma maior diversidade alélica nessa população. A presença de alelos exclusivos e alelos de baixa frequência podem estar relacionadas devido ao efeito fundador ou ao efeito gargalo onde há um número reduzido de espécimes. A variabilidade genética pode diminuir e causar baixa ou mesmo a ausência de fragmentos (Ribeiro et al., 2016). Porém, a presença de estes efeitos não pode ser confirmada, uma vez que não há informações sobre o manejo da reprodução dos peixes ou sobre a origem dos mesmos.

Já o alto número de alelos de baixa frequência pode ser fruto de um processo de deriva genética, já que ao confinar os indivíduos a uma população limitada em cativeiro, tende-se a acentuar os efeitos de deriva. Conforme Frankham et al. (2008), populações naturais fragmentadas irão experimentar os efeitos da deriva em todos os locus genéticos, o que tende a levar a perda de alelos, principalmente os alelos raros, ao longo das gerações. Isso é reforçado pela grande diferença em alguns loci entre os valores de  $R_a$  e  $A_e$  em ambas as populações (Tabela 2), o qual confirma uma distribuição desigual das frequências alélicas. Ao longo das gerações, esses efeitos podem influenciar a presença de heterozigotos e provocar uma diminuição na variabilidade genética, fundamental dentro de um programa de conservação (Innes; Elliott, 2006; Rodriguez-Rodriguez et al., 2010; Lopera-Barrero et al., 2014).

Os valores médios de  $H_o$  foram menores em comparação a  $H_e$  nas populações, o que resultou em um  $F_{IS}$  médio positivo, o qual evidenciou um déficit de heterozigotos (Tabela 2). Ao analisar os loci individualmente, foi verificado o desvio significativo ( $p < 0.001$ ) no equilíbrio de Hardy-Weinberg para os loci Borg25, Borg59 e Bh5 o qual pode estar relacionada com a presença de alelos nulos e ao déficit de heterozigotos (Tabela 2).

Em populações de piscicultura é comum a diminuição da diversidade genética como consequência da seleção intencional e dos acasalamentos entre possíveis parentais. Também é de se considerar o efeito fundador causado pelo pequeno número de indivíduos na população inicial, como um processo importante na alteração das frequências alélicas, o que consequentemente pode aumentar a força da deriva genética (Rodriguez-Rodriguez et al., 2010; Lopera-Barrero et al., 2015). Portanto, considerando os desvios no equilíbrio de HW e valores de  $F_{IS}$  positivos e significativos observados na população de Nova Mutum, é provável que esteja passando por processo de endogamia, possivelmente devido ao efeito fundador ou deriva seguido dos manejos reprodutivos adotados ao longo dos anos, que podem ter favorecido uma seleção dos reprodutores.

**Tabela 2.** Número de alelos por locus (Na), Riqueza alélica (Ra), Alelos efetivos (Ae), Alelos Nulos (An) Heterozigidade observada (Ho) e esperada (He), teste do equilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE) e Coeficiente de endogamia (F<sub>IS</sub>) nas populações *Brycon amazonicus*.

Populações	Locus	Na	Ra	Ae	Ho	He	An	F <sub>IS</sub>
IM	Bom13	9	8	5	0.889	0.826	0.000	-0.078
	Bh6	5	5	5	0.843	0.786	0.000	-0.074
	Bag22	5	5	2	0.520	0.612	0.046	0.153*
	Borg59	6	6	5	0.636	0.814 <sup>ab</sup>	0.090	0.221*
	Bh5	6	6	4	0.357	0.737 <sup>ab</sup>	0.208	0.520*
	Borg25	2	2	1	0.031	0.146 <sup>ab</sup>	0.152	0.789*
	Bag27	6	6	3	0.571	0.698	0.060	0.185*
	Media	6	5	4	0.545	0.659	0.079	0.245
NM	Bom13	3	3	3	0.606	0.631 <sup>b</sup>	0.030	0.041
	Bh6	5	5	4	0.968	0.782 <sup>b</sup>	0.000	-0.243
	Bag22	3	3	3	0.666	0.674	0.000	0.012
	Borg59	3	3	2	0.272	0.575 <sup>ab</sup>	0.178	0.530*
	Bh5	5	4	2	0.382	0.446 <sup>ab</sup>	0.023	0.146*
	Borg25	2	1	1	0.029	0.029	0.000	0.000
	Bag27	4	4	3	0.400	0.693 <sup>b</sup>	0.173	0.430*
	Media	4	3	3	0.475	0.547	0.058	0.110

IM: Ilha da Marchantaria, NM: Nova Mutum.

He<sup>a</sup> Presença de Alelos nulos.

He<sup>b</sup> P < 0.05: significativo no teste de exato de equilíbrio de Hardy-Weinberg.

F<sub>IS</sub>\* P < 0.05.

Reforçando nossos resultados, em estudo com *B. amazonicus* realizado com populações naturais e em pisciculturas, Oliveira et al. (2018) constataram significativa diferenciação genética entre uma população em cativeiro (piscicultura Balbina) e todas as populações naturais. Segundo os autores, a menor diversidade encontrada e a diferenciação do estoque de Balbina em relação às demais podem ser justificadas pela perda de variação genética devido à deriva genética ou seleção intencional que ocorreu ao longo das gerações de reprodução, e ao efeito fundador.

No presente trabalho, como o estoque de NM é mais antigo, é possível que o maior tempo em cativeiro levou a perda de alelos e da diversidade genética nessa piscicultura, o que ainda não aconteceu intensamente no estoque IM, que sofreu apenas com o efeito fundação do estoque. A análise comparativa AMOVA demonstrou que a maior parte da variação estava dentro e não entre as populações (Tabela 3). A diferenciação genética (F<sub>ST</sub>= 0.085) foi moderada segundo a classificação de Wright (1978). A análise Bayesiana realizada pelo Structure revelou um valor de K=2 (Figura 1).

**Tabela 3.** Análise da variância molecular (AMOVA), diferenciação genética ( $F_{ST}$ ) e classificação de Wright ( $W_r$ ) nas populações de *Brycon amazonicus*.

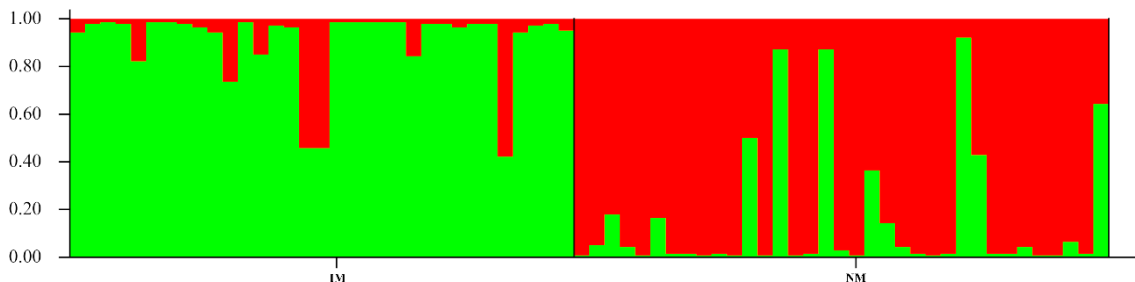
Fonte de Variação	Soma dos quadrados	Componentes da Variância	Porcentagem de variação	$F_{ST}$	$W_r$
Entre as populações	5.408	0.068	8.52*		
Entre indivíduos dentro das populações	52.308	0.066	8.25	0.085	Moderada
Dentro dos indivíduos	45	0.671	83.24	<b>0.121<sup>a</sup></b>	

\*  $P < 0.05$

AMOVA obtida a partir de 10.000 permutações

$F_{ST}^a$  estimativa global de  $F_{ST}$  de Weir (1996) usando e a correção de alelos nulos descrita em Chapuis e Estoup (2007)

**Figura 1.** Análise estrutural com base nos sete locus microssatélites com valor de  $K = 2$ , IM: Ilha da Marchantaria e NM: Nova mutum



Os resultados denotam uma estrutura genética moderadamente diferenciada, e indicam uma possível origem distinta dos estoques, porém, alguns dos indivíduos de NM não deixam de ter uma ancestralidade em comum. A qual não pode ser confirmada devido à falta de registros e informações da origem dos espécimes. Além disso, conforme salientado anteriormente, os manejos de acasalamentos adotados ao longo dos anos em NM também podem ter contribuído para essa diferenciação. Não entanto, a caracterização genética das populações naturais são relevantes para fornecer um ponto de referência na caracterização dos estoques em pisciculturas (Oliveira et al., 2018).

A conservação da variabilidade genética das populações de peixes é fundamental para manter a sua habilidade de adaptação e resposta às mudanças ambientais (Povh et al., 2008), sendo uma prioridade nos estoques mantidos em cativeiro com o fim de desenvolver estratégias que reduzam a erosão genética e minimizem riscos de depressão por endogamia (Aguiar et al., 2013). Alia-se a isso a importância atual da aquicultura como alternativa de

minimizar o problema da sobrepesca, pois a criação de espécies exaustivamente pescadas como o *B. amazonicus*, pode reduzir a demanda de indivíduos selvagens e aliviar a pressão nas populações naturais (Oliveira et al., 2018).

Finalmente, no presente estudo foi possível a comparação entre um estoque de indivíduos selvagens e um estoque já estabelecido em uma piscicultura. Com base nos resultados, é recomendável a incorporação de novos indivíduos (baseado em análises genéticas) no estoque de Nova Mutum, uma vez que, a diversidade genética foi baixa, muito provavelmente devido ao processo de deriva genética e efeito fundador o que acentuou os processos de endogamia devido a seleção artificial. É importante avaliar periodicamente a diversidade genética dos estoques reprodutivos, a fim de direcionar os processos reprodutivos e de acasalamento integrando uma grande quantidade de indivíduos, pois manejos reprodutivos não satisfatórios podem causar a diminuição da variabilidade genética em apenas uma geração como relata Povh et al. (2008).

Quanto ao estoque de IM, manejos que permitam que todos os animais tenham a oportunidade de se reproduzir e o controle de endocruzamentos devem ser adotados. Outras medidas como equalizar o tamanho das famílias, maximizar a duração das gerações (Frankam et al. 2008), utilizar o melhor sistema reprodutivo para evitar mortalidades e permitir melhor participação dos reprodutores (Souza et al., 2018b) também podem ser adotados para evitar a depressão por endogamia. Reposições pontuais do plantel com indivíduos selvagens oriundos mesmo local de coleta dos indivíduos originais (Oliveira et al., 2018) poderá ser uma medida futura para o controle genético desse estoque.

## **Conclusão**

A implementação de locus microssatélites foram efetivos na análise genética populacional e no estudo da variabilidade genética. Foi encontrada uma menor diversidade genética na subpopulação estoque e uma moderada diversidade genética entre as duas populações. Recomenda-se a incorporação de novos indivíduos especialmente em NM. O constante monitoramento genético deve ser uma prioridade com o fim de direcionar medidas de controle dos acasalamentos nas pisciculturas. Os resultados obtidos no presente estudo podem auxiliar na seleção de indivíduos e no manejo das espécies emergentes nas pisciculturas.

## Acknowledgments

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 da Universidade Estadual de Londrina.

## Referências

- Abreu JS, Urbinati EC. (2006). Physiological responses of matrinxã (*Brycon amazonicus*) fed different levels of vitamin c and submitted to air exposure. *Acta Amaz.*36: 519–524.
- Aguiar J, Schneider H, Gomes F, Carneiro J, et al. (2013). Genetic variation in native and farmed populations of Tambaqui (*Colossoma macropomum*) in the Brazilian Amazon: regional discrepancies in farming systems. *An. Acad. Bras. Cienc.*85: 1439–1447.
- Antunes RSP, Gomes VN, Prioli SM, Prioli RA, et al. (2010). Molecular characterization and phylogenetic relationships among species of the genus *Brycon* (Characiformes: Characidae) from four hydrographic basins in Brazil. *Genet. Mol. Res.*9: 674–684.
- Barroso RM, Hilsdorf AWS, Moreira HLM, Mello AM, et al. (2003). Identification And Characterization Of Microsatellites Loci In *Brycon Opalinus* (Cuvier, 1819) (Characiforme, Characidae, *Bryconinae*). *Mol. Ecol. Notes.*3: 297–298.
- Botstein D, White RL, Skolnick M, Davis RW. (1980). Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am J Hum Genet.*32(3): 314–331.
- Castro PL, Ribeiro RP, Santos SCAD, Goes ESDR, et al. (2017). Cross-amplification of heterologous microsatellite markers in Piracanjuba. *Ciência Rural.* 47
- Chapuis MP, and Estoup A. (2007). Microsatellite null alleles and estimation of population differentiation. *Molecular and Biology Evolution.* 24(3): 621–631.
- Climaco G. (2012). Isolamento, caracterização de locus microssatélites e estimativa da variabilidade genética de *Brycon amazonicus* (Spix & Agassiz, 1829) (Characidae: Bryconinae) em ambiente natural e cativo. Master's thesis. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia. Available at [<http://bdtd.inpa.gov.br/handle/tede/1923>].
- Earl DA and Vonholdt BM. (2012). Structure Harvester: a website and program for visualizing Structure output and implementing the Evanno method. *Conserv. Genet. Resour.*4: 359–361.
- Evanno G, Regnaut S, Goudet J. (2005). Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Mol. Ecol.*14: 2611–2620.
- Excoffier L and Lischer HEL. (2010). Arlequin Suite Ver 3.5: A New Series Of Programs To Perform Population Genetics Analyses Under Linux And Windows. *Mol. Ecol. Resour.*10: 564–567.

- Frankham R, Ballou JD, and Briscoe DA. (2008). Fundamentos de genética da conservação. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética.
- Goudet J. (2005). FSTAT: a program to estimate and test gene diversities and fixation indices (version 2.9.3.2). Lausanne: University of Lausanne, Department of Ecology & Evolution.
- Hilsdorf, AWS. (2013). Marcadores moleculares e a caracterização dos recursos genéticos de peixes: desenvolvimento sustentável da aquicultura e da pesca de espécies nativas de água doce no Brasil. Doctoral thesis. Universidade de São Paulo.
- Innes BH and Elliott NG. (2006). Genetic Diversity In A Tasmanian Hatchery Population Of Atlantic Salmon (*Salmo Salar* L.) Compared With Its Canadian Progenitor Population. *Aquac. Res.*37: 563–569.
- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE. (2016). Produção da Pecuária Municipal.
- Kalinowski ST, TAPER ML, MARSHALL TC. (2007). Revising how the computer program cervus accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. *Mol. Ecol.*16(5): 1099–1106.
- Lopera-Barrero NM, Povh JA, Ribeiro RP, Gomes PC, et al. (2008). Comparación de protocolos de extracción de ADN con muestras de aleta y larva de peces: extracción modificada con cloruro de sodio. *Cienc. e Investig. agrar.*35: 77–86.
- Lopera-Barrero NM, Alvarez CAR, Rodriguez-Rodriguez MDP, Povh JA, et al. (2014) Diversidade Genética E Paternidade De Progênies De Brycon Orbignyanus Obtidas Por Diferentes Sistemas Reprodutivos. *Semin. Ciências Agrárias.*35(1): 541.
- Lopera-Barrero NM, Rodriguez-Rodriguez MDP, Fornari DC, Kawakami de Resende E, et al. (2015). Genetic variability of broodstocks of Tambaqui (*Teleostei – Characidae*) from the northeast region of Brazil. *Semin. Ciências Agrárias.*36(6): 4013.
- Matsumoto CK and Hilsdorf AWS. (2009). Microsatellite variation and population genetic structure of a neotropical endangered Bryconinae species *Brycon insignis* Steindachner, 1877: implications for its conservation and sustainable management. *Neotrop. Ichthyol.*7: 395–402.
- Nelson JS. (2006). Fishes of the world, 4th edition, John Wiley & Sons Inc., New Jersey.
- Oliveira RC, Santos MDCF, Bernardino G, Hrbek T, et al. (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: 75–88.
- Peakall R and Smouse PE. (2012). GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research – an update. *Bioinformatics.*28: 2537-2539.

- Pritchard JK, Stephens M and Donnelly P. (2000). Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*.155: 945-959.
- Povh JA, Lopera- Barrero NM, Ribeiro RP, Lupchinski Jr E, et al. (2008). Monitoreo genético en programas de repoblamiento de peces mediante marcadores moleculares. *Cienc. e Investig. agrar*.35: 5–15.
- Reis RE. (2013). Conserving the freshwater fishes of South America. *Int. Zoo Yearb*.47: 65–70.
- Ribeiro RP, Rodriguez-Rodriguez MDP, Resende EK, Souza FP, et al. (2016). Genetic characteristics of Tambaqui broodstocks in the state of Rondônia, Brazil: implications on production and conservation. *Semin. Ciências Agrárias*.37: 2375-2385.
- Rodriguez-Rodriguez MDP, Lopera-Barrero NM, Ribeiro RP, Povh JA, et al. (2010). Diversidad genética de piracanjuba usada en programas de repoblación con marcadores microsatélites. *Pesqui. Agropecu. Bras*.45: 56–63.
- Sanches A and Galetti PM. (2006). Microsatellites loci isolated in the freshwater fish *Brycon hilarii*. *Mol. Ecol. Notes*.6: 1045–1046.
- Santos LCD and Batista VS. (2009). Dinâmica populacional da matrinxã *Brycon amazonicus* (characidae) na amazônia central. *zoologia*.26: 195–203.
- Silva RC, dos Santos PM, Senhorini JA, Paes MDCE, et al. (2017). The effect of temperature on the initial development of *brycon amazonicus* spix & agassiz, 1829 as tools for micromanipulation of embryos. *zygote*.25: 637–651.
- Soares BE, Bartolette R, Rosa DCO, Beserra DA, et al. (2017). Temporal variations in the feeding of the endangered neotropical fish *brycon orthotaenia* (Characiformes: Bryconidae) in the middle são francisco river. *Stud. Neotrop. Fauna Environ*.52: 239–243.
- Souza FP, Urrea-Rojas AM, Ruas CF, Povh JA, et al. (2018a). Novel microsatellite markers for the endangered neotropical fish *Brycon orbignyanus* and cross-amplification in related species. *Ital. J. Anim. Sci*.0: 1–5.
- Souza FP, Suzuki de Lima EC, de Castro PL, Goes EDSR, et al. (2018b). Parental contribution of Curimba offspring in different reproductive systems. *Bol. do Inst. Pesca*, 44(1), 74-79.
- Wasko AP, Martins C, Oliveira C, Snhorini JA, et al. (2014). Genetic monitoring of the amazonian fish matrinxã (*Brycon cephalus*) using rapd markers: insights into supportive breeding and conservation programmes. *J. Appl. Ichthyol*. 20: 48–52, 2004.
- Weir BS. (1996). *Genetic Data Analysis II: Methods for Discrete Population Genetic Data*. Sinauer Assoc. Inc: Sunderland, MA, USA.
- Wright S. (1978). *Evolution and genetics of populations: a treatise in four volumes: Vol. 4: variability within and among natural populations*. 4<sup>TH</sup> edn. University of Chicago, Chicago.

## 7. CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos, pode-se concluir que:

Os novos locus microssatélites desenvolvidos para *B. orbignyanus*, permitiram uma melhor amplificação da região conservada, evitando erros no anelamento das sequências. Permitindo obter melhores resultados mais confiáveis na análise da estrutura e diversidade genética, melhorando a conservação da espécie em programas de repovoamento, estoques naturais e pisciculturas de *B. orbignyanus*, e suas espécies correlacionadas.

No caso da espécie, *B. amazonicus* a implementação de locus microssatélites foram efetivos na análise genética populacional e no estudo da variabilidade genética. Foi encontrada uma menor diversidade genética na subpopulação estoque e uma moderada diversidade genética entre as duas populações. Os resultados obtidos no presente estudo podem auxiliar na seleção de indivíduos e no manejo das espécies emergentes nas pisciculturas.

Finalmente os resultados obtidos neste estudo contribuirão na conservação do gênero *Brycon* obtendo melhores resultados na análise da diversidade genética, contribuindo com um melhor direcionamento da reprodução das espécies conservando e acrescentando os índices de diversidade genética garantindo a supervivência da prole no ambiente.



## 8. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O desenvolvimento de marcadores moleculares microssatélites espécie específicos são indicados dentro de estudos onde o objetivo seja a conservação da espécie. Os quais permitem obter resultados mais confiáveis na análise da estrutura e diversidade genética, melhorando a conservação da espécie em programas de repovoamento, estoques naturais e pisciculturas de *B. orbignyanus*, e suas espécies correlacionadas.

A partir dos resultados encontrados na análise genética populacional em *Brycon amazonicus*, se fazem algumas recomendações: 1) Devem ser incorporados novas matrizes com alta variabilidade principalmente no estoque de NM, sendo desejável que sejam da mesma área da qual o plantel inicial foi obtido. 2) Evitar a mistura de indivíduos de pisciculturas da zona ou com origem desconhecidas com o fim de não acentuar os problemas de deriva genética os quais podem levar a endogamia. 3) Continuar com o monitoramento genético de reprodutores de *Brycon amazonicus*, e de todas as espécies emergentes na piscicultura. Finalmente, a avaliação da variabilidade genética de estoques e uma ferramenta importante para o manejo reprodutivo nas pisciculturas, as quais ajudam no direcionamento das atividades de produção e conservação das espécies de peixes.

## **APÊNDICES**

## APÊNDICE A

Características dos loci microssatélites *primers* testado nas populações de *Brycon amazonicus*

Locus	GenBank	Espécie	Referencia
Bom13	AF513628	<i>B. opalinus</i>	Barroso et al., 2003
Bom6	AF513624		
Bag22	JQ993454	<i>B. amazonicus</i>	Climaco et al.,2012
Bag25	JQ993457		
Bag27	JQ993459		
Bam11	JQ993451	<i>B. hillari</i>	Sanches and Galeti Jr, 2006
Bh6	DQ408243.1		
Bh5	DQ408242.1		
Borg4	MF510255.1	<i>B. orbignyanus</i>	Souza et al.,2018
Borg9	MF510256.1		
Borg10	MF510257.1		
Borg12	MF510258.1		
Borg13	MF510259.1		
Borg17	MF510260.1		
Borg25	MF510261.1		
Borg54	MF510262.1		
Borg55	MF510263.1		
Borg56	MF510264.1		
Borg59	MF510265.1		
Borg65	MF510266.1		

## APÊNDICE B

Características dos *primers* microssatélites amplificados satisfatoriamente nas populações de *Brycon amazonicus*

Locus	GenBank Acesso	SSR motif	Sequência dos <i>primers</i> (5'-3')	T (°C) anelamento	Espécie	Referência
Bom13	AF513628	(CT)11	F: ATTCCTCAGTCCTTTTCAGC R: CCCACTTAGGGTCGCAC	47	<i>B. opalinus</i>	Barroso et al., 2003
Bag22	JQ993454	(GA)14	F:TGTAGTAGTTCTGTCTGCTG R:TGGAGTTGTTGGTGTGAATC	60	<i>B. amazonicus</i>	Climaco et al.,2012
Bag27	JQ993459	(CA)5GA(CA)4	F:CACAGACACAGTCCCTCATT R:CACACCCCAGAAAGAATGAC	63		
Bh6	DQ408243.1	(GT)14	F: GCGTTGCGTGTGTATGTTAA R: AGAGGTGTCCACAAAGTTTT	55	<i>B. hillari</i>	Sanches and Galeti Jr, 2006
Bh5	DQ408242.1	(AC)13	F: CTTCCACTCATACCGGCACT R: ACATCTGGCATTAGGCATAG	55		
Borg25	MF510261.1	(GA)4	F: AAGGTGCTTTGAGTGATGCC R: ACCGACCCTTTTGACTCGTA	55	<i>B. orbignyanus</i>	Souza et al.,2018
Borg59	MF510265.1	(CT)4CC(CT)5TT (CT)5(CA)9(CT)3N(CT)7	F: CCCTCTCTGTCCAAATGTCT R: AAGTCAAGGTTAGAGCGGC	55		

## APÊNDICE C

Comparação do tamanho nos alelos entre os descritos na bibliografia e os encontrados no presente estudo\* em populações de *Brycon amazonicus*

Locus	GenBank Acesso	Referencia	Espécie	N	pb	N*	pb*
Bom13	AF513628	Barroso et al., 2003	<i>B. opalinus</i>	12	154-176	9	187-205
Bag22	JQ993454	Climaco et al.,2012	<i>B. amazonicus</i>	30	314-332	5	318-326
Bag27	JQ993459			28	186-236	5	297-317
Bh6	DQ408243.1	Sanches and Galeti Jr, 2006	<i>B. hillari</i>	7	204-220	5	188-205
Bh5	DQ408242.1			6	160-184	8	221-235
Borg25	MF510261.1	Souza et al.,2018	<i>B. orbignyanus</i>	2	286-288	3	273-287
Borg59	MF510265.1			3	166-172	6	212-224

## APÊNDICE D

Figura 3. Resultado dos valores de  $\Delta K$  encontrado para as populações segundo análise de agrupamento do STRUCTURE

K	Reps	Mean LnP(K)	Stdev LnP(K)	Ln'(K)	Ln''(K)	Delta K
1	20	-1121.270000	0.514117	—	—	—
2	20	-1000.635000	0.653956	120.635000	98.730000	150.973558
3	20	-978.730000	5.558218	21.905000	23.015000	4.140715
4	20	-979.840000	6.911881	-1.110000	52.595000	7.609361
5	20	-1033.545000	21.760575	-53.705000	—	—

## APÊNDICE E

Figura 4. Análise estrutural com base nos sete locus microssatélites com valor de  $K = 2$ , IM: Ilha da Marchantaria e NM: Nova mutum, de forma individual.

