

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

**Conservação genética e reposição de estoques
nativos na bacia do rio Sapucaí-Mirim (SP)**

Bruna Bueno Mendonça

**Botucatu, SP
2014**

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

BRUNA BUENO MENDONÇA

Conservação genética e reposição de estoques nativos na bacia do rio Sapucaí-Mirim (SP)

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista-UNESP, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas. Área de concentração: Zoologia.

Orientador: Dr. Fábio Porto-Foresti

**Botucatu, SP
2014**



laboratório de
Genética de Peixes
Unesp Bauru



“A constância é contrária à natureza,
contrária à vida. As únicas pessoas
completamente constantes são os
mortos.”

[Aldous Huxley]

“Nada na vida deve ser temido, somente
compreendido. Agora é hora de
compreender mais para temer menos.”

[Marie Curie]

Dedico esta dissertação aos meus pais e maiores exemplo, Ivete e Arlindo e a minha irmã, Larissa por terem sido base de tudo e pelo amor incondicional.

Gostaria de registrar meu agradecimento a todos que de alguma forma contribuíram para que este trabalho se realizasse, em especial:

A Fundação de Apoio a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo auxílio durante o desenvolvimento do projeto de mestrado fluxo contínuo, no país (2012/09629) e no exterior (2013/01658-0).

A Faculdade de Ciências e a todos os docentes do departamento de Ciências Biológicas da Unesp de Bauru, pela minha formação, ensinamentos de profissionalismo e competência que levo na minha vida profissional e pessoal.

Ao Professor Dr. Fábio Porto Foresti pela oportunidade de convivência e troca de experiências desde a iniciação científica, pela orientação durante esses anos e pela amizade, estimulando sempre os alunos a acreditarem no que fazem.

Ao Instituto de Biociências de Botucatu, ao curso de pós-graduação em Ciências Biológicas – Zoologia e a seção de Pós- Graduação pelo apoio.

Ao Laboratório de Biologia e Genética de Peixes da Unesp de Botucatu, em especial: Prof. Dr. Claudio de Oliveira e Prof. Dr. Fausto Foresti pelos ensinamentos e amizade, que somaram a minha formação.

Ao Laboratório de Ecologia de Peixes e ao Prof. Dr. Edmir Daniel Carvalho (em memória), ao Laboratório de Produção de organismos aquáticos do CAUNESP – Jaboticabal, que tem como responsável o Prof. Dr. Sérgio Ricardo Batlouni, pela colaboração em parceria com o presente trabalho.

A Sueli da piscicultura Projeto Peixe pela colaboração, disponibilidade e atenção durante os dois anos de projeto e por sempre nos receber muito bem em sua piscicultura.

A todos do Laboratório de Genética de Lugo e da empresa Aquigen da Facultad de Veterinaria de la Universidad de Santiago de Compostela, Espanha, por terem me recebido de braços abertos durante minha estadia. Sempre serei grata a todos pelo apoio e principalmente pela amizade que espero levar pela vida: Mônica, Sonia, Vane, Peke, María Portela (Porte), Lucia, Manel, Jorge, Raquel, Miguel, Adrian e Elena. E a todos que fazem parte do departamento e laboratório de genética, Prof. Dra. Carmen Bouza Fernandez, Prof. Dra. Laura Elena Sánchez Piñón, Prof. Dra. Maria Belen Gomez Pardo, Prof. Dr. José Carlos Zapata Babío. Especialmente a técnica Susana pela preocupação, em saber a dificuldade de estar em outro país, adotando a todos os estrangeiros como parte do grupo. Muito Obrigada!

Ao Prof. Dr. Paulino Martínez Portela da Facultad de Veterinária de la Universidad de Santiago de Compostela, Lugo, Espanha por ter concedido a oportunidade de estar em seu grupo de pesquisa e estar sempre preocupado com bem estar de todos que recebe. Ao exemplo de profissionalismo e competência.

A todos que conheci e me acolheram durante esses três meses fora do país, como Pepe, obrigada pela preocupação, atenção e carinho com que me recebeu, serei eternamente grata.

As pessoas que fizeram parte de uma grande família durante estes meses e fizeram deles inesquecíveis: Valéria (Valely), Israel, Gabriel (Gabe), Brian, Bego, Lucas, Júlio, Marciej, Kamila, Carlos, Adrio e Xoana espero levar vocês para sempre apesar da distância, obrigada pela amizade, por compartilhar momentos difíceis, de descontração e pelos ensinamentos. Vocês fizeram parte de um dos melhores momentos da minha vida.

Aos colegas e amigos do Laboratório de Genética de Peixes (LAGENPE) que não estão mais no grupo, mas com quem pude aprender muitas coisas desde a iniciação científica: Daniela (Dani), Diogo, Tatiana (Tati).

Aos amigos que estão no grupo do Laboratório de Genética de Peixes (LAGENPE): Andrea, Aline, Caio, Carol, Camila, Diego, Faiçall, Flávio (Garça), Fernanda (Fer), Maíce, Manolo, Rosângela, Sandro, Vinicius e Will. Cada um de vocês teve grande contribuição na minha formação profissional e pessoal, que levarei daqui em diante. Obrigada a todos pela vivência de momentos difíceis e momentos de descontração, por tornarem o laboratório minha segunda casa onde aprendi muitas coisas, tenho um imenso carinho por todos e por todos os momentos compartilhados com vocês.

Aos meus amigos em especial: Catarine e Murilo, percorremos este caminho juntos, nos completando e fortalecendo em todos os momentos. Obrigada pela força e por não terem me deixado desistir nos momentos de dificuldade.

A minha amiga de longa data Mariana, por estar sempre do meu lado, mesmo com a distância, obrigada por esses anos de amizade e sempre me ajudar em todos os momentos.

Aos meus familiares, que sem eles o presente trabalho seria impossível.

Aos meus avós paternos (Francisco-em memória) e maternos (em memória), sem o incentivo deles o caminho percorrido não teria sido o mesmo. Em especial a minha avó Cecília (em memória), um exemplo de pessoa que tinha um imenso amor à vida e ao próximo e que com certeza se orgulha da minha dedicação.

Aos meus padrinhos, Justo e Izilda, por sempre estarem presentes, acompanhando minha trajetória com incentivo e carinho.

A minha irmã e melhor amiga, Larissa, por tudo, por compartilhar momentos de Bauru comigo, pelos ensinamentos de vida e de pessoa, me dando força nos momentos de crise, sempre me levando para frente e por estar do meu lado nas minhas decisões me aconselhando e apoiando sempre, sem você esse caminho não seria o mesmo.

Aos meus pais Arlindo e Ivete, que me formaram priorizando sempre o caráter acima de tudo, por estarem sempre presentes e todos os momentos. Vocês são meus maiores exemplos e orgulho. Procuro ser um pouco de vocês em tudo que faço. Obrigada pelo amor incondicional, pelo apoio e por sempre se desdobrarem para que nossas conquistas fossem possíveis. Sem a dedicação de vocês este trabalho não seria realizado.

Muito obrigada!

Amo vocês.

RESUMO

O rio Sapucaí-Mirim, tributário da bacia do Alto Paraná apresenta grande diversidade de peixes neotropicais, em termo de riqueza de espécies. Paradoxalmente, a região que compreende a bacia do rio Paraná e alto Paraná apresenta uma grande interferência antrópica devido principalmente a construção de centrais hidrelétricas. Centrais hidrelétricas podem ser classificadas em Usinas Hidrelétricas (UHE) e Pequenas Centrais Hidrelétricas (PCH), de acordo com a capacidade de gerar energia. As PCHs são colocadas por vários autores como uma das alternativas de menor interferência, por apresentarem um tamanho reduzido, sendo construídas para suprir a demanda energética de pequenos centros urbanos e rurais. No entanto, a construção de diversas PCHs somada a construções de UHE causam uma fragmentação ainda maior nos ambientes aquáticos, ocasionando a interrupção do fluxo dos rios, este evento tem se mostrado prejudicial para várias espécies de peixes, principalmente as espécies migradoras. Estas espécies têm a necessidade de movimentar-se rio acima para fins tróficos e reprodutivos uma vez ao ano, com a construção de barramentos estas encontram dificuldades para completar seu ciclo de vida. Diversos estudos apontam esse bloqueio como principal fator na redução populacional destas espécies, alertando para necessidade de ações conservacionistas, a fim de manter os estoques pesqueiros que além de apresentarem importância ecológica nos ambientes aquáticos são de grande importância na pesca comercial e de subsistência. Há diversas ações tomadas para mitigar a redução populacional destas espécies, no entanto, no Brasil, estas ações são realizadas sem informações científicas, ocorrendo de forma equivocada, especialmente em práticas de repovoamento, onde alevinos são liberados na natureza sem nenhum conhecimento prévio biológico e genético. Práticas mitigadoras realizadas sem respaldo científico podem comprometer ainda mais a situação dos estoques de populações naturais. O desenvolvimento de tecnologias genéticas tem se mostrado de extrema importância para auxiliar na ecologia e biologia conservacionista, através do uso de marcadores moleculares. Marcadores mais variáveis como o caso dos microssatélites têm substituído outros em análises populacionais e de parentesco, devido ao seu alto grau de polimorfismo, ampla distribuição no genoma dos eucariotos, codominância, alta reprodutibilidade e baixo custo. Em face da grande interferência da construção de PCHs, especialmente em espécies migradoras, no presente estudo foram eleitas quatro destas espécies a partir do estudo da biodiversidade da ictiofauna do Rio Sapucaí-Mirim, São Paulo. Espécies como *Leporinus elongatus*, *Leporinus friderici*, *Prochilodus lineatus* e *Rhamdia quelen* foram eleitas de acordo com suas respectivas importância na região, sendo espécies chaves, representantes de duas principais ordens de peixes como Characiformes e Siluriformes. A partir da escolha das espécies, estas foram feitas coletas em diferentes pontos do rio onde há a construção recente de três PCHs como, PCH de Anhanguera, PCH de Palmeiras e PCH de Retiro. Os indivíduos coletados foram levados em pisciculturas do estado de São Paulo, compondo o banco de matrizes para o estudo

genético destas espécies e formações de estoques de reprodutores a partir de análises moleculares. Para as análises genéticas foram aplicados na população de cada espécie marcadores microsatélites descritos previamente na literatura. O emprego destes marcadores permitiu observar uma alta variação genética nas populações naturais, através de cálculo de número de alelos polimórficos, heterozigosidade (H_E e H_O), índice de fixação (F_{IS}). Em estudos genéticos conservacionistas com o objetivo de formar estoques para prática de repovoamento, além da estimativa da diversidade intrapopulacional é de grande importância o cálculo do número efetivo populacional, sendo possível a partir deste, identificar na população efeitos como deriva genética, efeito gargalo, entre outros que podem comprometer a variação genética das populações. Adicionalmente foi analisado o nível de parentesco destas populações. Os resultados das análises desenvolvidas neste estudo permitiu concluir que todas as espécies além de apresentar alta taxa de diversidade genética apresentam baixo grau de parentesco, sendo possível selecionar 27 indivíduos de *L. elongatus*, 24 indivíduos de *L. friderici*, 50 indivíduos de *P. lineatus* e 51 de e 51 de *R. quelen*. Desta forma, os indivíduos selecionados das quatro espécies de acordo com a análise de diversidade intrapopulacional e parentesco, demonstram representar de forma adequada o *pool* gênico presente em populações naturais. A variação genética fornece a base da flexibilidade adaptativa e evolutiva dos indivíduos, assim é de extrema importância o estudo genético em ações como a de repovoamento, que tem por objetivo manter a diversidade e o tamanho populacional de espécies impactadas. Desta forma os resultados deste estudo permitiram propor e realizar ações de manejo adequadas para manutenção da diversidade genética de espécies de peixes continentais, além de colaborar para futuros estudos na região, sendo notável a escassez de monitoramento de ações mitigadoras, a fim de verificar sua eficiência e o real impacto de interferências antrópicas nos corpos d'água.

ABSTRACT

The *Sapucaí-Mirim* River, tributary of Alto Paraná basin presents great diversity of Neotropical fishes in terms of richness of species. Nevertheless, the region which encompasses the *Paraná* and *Alto Paraná* basins presents a great anthropic interference especially due to the construction of hydroelectric plants, these constructions can be classified as to its capacity to generate energy, in Hydroelectric plants and Small Hydroelectric Plants (SHP). The SHP are considered by several authors as one of the alternatives with less interference, due to its small size, this kind of hydroelectric are constructed to feed the energetic demand of small urban and rural centers. However, the constructions of SHPs together with hydroelectric plants constructions causes an even bigger fragmentation in the aquatic environments , which results in the interruption of rivers flow, this event has been shown as very harmful to fishes species specially the migratory species. Once a year these species move upstream to feed and reproduce, due to dams constructions migratory fishes species have difficulties to complete their life cycle. Several studies indicates the dams as a principal factor in the reduction of migratory species population , warning to necessity of conservationist actions, aiming to maintain the fisheries stocks that represent a fisheries and ecological importance in the aquatic environments. Many actions are employed aiming to minimize the reduction of migratory species population, however, in Brazil these actions are performed without scientific support, occurring in a wrongful manner, specially the restocking, where the fishes are released into the wild without any prior biological and genetic knowledge. Mitigation practices performed without scientific support may endanger the wild stocking. The development of genetics technologies has been proven of extremely importance to assist in the ecology and conservationist biology, through the use of molecular markers. More variable makers as the microsatellites have been replaced by others makers in population and kinship analysis, these features are due to a high polymorphic degree, wide distribution in the eukaryotes genome, co-dominance, repeatability and low cost. Owing to the interference of SHC in fishe species, especially in migratory species, four of these species were selected in the present study, these species are sampled from the Sapucaí-Mirim River, São Paulo. Species as *Leporinus elongatus*, *Leporinus friderici*, *Prochilodus lineatus* and *Rhamdia quelen* were chosen according their respective importance in the region; these species represent the two main orders as Characiformes and Siluriformes. The sampling was made in different locations in the river, where recent constructions of three SHC as Anhanguera SCH, Palmeiras SCH and Retiro SCH. The individual collected were maintained in fish farming in São Paulo state, these sampled fishes compose the database to genetic study of these species and the formation of broodstocks. For the genetics analysis it was applied microsatellite molecular marker in each population, these microsatellites were previously described in the literature. The employment of these markers has allowed the observation of a high genetic variation in the wild populations; this study was

made through number of polymorphic alleles, heterozygosity (H_E e H_O), and fixation indice (F_{IS}) measure. Besides of the diversity intra population estimative, in conservationist genetics studies is of major importance the effective number estimation (N_e), being possible from the N_e measure to identify effects as genetic drift, bottleneck, among others effects might affect the genetic variability of wild populations. The kinship degree of the populations sampled was measure in addition. The results of analysis developed in this study allowed conclude all the species displayed high diversity genetic rates and low kinship degree, 27 individuals of *L. elongatus*, 24 individuals of *L. friderici*, 50 individuals of *P. lineatus* and 51 of *R. quelen* were selected considering the intra population diversity and kinship degrees, these individuals represent adequately the pool genic present in wild populations. The genetic variation provides the flexibility adaptive and evolutionary basis of the individuals, being of extremely importance the genetics studies in restocking actions, this kind of analyses are important aiming maintain the diversity and size of endangered populations. Therefore, the results of this study enabled the proposal and performance of adequate management actions for the maintenance of the continental fish species genetic diversity, besides cooperating to further studies in the region of *Sapucaí-Mirim* River, as its notory the few monitoring studies of mitigation actions, aiming to verify its efficiency and the real impact of anthropic interference on aquatic environments.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Bacia do rio Alto Paraná e o rio Sapucaí-Mirim	1
1.2 Barramentos e construção de PCH	3
1.3 Ictiofauna continental	5
1.4 Ferramentas genéticas na prática do repovoamento	9
1.5 Ferramentas moleculares e sua aplicação em práticas de repovoamento	12
<i>1.5.1 Marcadores Microssatélites</i>	12
1.6 Objetivos	14
2 MATERIAL E MÉTODOS	16
2.1 Material	16
2.2 Métodos	20
<i>2.2.1 Marcação dos exemplares</i>	20
<i>2.2.2 Extração e quantificação das amostras</i>	21
<i>2.2.3 Seleção dos loci microssatélites</i>	22
<i>2.2.3.1 Espécies <i>Leporinus elongatus</i> e <i>Leporinus friderici</i></i>	23
<i>2.2.3.2 Espécie <i>Prochilodus lineatus</i></i>	25
<i>2.2.3.3 Espécie <i>Rhamdia quelen</i></i>	28
<i>2.2.4 Análises genéticas intrapopulacional</i>	29
3 RESULTADOS	31
3.1 Capítulo 1	32
3.2 Capítulo 2	47
3.3 Capítulo 3	59
4 CONSIDERAÇÕES FINAIS	70
5 REFERÊNCIAS	75

1 INTRODUÇÃO

1.1 Bacia do rio Alto Paraná e o rio Sapucaí-Mirim

O rio Paraná é um dos maiores rios brasileiros, formado pela confluência de dois importantes rios, como o rio Grande e o rio Paranaíba. A bacia do Alto rio Paraná corresponde a aproximadamente um terço do rio Paraná e cobre uma área que corresponde a 10,5% do território brasileiro. Devido ao grande aglomerado populacional e desenvolvimento industrial, na região compreendida pela bacia do rio Paraná e Alto Paraná, estão localizadas várias construções de barramentos, sendo suas águas utilizadas para consumo humano, agropecuária e geração de energia. A bacia do rio Alto Paraná é conhecida pela sua grande riqueza de espécies, estima-se que 220 espécies de peixes ocorram nessa bacia, e que 39% destas sejam espécies de hábitos migratórios, ou seja, dirigem-se a montante durante a época reprodutiva (AGOSTINHO, 2003).

Nesta bacia está localizado o rio Sapucaí-Mirim, tributário do rio Sapucaí. Este rio está situado a noroeste do estado de São Paulo e compreende uma área de 9.166,86 km (CBH, 2012). O rio Sapucaí-Mirim junto com o rio Uberaba, são os principais afluentes do reservatório da Usina Hidrelétrica de Porto Colômbia, tendo papel fundamental nos processos reprodutivos da ictiofauna confinada neste reservatório e conseqüentemente na manutenção dos estoques e da diversidade de espécies de peixes neste complexo (CESÁRIO, 2010).

De acordo com este pesquisador a ictiofauna do rio Sapucaí-Mirim é bastante semelhante a encontrada e outros rios da bacia do Alto Paraná e Grande, apresentando uma composição ictiofaunística com dominância das ordens Characiformes (46%) e Siluriformes (39%), onde algumas espécies como *Leporinus friderici*, *Astyanax altiparanae*, *Astyanax fasciatus* e *Rhamdia quelen* se mostraram comuns neste rio. Por outro lado outras espécies não são facilmente encontradas em algumas regiões do rio, como *Leporinus elongatus*, *Leporinus lacustris* e *Pimelodus maculatus*, apesar de serem comumente encontradas em outros rios da bacia do Alto Paraná (CESÁRIO, 2010).

A presença de grandes migradores como *Prochilodus lineatus* e *Salminus brasiliensis* nos trechos deste rio demonstram a importância deste como rota de migração e área de reprodução destas espécies, que necessitam realizar grandes migrações para completar seu ciclo de vida (AGOSTINHO et al., 2007; CESÁRIO, 2010).

Espécies como estas, de hábitos migratórios, são amplamente afetadas pela interrupção do fluxo do rio, por encontrarem barreiras na migração rio acima. Este fato somado a intensa utilização de espécies migradoras na pesca de subsistência e comercial, leva a redução populacional dessas espécies como é o caso dos curimbas, jundiá e piau (HILSDORF e PETRERE Jr., 2002). O fato de a maioria apresentar hábito alimentar piscívoro e frugívoro as tornam mais apreciadas no mercado pesqueiro. Assim, a pesca nos ambientes lóticos pode ser baseada principalmente nessas espécies (HILSDORF e PETRERE Jr., 2002).

1.2 Barramentos e construção de PCH

Apesar da grande riqueza de espécies continentais brasileiras há muitas ainda não descritas (AGOSTINHO et al., 2007). O conhecimento sobre a ictiofauna sul-americana e brasileira é ainda precária, principalmente com respeito a espécies continentais (OLIVEIRA et al., 2009).

Paradoxalmente, a pesca extrativista tem grande importância na economia brasileira. De acordo com o Boletim da Pesca e Aquicultura (MPA, 2011) a produção pesqueira de peixes continentais passou 240 mil toneladas, tendo entre as mais pescadas espécies como, jaú, curimba, lambari, piau e bagres. A pesca extrativista somado aos efeitos cumulativos a longo prazo de diversas outras ações antrópicas, como introdução de espécies exóticas, poluição, construção de represas, controle de cheias, degradação de matas ciliares, entre outros fatores tem colaborado para a diminuição da biodiversidade dos ecossistemas aquáticos continentais (HATANAKA et al., 2006; AGOSTINO et al., 2007).

Entre as ações que afetam os cursos hídricos, a construção de barramentos e a consequente construção de lagos artificial, pode ser considerado um fator importante e que merece atenção, em termos de perda da diversidade associados aos ambientes aquáticos (COWX, 2002). A construção de reservatórios primariamente está associada a diversas funções como regulação do fluxo dos rios e também geração de energia (AGOSTINHO et al., 2007). Além da construção de grandes Usinas Hidrelétricas (UHE), a fim de suprir demandas locais, há também a construção de Pequenas Centrais Hidrelétricas, conhecidas como PCHs.

Construções de Pequenas Centrais Hidrelétricas (PCHs) são muito comuns em rios de pequeno porte, como o caso do rio Sapucaí-Mirim, onde há diversas construções de PCHs (Figura 1), como a de Dourado, São Joaquim, Palmeiras, Anhanguera e Retiro, que estão distribuídas ao longo do rio (ABERTIN e MAUAD, 2008).



Figura 1. Construção de Pequena Central Hidrelétrica no rio Sapucaí-Mirim, SP.

PCHs são projetos de menor complexidade técnica, adotados com os objetivos de abastecimento de energia elétrica para populações e empresas locais (ANEEL, 2006; ALBERTIN; MAUAD, 2008). Este tipo de empreendimento possibilita um melhor atendimento a pequenos centros urbanos e regiões rurais, promovendo e se articulando com o desenvolvimento regional (ANEEL, 2006).

A construção deste tipo de empreendimento juntamente com as grandes Usinas Hidrelétricas ocasiona uma maior fragmentação nos cursos d'água, causando imediata interrupção do fluxo contínuo do rio, acarretando na perda da conectividade. Desta forma, a migração tanto rio acima como rio abaixo é bloqueada. Há muitas espécies de

peixes que dependem desse tipo de movimento para completar seu ciclo de vida (COWX, 2002), estas são chamadas espécies migradoras.

Espécies com hábitos migratórios são as mais afetadas por esse tipo de empreendimentos, e se medidas mitigadoras não forem tomadas pode ocorrer uma drástica redução no número de indivíduos na população ou completa ausência dessas espécies ao longo do tempo (LARINER, 2000; COWX, 2002, AGOSTINHO et al., 2007, GODINHO et al., 2009), como relatado no trabalho de Silva et al. (2006), onde foi possível observar a redução do número do estoques pesqueiros pertencentes a espécie *Prochilodus lineatus* após a construção de barramento no rio Grande, rio Mogi-Guaçu e rio Pardo.

Nos últimos anos, a bacia do Alto rio Paraná se encontra sob forte redução das espécies migradoras. Essas espécies, devido a seus hábitos como grande capacidade de deslocamento e consequente utilização de diferentes *habitats* ao longo do seu ciclo de vida, são os grupos mais vulneráveis (COSTA et al., 2008). Apesar de as espécies migradoras serem recursos de grande importância no Brasil, o conhecimento a respeito de suas estratégias de vida ainda é muito restrito o que dificulta ainda mais a sua conservação (PETRERE, 1985; CAROLFELD et al., 2003).

1.3 Ictiofauna continental

O grupo mais diverso dentre os vertebrados é constituído pelos peixes, compreendendo 25 mil espécies atuais (NELSON et al., 2006). No Brasil há uma grande diversidade desse grupo, liderando o ranking mundial em relação ao número de espécies de peixes (MCALLISTER et al., 1997), com cerca de 2.587 espécies descritas

exclusivas de água continental (BUCKUP et al., 2007). Há estimativas que o conhecimento dessa fauna é bastante restrito, o que é corroborado pela descrição anual de novas espécies (BUCKUP et al., 2007).

A quantidade de espécies de peixes continentais quando comparada a de ambientes marinhos, apresenta-se muito mais diversa (BUCKUP et al., 2007). Sendo a maioria pertencente a classe Actynopterygii, distribuídas em três principais ordens como a dos Characiformes, Gymnotiformes e Siluriformes.

O elevado número de espécies se deve a grande diversidade e heterogeneidade das bacias hidrográficas da região Neotropical onde o Brasil está inserido, com abundante distinção entre si (BUCKUP et al., 2007; LANGEANI et al., 2007). A maior parte dessa diversidade é concentrada nas bacias do Amazonas e Paraná (LANGEANI et al., 2007).

A bacia do Alto rio Paraná abriga cerca de 310 espécies de peixes, sendo as ordens Siluriformes e Characiformes com maior riqueza registrada nessa bacia compreendendo 80% das espécies e compõem os grupos dominantes nos ambientes lóticos (LANGEANI et al., 2007). O sistema do Alto rio Paraná abrange os maiores rios do estado, esses são habitados por espécies de médio a grande porte, como os curimbas, piaparas, pintados e jaús. Essas espécies de peixes apresentam ampla distribuição geográfica e grande importância na pesca comercial e de subsistência (AGOSTINHO et al., 2007).

Tendo em vista que as ordens, Characiformes e Siluriformes representam a maior riqueza de espécies na bacia do Alto rio Paraná, as torna extremamente

importante, pois a ordem Characiformes representa um dos maiores grupos de peixes continentais, com 237 gêneros e 1.343 espécies (NELSON, 2006), apresentando enorme diversidade de formas, habitando os mais variados tipos de *habitats* (FILHO e RIBEIRO, 1991), já os peixes pertencentes a ordem dos Siluriformes, comumente conhecidas como *catfishes*, bagres, apresentam um total de 478 gêneros e 3.093 espécies. Esses indivíduos apresentam ampla distribuição no continente Sul-Americano, tendo uma distribuição tanto em águas interiores quanto em regiões costeiras (FERRARIS et al., 2007).

Apesar de os peixes constituírem o grupo mais diversificado entre os vertebrados (NELSON, 2006), são os animais aquáticos menos considerados em ações conservacionistas. Sendo geralmente obscuras as estimativas de biodiversidade e programas de conservação deste grupo (STIASSNY e PINNA, 1994; COWX, 2002).

Apesar da grande diversidade representada pelas espécies de peixes continentais, a combinação de fatores como a pesca intensiva, introdução de espécies, poluição e consequente perda de *habitats* tem reduzido esta biodiversidade (AGOSTINHO et al., 2007). Desta forma, diversas ações vêm sendo adotadas com a finalidade de minimizar os impactos causados por interferências nos ambientes aquáticos (AGOSTINHO et al., 2005).

Historicamente ações mitigadoras, compreendem no controle da pesca, como criação do período de defeso; estocagem de peixes, para práticas de soltura e construção de escadas de transposição de peixes (AGOSTINHO et al., 2004). O controle da pesca objetiva regular a captura de peixes em período de desova, durante o período reprodutivo, além de controlar a captura de peixes jovens, no entanto, há um grande

comprometimento dessa ação devido a falta de fiscalização e recursos financeiros limitados. Ações de estocagem de peixes em sua grande maioria são simbólicas, tirando proveito de pretensões recreativas de comunidades locais, sem se preocupar com os danos genéticos causados na soltura indiscriminada de alevinos (AGOSTINHO et al., 2007).

No Brasil ainda não existem ações de estocagem ou repovoamento baseadas em informações científicas (AGOSTINHO et al., 2007), características importantes como número de indivíduos necessários para fundar uma população, variabilidade genética intrapopulacional, entre outras informações, são discriminadas em ações mitigadoras como em práticas de repovoamentos (ALLENDORF e RYMAN, 1987; AGOSTINHO et al., 2007). Neste caso espécies inadequadas são estocadas em tamanho, idade e número incorretos (AGOSTINHO et al., 2005).

Atualmente, os avanços genéticos e o aprimoramento de técnicas de biologia molecular, como a utilização de marcadores moleculares, novas possibilidades são oferecidas na seleção genética de estoques e monitoramento de peixes voltados à prática de repovoamento.

Estudos genéticos contribuem diretamente para minimizar a queda do número populacional ou até mesmo o risco de extinção, através de ações de manejo de populações selvagens, ou indiretamente através do uso de marcadores genéticos, auxiliando no entendimento da biologia das espécies (SELKOE e TOONEN, 2006). Assim, estudos como estes tornam-se importantes em ações mitigadoras, como práticas de repovoamento. Pois características fundamentais como tolerância a mudanças climáticas, melhor crescimento ou resistência a doenças são conferidas por

um único alelo ou em combinação com outros alelos ou *loci*. Cada variante alélica em cada *locus* codificante em uma população pode ser tomada como parte de um recurso genético desta (BEAUMONT e HOARE, 2003).

1.4 Ferramentas genéticas na prática do repovoamento

A variabilidade genética é considerada a base de grande parte de toda variação biológica, pois permite que populações submetidas a alterações ambientais respondam as pressões ecológicas no sentido contrário à redução populacional ou até mesmo a extinção local (WANG, 2002). Por isso a manutenção da variabilidade intra e interpopulacional deve ser o objetivo dos programas de conservação e manejo de espécies afetadas por ações antrópicas (WANG, 2002).

Práticas de repovoamento sem o correto respaldo científico podem gerar populações de estoque com alto grau de endogamia, devido a diversos fatores como alto nível de parentesco entre as matrizes. Esta perda da variação genética na maioria das vezes é causada através da formação de populações grandes a partir de grupos de reprodutores reduzidos (BRIESCOE et al., 1992; WANG, 2002). O endocruzamento conduz imediatamente a queda de heterozigosidade, reduzindo a variação genética intra e interpopulacional, através da eliminação de combinações fenotípicas (WANG, 2002).

Assim, quando pensamos em uma prática de repovoamento adequada é necessário levar em consideração alguns fatores como, **número efetivo populacional (N_e), diversidade genética e o nível de parentesco entre os indivíduos.**

O número efetivo populacional é o número de indivíduos que contribuem com seus genes para a geração seguinte (NUNNEY e CAMPBELL, 1993). Uma simples amostragem do número de indivíduos em uma população (N), muitas vezes acaba não correspondendo ao efetivo tamanho populacional, que muitas vezes é muito menor que o número de indivíduos estimados na amostragem. Isto ocorre devido a diversos fatores, como a contabilização de indivíduos imaturos e senis na estimativa do tamanho efetivo populacional, diferenças na razão sexual, flutuações no número de indivíduos por gerações e desigualdade no sucesso reprodutivo (FRANKHAM, 1995). Portanto o N_e é igual ao número de indivíduos em uma população ideal que teria as mesmas propriedades genéticas, em termos de deriva genética, que a população atual (LANDE e BARROWCLOUGH, 1986; NUNNEY e CAMPBELL, 1993).

Devido a esses fatores, a fim de evitar uma redução significativa no tamanho da população (N_e), populações formadas em programas de pisciculturas devem ser fundadas a partir de um número suficientemente grande de indivíduos (ALLENDORF e RYMAN, 1987). Populações grandes fundadas a partir de grupos pequenos ou combinação desigual de progenitores podem exibir um número efetivo populacional baixo (BRIESCOE et al., 1992), sendo uma das principais causas da perda da variabilidade genética em estoques de peixes em programas de repovoamento (FRANKHAM, 1995).

Adicionalmente ao cálculo do número efetivo populacional, é de grande importância avaliar os níveis de diversidade genética intrapopulacional através de índices como heterozigosidade esperada (H_E) e observada (H_O), número de alelos (N_a) e índice de fixação, que pode ser interpretado como índice de endogamia (F_{IS}). Tendo

em vista que a diversidade genética é a base da flexibilidade adaptativa dos organismos e de resposta a alterações ambientais. Sendo indispensáveis análises como estas para o estudo genético populacional visando a manutenção do *pool* gênico e consequente conservação de espécies.

O endocruzamento pode contribuir para a redução do número populacional, no entanto, é difícil estabelecer uma direta ligação entre variação e variabilidade populacional e extinção. O cruzamento entre indivíduos aparentados altera as frequências genotípicas, provocando perda da variabilidade genética através do aumento na frequência de homozigotos na população, a produção de indivíduos homozigotos em uma população pode ser deletéria, podendo causar diminuição no número da população (FRANKHAM, 1995; WANG, 2002; FRANKHAM, 2005).

Alguns trabalhos envolvendo estudos de estoques de alevinos voltados a prática de repovoamento, mostraram que alguns dos estoques estudados pertencentes a espécies como pacu (*Pseudoplatystoma mesopotamicus*) e curimba (*Prochilodus lineatus*) apresentaram baixa variabilidade genética em relação aos outros, o que foi justificado pelo efeito fundador desses estoques, ou seja, os estoques que apresentaram menores taxas de variação genética teriam sido formados por indivíduos com *pool* gênico semelhante entre si (LOPERA-BARRERO et al., 2008; LOPES et al., 2008).

Assim é notável que a composição genética das populações seja afetada por mudanças na estrutura populacional e número efetivo, tendo consequências principais, como a depressão endogâmica, acumulação e perda de mutações deletérias e perda da variação genética (FRANKHAM, 2005).

1.5 Ferramentas moleculares e sua aplicação em práticas de repovoamento

A perda da variação genética em práticas de repovoamento ocasionadas pela falta de informações genéticas, destaca a importância do uso de ferramentas genéticas, como os marcadores moleculares em ações de manejo. Com o desenvolvimento de tecnologias genômicas, muitas ferramentas são apresentadas para auxiliar nos estudos de análises genéticas (LIU, 2007).

Estas ferramentas tem se mostrado eficientes em análises genéticas da biodiversidade, podendo ser empregados para avaliar a diversidade genética dos organismos, através do nível de polimorfismo presentes no DNA dos indivíduos. Algumas características presentes nos marcadores moleculares, como a herança mendeliana, permite determinar características exclusivas de cada organismo e entender a história evolutiva das espécies através de análises filogenéticas (HOSHINO et al., 2012).

1.5.1 Marcadores Microssatélites

Os microssatélites ou repetições de sequências simples (SSRs), compostos de um a seis pares de bases repetidos em *tandem* (TAUTZ, 1989), têm sido considerados ideais para aplicação em diversos campos de estudo, como genética da conservação, genética forense, mapeamento genético, medicina forense, entre outras áreas. Esta ampla aplicação destes marcadores se deve a sua ampla distribuição no genoma dos eucariotos, permitindo uma ampla cobertura do genoma e a características como, alto

nível de alelos polimórficos, codominância, tamanho relativamente pequeno, herança mendeliana e alta reprodutibilidade (CHISTIakov, 2006).

A aplicação de microssatélites em espécies como truta-marrom (*Salmo trutta*) (SØNSTEBØ e BORGSTROM, 2006); pacu (*P. mesopotamicus* no rio Paraná (CALCAGNOTTO e DESALLE, 2009) e Paraguai (IEVOLINO et al., 2010), apontou a presença de populações panmíticas e metapopulações, ou seja, populações diferenciadas geneticamente, que mantém o fluxo gênico entre si. Assim, a caracterização de espécies geneticamente diferentes tem se mostrado eficiente para determinar o manejo adequado para a conservação do potencial evolutivo das espécies (LAIKRE et al., 2005; FRAKHAM et al., 2008).

O uso deste marcador vai desde sua alta acessibilidade como marcador genético para segmentos cromossômicos, como na identificação de indivíduos, para o rastreamento da história biológica das populações (CHAMBER e MACAVOY, 2000). Uma considerável dificuldade no uso de microssatélites é a necessidade de isola-los e caracteriza-los, caso não esteja disponível para a espécie de interesse. Entretanto, uma vez disponível, uma grande quantidade de indivíduos pode ser facilmente genotipados para alelos codominantes (PIORSKI et al., 2008).

Diversos trabalhos demonstram que a transferabilidade, ou amplificação cruzada de *loci* heterólogos podem ser extremamente alta quando realizada para espécies do mesmo gênero ou de gêneros taxonomicamente relacionados (OLIVEIRA et al., 2006). Como em *Leporinus elongatus* e *L. friderici*, em que foi feita a transferabilidade de *loci* desenvolvidos para a espécie *L. macrocephalus* (MORELLI et al., 2007). Souza et al. (2011) também teve sucesso no teste de amplificação cruzada, com *loci* desenvolvidos

para *Phractocephalus hemiliopteus* e testados em espécies pertencentes a família Pimelodidae (cachara, jaú, jurupoca, jundiá, pintado e piraíba).

Assim, marcadores microssatélites se tornam ideais para análises de diversidade genética, devido principalmente a sua alta variabilidade, além da sua aplicabilidade em análises de parentesco em prática de repovoamento, devido a presença de codominância neste marcador (SELKOE; TOONEN, 2006).

1.6 OBJETIVOS

Tendo em vista que no Brasil há um déficit de monitoramento inicial e constante de populações de espécies de peixes neotropicais onde são construídas Centrais Hidrelétricas e o importante papel desempenhado pela diversidade populacional e integridade genética no uso sustentável de ecossistemas aquáticos, o presente trabalho teve por objetivo desenvolver sistema de análise genética inicial de quatro espécies de peixes continentais (*Leporinus elongatus*, *L. friderici*, *Prochilodus linetaus* e *Rhamdia quelen*), com grande importância comercial e de subsistência na pesca extrativista brasileira, por meio do:

- 1) estabelecimento de informações básicas sobre características genéticas das populações naturais destas espécies no Sapucaí-Mirim, SP;

- 2) analise a diversidade genética e o grau de parentesco intrapopulacional de cada espécie estudada;
- 3) direcionar cruzamentos de matrizes de reprodutores adequados para prática de repovoamento, provenientes de populações naturais do rio Sapucaí-Mirim, SP;
- 4) propor praticas adequadas de repovoamento para as Companhias Hidrelétricas que possuem PCHs no rio Sapucaí-Mirim, SP.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Materiais

Tendo em vista os problemas gerados pela falta de informações em populações impactadas principalmente pela construção de barramentos, é de extrema importância estudos genéticos populacionais que envolvam espécies de importância ecológica e comercial. Deste modo, no presente trabalho foram feitos levantamentos sobre a ictiofauna da região do rio Sapucaí-Mirim, onde foram eleitas quatro espécies de grande importância na fauna local, como *L. elongatus* (piapara), *L. friderici* (piautês-pintas), *P. lineatus* (curimba) e *R. quelen* (jundiá) (Figura 2). As espécies pertencentes aos gêneros *Prochilodus* e *Leporinus* são pertencentes a ordem dos Characiformes, um dos grupos de maior abundância na região neotropical juntamente com a ordem dos Siluriformes onde estão as espécies pertencentes ao gênero *Rhamdia*. Estas quatro espécies apresentam hábitos migratórios, sendo de grande importância na pesca comercial, esportiva e na aquicultura da região.

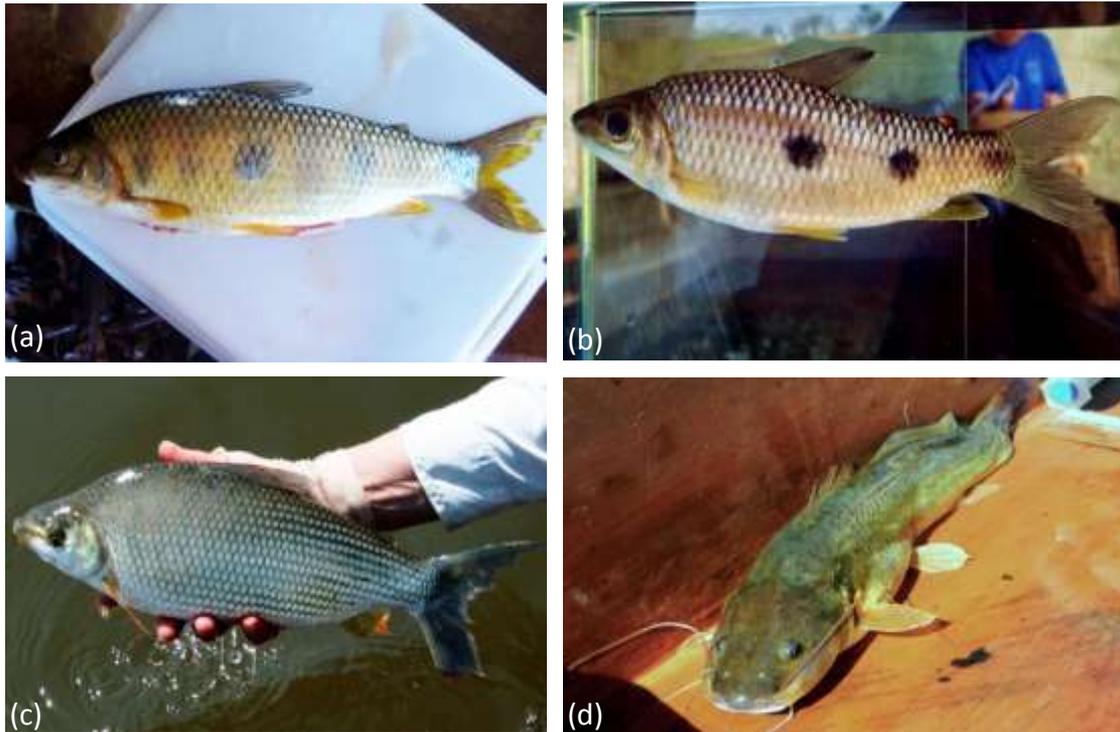


Figura 2. Exemplos coletados a partir de populações naturais. (a) Exemplar de piapara (*L. elongatus*). (b) Exemplar de piau-três-pintas (*L. friderici*), (c) Exemplar de curimba (*P. lineatus*) e (d) jundiá (*R. quelen*).

De maneira a representar e analisar a diversidade genética de populações naturais de áreas impactadas pela construção de centrais hidrelétricas, indivíduos pertencentes as quatro espécies foram coletados na região onde há Pequenas Centrais Hidrelétricas (PCHs), como a de Anhanguera, Palmeiras e Retiro, no rio Sapucaí-Mirim, São Paulo (Figura 3). As coletas foram realizadas por pesquisadores do Laboratório de Ecologia de Populações de Peixes de Água Doce, que trabalham em parceria no presente estudo, sendo realizadas a montante e jusante da barragem, nos seguintes pontos: 20°34'22''S, 47°46'57,3''W; 20°32'58,8''S, 47°47'35,22''W; 20°30'59,82''S; 47°50'25,50''W; 20°30'37,62''S, 47°51'23,76''W; 20°29'42,78''S, 27°51'43,98''W; 20°26'55,98''S, 47°52'46,86''W; 20°26'13,86''S, 47°53'26,49''W (Figura 4).



Figura 3. Pequenas Centrais Hidrelétricas (PCHs) localizadas no rio Sapucaí-Mirim, São Paulo. (a) PCH de Anhanguera. (b) PCH de Palmeiras.

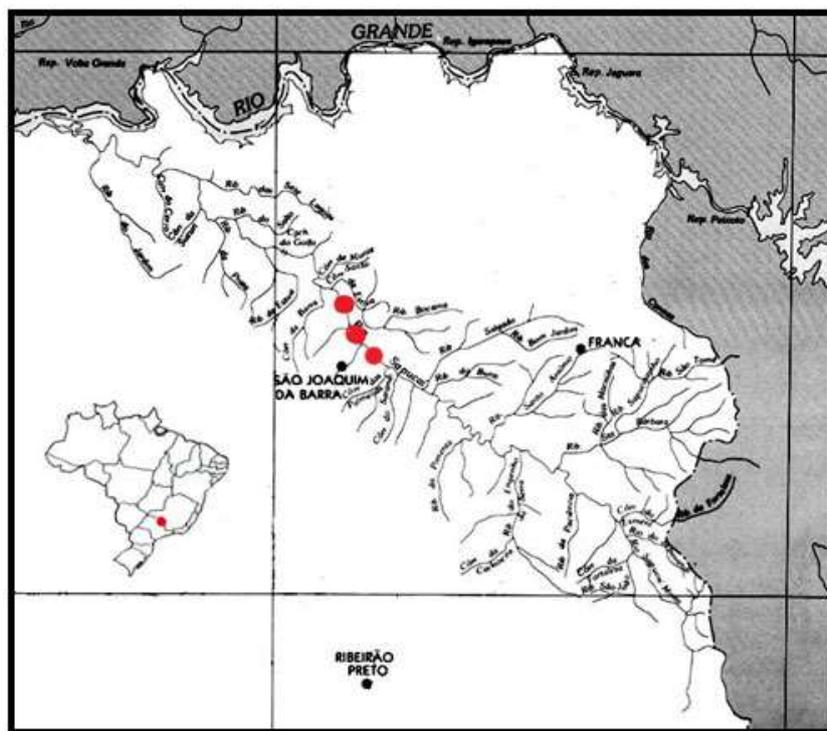


Figura 4. Localização do rio Sapucaí-Mirim, São Paulo, PCH de Anhanguera e PCH de Palmeiras.

Após a coleta os indivíduos foram levados para pisciculturas localizadas no estado de São Paulo, como piscicultura Projeto Peixe (município de Sales de Oliveira) e

Centro de Aquicultura da Unesp (Jaboticabal) (Figura 5). A manutenção destes indivíduos se torna importante para a composição de um banco de matrizes que foram selecionadas posteriormente de acordo com os níveis de diversidade genética e nível de parentamento dos indivíduos.



Figura 5. Instalações das pisciculturas onde os exemplares coletados foram mantidos. (a) e (b) Piscicultura Projeto Peixe (Sales de Oliveira, SP); (c) e (d) instalações do Centro de Aquicultura da Unesp (Caunesp-Jaboticabal, SP).

Os exemplares amostrados de populações naturais foram mantidos em pisciculturas, onde foram marcados com *tags* magnéticos, a fim de identifica-los para os posteriores cruzamentos. A seguir os peixes tiveram fragmentos de suas nadadeiras amostradas, conservadas em álcool 100% e levadas ao Laboratório de Genética de Peixes (LAGENPE), Bauru, SP, compondo um banco de tecidos para análises genético-moleculares. Assim foram utilizadas amostras de 27 indivíduos da espécie *L. elongatus*,

50 indivíduos de *L. friderici*, 50 indivíduos de *P. lineatus* e 52 indivíduos de *R. quelen*, provenientes do rio Sapucaí-Mirim, SP.

2.2 Métodos

2.2.1 Marcação dos exemplares

Para a montagem de estoques de reprodutores a partir de indivíduos pertencentes às quatro espécies (*L. elongatus*, *L. friderici*, *P. lineatus* e *R. quelen*), os exemplares foram identificados com *tags* magnéticas e mantidos vivos em tanques das pisciculturas Projeto Peixe e Caunesp, para futuros cruzamentos.

Os *tags* são pequenos bastonetes de metal magnetizados, que apresentam sistema de identificação semelhante ao código de barras, correntemente empregado para identificação de diversos produtos. O procedimento de marcação dos exemplares segue como descrito por Porto-Foresti (2001) (Figura 6). Primeiramente os animais são anestesiados em uma solução de 2g de anestésico (benzocaína) diluídos em 20 l de água, o *tag* é introduzido na região do lombar, próximo a nadadeira dorsal do animal, com auxílio de uma seringa injetora. Após a introdução do *tag* sempre que necessário este pode ser identificado com o auxílio de um equipamento, passando o equipamento de leitor sobre a região onde foi introduzido o *tag*, a leitura é feita diretamente no mostrador.

No caso da morte do animal ou na desativação do experimento, os *tags* podem ser recuperados para serem reutilizados após sua limpeza. Este procedimento é

realizado retirando-se o *tag* do animal, esterilizando-o em álcool 70% e colocando-o novamente na seringa injetora.



Figura 6. Identificação de exemplares utilizando marcadores magnéticos (*tags*). (a) Coleta de material para análises moleculares. (b) introdução de um pequeno *tag* na região dorsal do animal, perto da nadadeira, com o auxílio de uma seringa injetora que introduz otag na musculatura do animal. (c) Após a introdução do *tag* no animal, sempre que necessário este pode ser identificado com o auxílio de um equipamento leitor.

2.2.2 Extração e quantificação das amostras

A extração de DNA foi feita a partir de fragmentos de nadadeira caudal coletados dos indivíduos amostrados (Figura 5a), através do kit comercial “*Wizard Genomic DNA Purification kit-Promega*”. Uma pequena quantidade de tecido foi colocada em tubo de microcentrífuga, em seguida foram adicionados 300 μ l de *Nuclei Lysis Solution* e 2,5 μ l de *Proteinase K*, sendo as amostras incubadas por 2 horas a 60°C. Após esse período foram adicionados 2,5 μ l de *RNase*, sendo incubado no banho-maria a 37°C por 30 minutos. Posteriormente foram adicionados 200 μ l de *Protein Precipitation Solution* e levados ao gelo por 5 minutos. Seguiu-se uma etapa de centrifugação a 13.000 rpm por 4 minutos, retirando posteriormente o sobrenadante e transferindo-o para outro tubo com 600 μ l de isopropanol a temperatura ambiente. Uma nova centrifugação de 4 minutos a 13.000 rpm foi realizada, descartando novamente o sobrenadante após a

centrifugação. Foram adicionados 600 µl de etanol 70%. Os tubos foram centrifugados por 4 minutos a 13.000 rpm e o sobrenadante foi descartado, tomando cuidado para que o *pallet* do fundo não se desprendesse do fundo do tubo. O material foi secado em estufa a 37°C, por um período de 1 hora e após isso foram adicionados 35 µl da solução de *DNA Rehydration Solution*. O tubo permaneceu a temperatura ambiente por 24 horas.

Após essa etapa, o resultado da extração e purificação de DNA genômico foi quantificado através do espectrofotômetro *Nano Drop 1000* (Thermo SCIENTIFIC), que forneceu a concentração das amostras, bem como sua pureza.

A partir da amostragem e extração de DNA genômico foram aplicados marcadores moleculares do tipo microssatélite na população de cada espécie coletada, a fim de analisar a diversidade genética intrapopulacional de espécies de peixes onde há a construção de Pequenas Centrais Hidrelétricas (PCHs) e formar um banco de matrizes de reprodutores para futura prática de repovoamento.

2.2.3 Seleção dos loci microssatélites

Para o estudo da diversidade genética das espécies envolvidas, com a finalidade de propor cruzamentos adequados para a manutenção da diversidade genética, foram selecionados *primers* previamente descritos na literatura.

Foram pré-selecionados *primers* específicos para cada espécie de acordo com os sugeridos pela literatura para *L. elongatus* (MORELLI et al., 2007), *L. friderici* (MORELLI et al., 2007), *P. lineatus* (RUEDA et al., 2011) e *R. quelen* (ARRANZ et al., 2013).

Para a otimização desses *primers*, os protocolos de amplificação foram adaptados da literatura, sendo feitas modificações nas concentrações do DNA, dNTPs e nas temperaturas de anelamento.

2.2.3.1 Espécies *Leporinus elongatus* e *Leporinus friderici*

Os *loci* microssatélites empregados no presente trabalho para as espécies *L. elongatus* e *L. friderici*, foram descritos para a espécie *Leporinus macrocephalus* (MORELLI et al., 2007). O teste de transferabilidade desses *loci* também já havia sido descrito por Morelli para ambas as espécies.

Para a amplificação dos *loci* microssatélites foi empregada a técnica de “*Polymerase Chain Reaction*” (PCR), utilizando pares de *primer forward*(F) e *reverse* (R) (Tabela 1).

Tabela 1. Sequências dos *primers*, motivos de repetições, (*Na*) número de alelos, (*pb*) tamanho dos *loci* e (*Ta*) temperatura de anelamento dos *loci* microssatélite para *Leporinus elongatus* e *Leporinus friderici* (MORELLI et al., 2007).

<i>Locus</i>	Repetição	Sequência do Primer (5'-3')	<i>Na</i>	<i>pb</i>	<i>Ta</i> (°C)
Lmac 02	(TG) _n (AG) _n	F:5'ACTTCCTCCCTAATCTGTG 3' R:5'AGGGTGTAAGATGTATGAAG 3'	17	212-264	57
Lmac 03	(CA) _n	F:5' TGTATGTGGTGTGGCTGAAT 3' R:5' AAACAAAGTAGAAGTGAACG 3'	15	214-252	56
Lmac 04	(CT) _n (TT)(CT) _n	F:5' CTGTCACTCTGTCAACTTTT 3' R:5'TAAGGGAAAGCGGATACGGG 3'	08	248-272	64
Lmac 05	(CT) _n	F:5' CGTGTGCTTCTGTTTGTGTG 3' R:5'GGCTGAAGTATGAGAGGTAAG 3'	14	212-256	64
Lmac 06	(CA) _n	F:5'CTCTACTTCACTTTTACAGCAG 3' R:5'CCCGAGCCGCGTCACACTTC 3'	11	112-134	58
Lmac07	(TC) _n	F:5'GTGGGAACATTTGGGATTAT 3 R:5'CAGAAGAGAGGGCGAGAGGG 3'	05	140-150	58
Lmac 08	(TC) ₂₃	F:5' CCATTTCTGTCTTACCTTTG 3' R:5' CTTCGGGAGTTGACAGCACC 3'	08	148-168	55
Lmac 09	(AG) _n (GG) (AG) _n	F: 5' TAAACAAACGGTGGGCAGTG 3' R: 5' TATCTTCACTAATCAAACCTCC 3'	09	164-180	56

As ampliações dos *loci* microsatélites foram divididas em reações multiplex, utilizando várias combinações de *primers* na mesma reação (Lmac 04, Lmac 05, Lmac 06 e Lmac 07) e reação padrão, utilizando um par de *primer* por reação, (Lmac 02, Lmac 03, Lmac 08 e Lmac 09).

As reações realizadas em multiplex continham volume final de 15 µl contendo as seguintes concentrações, 1X Kit Qiagen-Promega, 2mM do *mix* de *primers*, 30 ng de DNA. As ampliações foram realizadas em termociclador *Matercyler Personal-Eppendorf*, seguindo condições de desnaturalização inicial a 95°C por 15 min, seguida de 30 ciclos que inclui desnaturalização a 94°C por 30s, etapa de hibridação a 58°C por 1min e 30 s, desnaturalização a 72°C por 1min e extensão final a 60°C a 30 min.

As reações realizadas em reação padrão apresentaram volume total de 15 µl contendo as seguintes concentrações 1X Buffer, 25 mM de MgCl₂, 2,0 mM de dNTPs, 50 µM de cada *primer*, 0,1U de *Taq*. As ampliações reações foram realizadas no termociclador *Matercyler Personal-Eppendorf*, seguindo basicamente as condições de desnaturação inicial de 95°C por 10 min, seguido de 35 ciclos que inclui uma etapa de desnaturalização a 94°C por 45 s, um período de hibridação a 58°C e uma desnaturalização a 72°C por 50 s e extensão final de 72°C por 10 minutos, para os *loci* feitos em reações padrão.

Uma vez conhecidas as características de cada *locus*, foram feitos sistemas de sequenciamento em conjunto, levando em consideração o tamanho (pb) para cada *locus*. Respeitando essas características cada *locus* o *primer reverse*[®] foi marcado na posição 5' com um dos seguintes fluorocromos: PET[™], FAM[™], NET[™] e VIC[™]. A

fluorescência para cada *primer* foi desenhada de forma que os *loci* de mesmo tamanho não compartilhassem o mesmo fluorocromo (Tabela 2).

Tabela 2. *Loci* microssatélite previamente selecionados para genotipar indivíduos pertencentes as espécies *Leporinus elongatus* e *Leporinus friderici*. Indica o conjunto no qual cada *locus* foi sequenciado, o tamanho de cada *locus* e o tipo de fluorocromo da posição 5' de cada *primer Reverse*.

<i>Primer</i>	Fluorocromo	pb	Multiplex	<i>Ta</i> (°C)
Lmac 06	NED	112-134	1	58°C
Lmac 07	VIC	140-150	1	58°C
Lmac 05	FAM	212-256	1	58°C
Lmac 04	PET	248-272	1	58°C
Lmac 08	FAM	148-168	2	58°C
Lmac 09	PET	164-180	2	58°C
Lmac 03	VIC	214-252	2	58°C
Lmac 02	NED	212-264	2	58°C

As amostras amplificadas foram genotipadas utilizando o sequenciador ABI 3730xl DNA Analyzer (*Applied Biosystems*) e analisados inicialmente no *software Gene Mapper* versão 4.0 (*Applied Biosystems*) e revisado manualmente para sua verificação.

2.2.3.2 Espécie *Prochilodus lineatus*

Os *loci* microssatélite aplicados na população da espécie *P. lineatus* foram descritos por Rueda et al. (2011) para a mesma espécie.

Para a amplificação dos *loci* microssatélites foi empregada a técnica de PCR, utilizando os *loci* descritos previamente para a espécie *P. lineatus*. Para a amplificação desses *loci* utilizou-se pares de *primer forward* (F) e *reverse* (R) (Tabela 3).

Tabela 3. Sequências dos primers, número de alelos (*Na*), tamanho dos alelos (*pb*), temperatura de anelamento (*Ta*), de sequências de microssatélites desenvolvidas para *Prochilodus lineatus* (RUEDA et al., 2011).

<i>Locus</i>	Repetição	Sequência do <i>Primer</i> (5'-3')	<i>Na</i>	<i>pb</i>	<i>Ta</i> (°C)
PI. 003	(CA) _n	F:5'CTGAGCTGTGAGGAATGGA 3' R:5'AGAGCGCTCAAGCACAAAGAT 3'	06	185-203	50
PI. 009	(CA) _n	F:5'CGAACATTCTGCTGGGTGTA 3' R:5'TCTCCAACCACTGGGAGAAC 3'	06	196-248	55
PI. 014	(CA) _n	F:5'TGCCCAACACTGAACTGAG 3' R:5'CTCATCAACCTGCCTGGAAT 3'	11	104-134	61
PI. 023	(CA) _n	F:5'TTGGCTACTTCCCAACAC 3' R:5'GGGGAAGTAGTTGACGATGC3'	03	244-252	59
PI. 025	(CA) _n	F:5'GAAGCTGGGCTCTTGACAT3' R:5'CGTTTGCCCTAGCCTTTTG 3'	05	104-112	59
PI. 028	(CA) _n	F:5'GAAGCTGGGCTCTTGACAT3 R:5'CGTTTGCCCTAGCCTTTTG 3'	03	239-249	59
PI. 034	(CA) _n	F:5GAGCGGATTCTCCACATGAT 3' R:5'TAATGTGCTCCCTCCACAG 3'	10	178-212	56
PI. 035	(CA) _n	F:5'TCTGAGTCCCTCCATGACAA 3' R:5'TGTGTGTGTGTGTGTGGTTTG 3'	10	116-164	52
PI. 064	(CA) _n	F:5'AGAGCAACACAGGGAGGAGT 3' R:5'ACGCTCTGCTCAGCCATACT 3'	13	158-180	62
PI. 119	(CA) _n	F:5'GAAAAAGGCTAGGGGACTGG 3' R:5'-GAGGAAAATTGCCTTTGTAGG 3'	12	161-207	58
PI. 139	(CA) _n	F:5'CAGTGGCATGATGATTAGATGG 3' R:5'CACCTTTTGTGGCTTTTAGG 3'	20	169-235	53
PI. 190	(CA) _n	F: 5'GCTTGGGAGCCTATTCATCC 3' R: 5'GGGTTTCTGCACCATACAGG 3'	22	197-227	62
PI. 216	(CA) _n	F: 5'GGT ACC CGG GAA GCT TGG 3' R: 5'GGGAAGCTTGGGATCTACC3'	05	198-268	52

As reações foram divididas em duas reações multiplex (PI.14, PI.64, PI.190 e PI.139 e PI.216) e uma reação padrão (PI.119, PI.34, PI.03 e PI.09).

Amplificações feitas em multiplex foram realizadas basicamente em um volume total de 15 µl Kit Qiagen-Promega 1X, 2mM do *mix* de *primers*, 30 ng de DNA. As amplificações foram realizadas no termociclador *Matercycler Personal*-Eppendorf, seguindo condições de desnaturalização inicial a 95°C por 15 min, seguida de 30 ciclos que inclui desnaturalização a 94°C por 30s, etapa de hibridação a 58°C por 1min e 30 s, desnaturalização a 72°C por 1min e extensão final a 60°C a 30 min.

As amplificações feitas em reações padrão foram realizadas basicamente em um volume total de 15 µl contendo as seguintes concentrações 1X Buffer, 2,0 mM de MgCl₂, 0,2 mM de dNTPs, 0,2µM de cada *primer*, 0,1U de *Taq*. Estas reações foram realizadas no termociclador *Mastercycler Personal*-Eppendorf. Seguindo as seguintes condições, desnaturalização inicial a 95°C por 10 min, seguida de 35 ciclos que inclui uma etapa de desnaturalização a 94°C por 45 s, um período de hibridação variando entre 52°C a 62°C e uma desnaturalização a 72°C por 50 s e extensão final de 72°C por 10 minutos, para os *loci* feitos em reações padrão.

Uma vez conhecidas as características de cada *locus*, foram feitas sistemas de sequenciamento em conjunto, levando em consideração o tamanho (*pb*) para cada *locus*. Respeitando essas características cada *locus* teve o *primer Reverse*(R) marcado na posição 5' com um dos seguintes fluorocromos: PETTM, FAMTM, NETTM e VICTM. A fluorescência para cada *primer* foi desenhada de forma que os *loci* de mesmo tamanho não compartilhassem o mesmo fluorocromo (Tabela 4).

Tabela 4. *Loci* microssatélites previamente selecionados para genotipar indivíduos pertencentes a espécie *Prochilodus lineatus*. Indica conjunto de sequenciamento na qual cada *locus* foi sequenciado, o tamanho de cada *locus* e o tipo de fluorocromo da posição 5' de cada *primer reverse*.

<i>Primer</i>	Fluorocromo	Multiplex	<i>Ta</i> (°C)
PI. 014	FAM	1	62
PI. 064	VIC	1	62
PI. 190	PET	1	62
PI. 119	NED	2	58
PI. 034	VIC	2	58
PI. 003	FAM	2	58
PI. 009	PET	2	55
PI. 139	FAM	3	52
PI. 216	NED	3	52

2.2.3.3 Espécie *Rhamdia quelen*

Na população pertencente a espécie *Rhamdia quelen*, foram utilizados *loci* microssatélites sugeridos para esta mesma espécie por Arranz et al. (2013).

Para a amplificação dos *loci* para a espécie *Rhamdia quelen* foi empregada a técnica de PCR. Para a amplificação desses *loci* utilizou-se pares de *primer forward* (F) e *reverse* (R) (Tabela 5).

Tabela 5. Sequências dos *primers*, motivos de repetições, (*Na*) número de alelos, (*pb*) tamanho e (*Ta*) temperatura de anelamento dos *loci* microssatélite para *Rhamdia quelen* (ARRANZ et al., 2013).

<i>Primer</i>	Repetição	Sequência	<i>Na</i>	<i>pb</i>	<i>Ta</i> (°C)
Rhq 07	(GT) _n	F: 5'CTGCGGGAAGGTCTCTGTC 3' R: 5' GTCTCCGGCTCCTGGTATC 3'	05	253-277	58
Rhq 08	(AC) _n	F: 5'AGTGCATGGATGGTCAATAGG 3' R: 5' TCGTGATTGGAGGTGAGATG 3'	04	243-253	58
Rhq 13	(CA) _n	F: 5'CCAGCTCCCAACAGTGAAAT 3' R: 5'CGTGGAGAGGGTTCGTATGT 3'	08	315-348	58
Rhq 15	(AC) _n	F: 5'AGTCTAATGTCTTAACCGCTGA 3' R: 5'CGGTATCCTCTTTGGTATGC 3'	10	134-179	54
Rhq 16	(AC) _n	F: 5'CGAGGAAGTGATGTTCTATTGT3' R: 5'ACACGGAGGATTGGTGATT 3'	12	299-239	58
Rhq 20	(AC) _n	F: 5'TCGTGAGCAATGTGGTTATGT 3' R: 5'GCCGCGAGATTAGTTTGTGT 3'	12	203-253	58
Rhq 26	(GCT) _n	F: 5'AACTACGCAGCCATTTACGG 3' R: 5'CGGTCGTGGGATGTCTATTC 3'	09	231-288	58
Rhq 28	(TATTA) _n	F: 5' CCTCAGTGGTGGTAAGAGCAG 3' R: 5'TCGAGCTTCCATGATACAAA 3'	08	165-210	58

As amplificações de todos os *loci* microssatélite foram realizados em reações padrão, seguindo as seguintes condições de concentração, 1X Buffer, 2,0 mM de MgCl₂, 0,2 mM de dNTPs, 0,2µM de cada *primer*, 0,1U de *Taq*. Estas reações foram realizadas no termociclador *Mastercycler Personal*-Eppendorf.

As reações de PCR foram feitas com uma desnaturalização a 95°C por 10 min, seguida de 35 ciclos que inclui uma etapa de desnaturalização a 94°C por 45 s, um

período de hibridação variou de 54°C a 58°C e uma desnaturalização a 72°C por 50 s e extensão final de 72°C por 10 minutos, para os *loci* feitos em reações padrão.

Uma vez conhecidas as características de cada *locus*, foram feitas sistemas de sequenciamento, levando em consideração a temperatura de anelamento e o tamanho (*pb*) para cada *locus*. Respeitando essas características cada *locus* teve o *primer Reverse* (R) marcado na posição 5' com um dos seguintes fluorocromos: PETTM, FAMTM, NETTM e VICTM. A fluorescência para cada *primer* foi desenhada de forma que os *loci* de mesmo tamanho não compartilhassem o mesmo fluorocromo (Tabela 6).

Tabela 6. *Loci* microssatélite previamente selecionados para genotipar indivíduos pertencentes a espécie *Rhamdia quelen*. Indica o conjunto de sequenciamento na qual cada *locus* foi lançado no ABI, o tamanho de cada *locus* e o tipo de fluorocromo da posição 5' de cada *primer reverse*.

<i>Primer</i>	Fluorocromo	Multiplex	<i>Ta</i> (°C)
Rhq 28	FAM	1	58
Rhq 20	PET	1	58
Rhq 07	VIC	1	58
Rhq 13	NED	1	58
Rhq 15	VIC	2	54
Rhq 26	FAM	2	58
Rhq 08	PET	2	58
Rhq 16	VIC	2	58

2.2.4 Análises genéticas intrapopulacional

Após a obtenção dos genótipos para cada *loci* de cada espécie, primeiramente foi verificada a presença de alelos nulos, exclusão alélica e problemas de nomeação alélica devido a *stuttering bands* utilizando o programa MICRO-CHECKER versão 2.2.3 (VAN OOSTERHOUT et al., 2004). Os níveis de diversidade para cada *locus* foram feitas baseadas no número de alelos por *locus* e total, heterozigosidade esperada (*He*) e observada (*Ho*) para cada espécie utilizando o programa CERVUS versão 3.0 (KALINOWSKI et al., 2007) disponível em <http://www.fieldgenetics.com>, e o programa

POP 100gene 1.1.02, disponível em <http://www.ensam.inra.fr/URLB/pop100gene>. Para a análise do desvio do Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) e do nível de endogamia intrapopulacional (F_{is}) foi utilizado o programa GENEPOP 3.3 (Raymond e Rousset, 1995).

Com o intuito de montar um banco de reprodutores, que permita representar a diversidade genética de populações naturais, foram feitas análises de parentesco dentro de cada população das quatro espécies utilizando o programa SPAGeDI versão 1.4 (HARDY; VAKEMANS, 2002) disponível na *website* <http://www.ulb.ac.be/sciences/lagev/spagedi.html>. Para medir o nível de parentesco entre os indivíduos foram empregados dois tipos de coeficientes de parentesco, descritos por Queller e Goodnight (1989) e Wang (2002).

Capítulo 1

**Conservação genética de espécies do gênero *Leporinus*
(CHARACIFORMES, ANOSTOMIDAE) do rio Sapucaí-Mirim (SP)**

Resumo

Espécies como *Leporinus friderici* e *Leporinus elongatus*, conhecidos popularmente como piau-três-pintas e piapara respectivamente, tem apresentado diminuição no número populacional. Isto se deve a grande importância na pesca comercial somado a alterações nos ambientes aquáticos, como os barramentos. Estas ações fragmentam o ambiente aquático interrompendo as migrações e delimitando áreas de reprodução, o que vem comprometendo a biodiversidade aquática. Por apresentarem importância na pesca e em programas de aquicultura, a redução populacional tem despertado a necessidade de investimentos em programas de repovoamentos. No entanto, esta prática se feita sem informações genéticas, podem levar a redução da variabilidade genética de populações naturais, comprometendo ainda mais a ictiofauna. Portanto o presente estudo teve por objetivo analisar estoques naturais de indivíduos pertencentes a espécie *L. elongatus* e *L. friderici* a fim de analisar a diversidade genética intrapopulacional e os níveis durante a fase de construção de Pequenas Centrais Hidrelétricas, utilizando *loci* microssatélites. Empregando marcadores microssatélites foi possível observar uma alta variabilidade genética em ambas as populações estudadas através de índices como heterozigosidade esperada e observada, número de alelos por *locus* e total e índice de fixação (F_{IS}).

Palavras-chave: Anostomidae, marcadores microssatélites, genética da conservação, endogamia.

Introdução

Os ecossistemas aquáticos são de grande importância por abrigar alta diversidade de organismos, entre eles os peixes, que são considerados o grupo mais diversificado dentre os vertebrados (NELSON et al., 2006), apresentando estratégias adaptativas para diversos *habitats* e diversos níveis tróficos. Porém, existem poucos programas de gestão para conservação de espécies de peixes continentais, isso também se deve ao restrito conhecimento destas espécies (COWX, 2002).

Mudanças nos rios para atender o crescimento populacional como, introdução de espécies, poluição, desmatamento de matas ciliares e fragmentação para construções de barragens tem afetado amplamente espécies de peixes continentais (HATANAKA et al., 2006; AGOSTINHO et al., 2007), dentre as espécies mais vulneráveis a estas alterações estão as espécies com hábitos migratórios, por estes movimentos estarem relacionados com não apenas necessidades reprodutivas, mas também necessidades tróficas, de crescimento corporal e muitas vezes para fugir de situações de estresse, como mudança na temperatura e baixa oxigenação (SCHLOSSER, 1995).

A família Anostomidae, Characiformes, representa um grupo de grande importância ao lado da família Prochilodontidae, amplamente distribuído pela região neotropical. Dentro deste grupo está o gênero *Leporinus*, considerado o mais diversificado desta família, as espécies *Leporinus friderici* e *Leporinus elongatus* são espécies bastante importantes na pesca comercial e de subsistência, estando entre as espécies que contribuem na pesca extrativista no Brasil (MPA, 2011), além de

representar um importante recurso na pesca esportiva e em programas de aquicultura. Ambas são espécies caracteristicamente migradoras (SANTOS e JEGU, 1996; SANTOS et al., 2000).

Populações de espécie pertencentes ao gênero *Leporinus* vêm sofrendo diminuição no tamanho populacional, especialmente a espécie *L. elongatus* (MARTINS et al., 2003). Espécies como estas, de hábitos migratórios, sofrem largamente com as alterações nos cursos d'água, pois além da barreira física, que impedem que essas espécies realizem a migração, são espécies de alto valor na pesca (AGOSTINHO et al., 2007).

Assim diversas ações vêm sendo tomadas a fim de minimizar estes impactos como construção de passagens de peixes, que se mostram ineficientes na maioria dos casos, sendo seletivas para algumas espécies (AGOSTINHO et al., 2007) e programas de repovoamento. Para a realização adequada de programas de repovoamento são necessárias informações ecológicas sobre a espécie utilizada, assim como informações genéticas, a fim de evitar a perda da variação genética de populações naturais, por meio da introdução de indivíduos altamente aparentados.

Para caracterização de diversidade genética intra e interpopulacional, assim como na estruturação de populações de peixes continentais com a finalidade de compreender estratégias reprodutivas (PEREIRA et al., 2009), estratégias conservacionistas ou filogeográficas (CHIARI e SODRÉ, 1999; LOPERA-BARRERO et al., 2008; HATANAKA et al., 2006; PEREIRA et al., 2009; LOPERA-BARRERO et al., 2010). Os marcadores microssatélites tem se mostrado eficientes, substituindo marcadores moleculares menos variáveis como RAPD, DNA mitocondrial, entre outros. Os

Microssatélites podem ser ferramentas bastante eficientes para estimar níveis de diversidade genética assim como o parentesco entre indivíduos de populações naturais, devido a sua codominância, alto grau de polimorfismo e estarem amplamente distribuídos no genoma dos eucariotos (CHISTIakov, 2006).

Assim o presente estudo teve como objetivo analisar os níveis de diversidade genética intrapopulacional em populações naturais provenientes do rio Sapucaí-Mirim, onde há recentemente construções de Pequenas Centrais Hidrelétricas (PCH Anhanguera, PCH Palmeiras e PCH Retiro), a fim de verificar o nível de diversidade, de populações pertencentes as espécies *Leporinus elongatus* e *Leporinus friderici*, durante a construção de barramentos, e montar estoques de reprodutores para práticas de repovoamento, a fim de evitar a perda da variação genética nas populações naturais e colaborar com estudos futuros na região.

Materiais e Métodos

Amostragem e extração de DNA

No presente estudo foram amostradas fragmentos de 27 indivíduos pertencentes a espécie *L. elongatus* (Piapara) e 50 de indivíduos pertencentes a espécies *L. Friderici* (piauí três pintas), ambas populações naturais provenientes do rio Sapucaí-Mirim, São Paulo. Os indivíduos amostrados foram identificados através de *tag* magnéticas, de acordo com a descrição de Foresti (2001), tiveram amostras de nadadeira retiradas e conservadas em álcool 100%, para as análises moleculares.

Todos os exemplares amostrados foram mantidos em tanques de pisciculturas do estado de São Paulo. Os tecidos provenientes de fragmentos de nadadeiras foram conservados e estocados no Laboratório de Genética de Peixes, Unesp, Campus Bauru, compondo um banco de tecidos utilizados para análises moleculares.

A extração de DNA foi feita baseada em kit comercial, “*Wizard Genomic Purification kit-Promega*”, os resultados da extração foram quantificados e tiveram sua pureza analisada através do espectrofotômetro NanoDrop 1000 (Thermo SCIENTIFIC). Todas as amostras tiveram sua concentração igualada a 30 ng.

Amplificação dos loci por PCR

Para as análises de diversidade genética e parentesco nas duas populações pertencentes ao gênero *Leporinus*, foram empregados oito *loci* microssatélites como proposto por Morelli et al. (2007). Para a amplificação destes *loci* foram feitos sistemas de amplificação de reações em multiplex, levando em conta características como temperatura de anelamento e tamanho dos *primers*. Desta forma, cada *locus* teve seu *primer* Reverse (R) marcado na posição 5' com um dos seguintes fluorocromos: PETTM, FAMTM, NETTM e VICTM. A fluorescência para cada *primer* foi desenhada de forma que os *loci* de mesmo tamanho não compartilhassem o mesmo fluorocromo.

As reações realizadas em multiplex foram feitas com volume final de 15 µl, contendo as seguintes concentrações *Kit* Qiagen Promega 1X, 2 mM *mix* de *primers*, 30 ng de DNA. Seguindo uma reação que consiste em uma desnaturalização inicial de 95°C por 15 min, seguida de 30 ciclos que inclui desnaturalização a 94°C por 30s, etapa

de hibridação variando entre 52°C a 62°C por 1min e 30 s, desnaturalização a 72°C por 1min e extensão final a 60°C a 30 min.

As amostras amplificadas foram genotipadas utilizando o sequenciador ABI 3730xl *DNA Analyzer* (*Applied Biosystems*) e analisados inicialmente no *software GeneMapper* versão 4.0 (*Applied Biosystems*) e revisado manualmente para sua verificação.

Seleção dos loci microssatélite

Para análise de diversidade genética foram empregados oito *loci* microssatélites conforme descrito na literatura por Morelli et al. (2007), estes *loci* foram desenvolvidos para a espécie *Leporinus macrocephalus*.

Na população pertencente a espécie *L. elongatus* foi possível padronizar sete dos oito *loci* testados. O *primer* Lmac 03 foi descartado devido a falta de êxito das reações de ampliações da maioria dos indivíduos para este *locus* e alto grau de inespecificidades nos indivíduos que tiveram êxito. Para a espécie *L. friderici* foi possível padronizar seis *loci* microssatélites em apenas 24 dos 50 indivíduos analisados, devido também ao alto grau de inespecificidades apresentadas pelos *loci* Lmac 03 e Lmac 05, dificultando tanto a leitura manual como automática através do programa *GeneMapper*.

Análise dos dados

Seguido da genotipagem dos *loci* microssatélites foi verificada a presença de alelos nulos, exclusão alélica e presença de *stuttering bands*, através do programa MICRO-CHECKER versão 2.2.3 (VAN OOSTERHOUT et al., 2004). Análises genéticas foram feitas a fim avaliar o nível de diversidade intrapopulacional e o grau de parentesco para as duas populações, através de programas estatísticos, como CERVUS versão 3.0 (KALINOWSKI et al., 2007) no qual foram estimados níveis de diversidade genética para cada *locus* através do número de alelos por *locus* e total, heterozigosidade esperada (H_E) e observada (H_O) para cada espécie. Foram feitas estimativas do desvio do equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) e cálculo do índice de fixação (F_{IS}), através do programa GENEPOP versão 3.3 (RAYMOND e ROUSSET, 1995).

Adicionalmente para a montagem de estoques de reprodutores, a fim de representar a diversidade genética presente na população natural de origem e maximizar a diversidade genética foram feitas análises de parentesco através do *software* SPAGeDI versão 1.4 (HARDY e VEKEMANS, 2002), adotando o coeficiente de parentesco descrito por Wang (2002).

Resultados e Discussão

Análises genéticas intrapopulacional

A diversidade genética é de grande importância para que as espécies consigam manter sua adaptabilidade em ambientes naturais. Esta adaptabilidade é medida pela proporção do *pool* gênico nas gerações seguintes, através da diversidade genética intra e interpopulacional (COSTA et al., 2008). Marcadores genéticos oferecem novas ferramentas para auxiliar na compreensão da ecologia, biologia e genética das espécies para propostas de manejos adequados em ações conservacionistas (FRAHKHAM, 1995; SELKOE e TOONEN, 2006).

Desta forma, no presente trabalho foram avaliados os níveis de diversidade genética em populações pertencentes a espécie *Leporinus elongatus* (Tabela 1) e *L. friderici* (Tabela 2).

A população pertencente a espécie *L. elongatus* apresentou variação de número de alelos de cinco (Lmac 05) a 20 (Lmac 02), com uma média de 12,29 alelos por *locus*. Já a espécie *L. friderici* apresentou números de alelos variando de dois (Lmac 04 e Lmac 07) a 11 (Lmac 08) e uma média de alelos por *locus* de 5,00. Das duas espécies, *L. elongatus* apresentou maior polimorfismo nos *loci* empregados. O mesmo foi observado para alguns *loci* no estudo de Morelli et al. (2007). Chiari e Sodré (1999) estudando também as duas espécies pertencentes ao gênero *Leporinus* através de isoenzimas, marcadores genéticos menos variáveis, puderam observar uma situa o oposta, tendo *L. friderici* com maior polimorfismo de *loci* e *L. elongatus* com menor polimorfismo. O número de alelos encontrados para a espécie *L. friderici* quando

comparados com a espécie *L. elongatus*, foi baixo, no entanto, ambas as espécies apresentaram valores próximos como descrito por outros autores, tanto para a espécie *L. elongatus* (VILAS et al., 2012) como o descritos para espécies de peixes continentais (DEWOODY e AVISE, 2000).

Níveis de heterozigidade revelaram-se altos para ambas as espécies. A espécie *L. elongatus* apresentou uma média de heterozigidade esperada (H_E) de 0,8170, variando de 0,5458 (Lmac 05) a 0,9469 (Lmac 02) e heterozigidade observada (H_O) uma média de 0,6666, que variou de 0,4444 (Lmac 05) a 0,9259 (Lmac 07). Valores da H_O observados no presente trabalho para esta espécie se mostram maiores do que foi observado por Ramos et al. (2012) no rio Paraná, utilizando os mesmo *loci* microsatélite adotado no presente trabalho ($H_O= 0,61$ a $0,73$), o que demonstra alta taxa de heterozigotos na população estudada.

Para a espécie *L. friderici* foram observados valores menores de heterozigidade, tendo a média de H_E variando 0,1941 de 0, 5408 (Lmac 06) a 0,7970 (Lmac 08) e uma média de H_O de 0,4166 variando de 0,1250 (Lmac 09) a 0,7083 (Lmac 02). Os valores de heterozigidade para esta espécie se mostraram baixos quando comparados com *L. elongatus* no presente trabalho, no entanto, quando comparado com o trabalho de Chiari e Sodré (1999) os valores se mostram superiores dos observados através de marcadores de isoenzimas, onde foi possível obter uma heterozigidade observada média de 0,109. Todavia, os valores observados tanto para *L. elongatus* como para *L. friderici* neste trabalho foram bastante próximos dos valores de heterozigidade média observada por DeWoody e Avise (2000).

Adicionalmente para o cálculo de diversidade genética das populações estudadas foram estimados valores para o índice de fixação (F_{IS}). Este índice reflete o nível de endogamia para os *loci* empregados. Valores positivos foram observados em seis dos sete *loci* adotados para *L. elongatus*, resultados semelhantes foram observados por Vilas et al. (2012) para esta mesma espécie. No entanto, a espécie *L. friderici* apresentou valores negativos para o F_{IS} em quatro dos seis microsatélites analisados. Desvios do equilíbrio de Hardy-Weinberg também foram calculados para as duas populações, onde apenas a população pertencente a *L. elongatus* apresentou desvio para dois dos sete *loci* analisados (Lmac 02 e Lmac 08).

Tabela 1. Diversidade alélica de sete *loci* microsatélites para *Leporinus elongatus*. N_a , número de alelos por *locus*; H_o , heterozigosidade observada; H_e , heterozigosidade esperada; F_{IS} , índice de fixação; P-value, teste do equilíbrio de Hardy-Weinberg (P -value <0,05; correção de Bonferroni $P \leq 0,0071$), *, *locus* com desvio do EHW.

	Lmac 02	Lmac 04	Lmac 05	Lmac 06	Lmac 07	Lmac 08	Lmac 09
N_a	20	11	05	12	10	17	11
H_o	0,5926	0,7407	0,4444	0,7778	0,9259	0,5556	0,6296
H_e	0,9469	0,8064	0,5458	0,7883	0,8330	0,9357	0,8630
Fis	0,3257	0,0926	0,0352	0,0282	-0,1070	0,3529	0,1751
P-value	0,0000*	0,1406	0,8739	0,0903	0,0560	0,0000*	0,0097

Tabela 2. Diversidade alélica de seis *loci* microsatélites para *Leporinus friderici*. N_a , número de alelos por *locus*; H_o , heterozigosidade observada; H_e , heterozigosidade esperada; F_{IS} , índice de fixação; P-value, teste do equilíbrio de Hardy-Weinberg (P -value <0,05; correção de Bonferroni $P \leq 0,0083$), *, *locus* com desvio do EHW.

	Lmac 02	Lmac 04	Lmac 06	Lmac 07	Lmac 08	Lmac 09
N_a	09	02	03	02	11	03
H_o	0,7083	0,5833	0,2083	0,3750	0,5000	0,1250
H_e	0,6995	0,5071	0,1941	0,4388	0,7970	0,4707
Fis	-0,1000	-0,1541	-0,0748	0,1481	0,0459	-0,0625
P-value	0,1018	0,6783	1,0000	0,6385	0,1572	1,0000

No presente estudo foram estimados também o número efetivo populacional (N_e), considerando a grande importância desta estimativa na biologia evolutiva e conservacionista (CHARLESWORTH, 2009; FRANKHAM, 2005). Para a espécie *L. elongatus* o número efetivo foi de 35,5 (P_{crit} 0,02) e a espécie *L. friderici* apresentou N_e com valor negativo de -36,2. Para a primeira espécie o valor estimado do N_e , é mais alto do que o número de indivíduos amostrados (N), no entanto, apresenta-se próximo ao N o que indica que a população pertencente a esta espécie não é muito grande e diversa, o que chama atenção para conservação desta espécie. Valores negativos para o N_e , como estimado para a espécie *L. friderici*, sugere um possível erro de amostragem possível nesta população devido ao baixo polimorfismo dos *loci* empregados.

A espécie *L. friderici* apesar de ter apresentado baixo polimorfismo nos *loci* utilizados, apresentou valores do índice de fixação na maioria negativos e baixos valores, o que indica baixo nível de endogamia nesta população, o que é confirmado pelo excesso de heterozigotos demonstrado pelos valores de heterozigosidade observada maiores do que a esperada. A espécie *L. elongatus* apresentou alto polimorfismo nos *loci* empregados. No entanto, os valores do F_{IS} mostraram-se positivos para a maioria dos *loci*, contudo valores apresentaram-se baixos, três *loci* apresentaram altos valores de F_{IS} (Lmac 02, Lmac 08 e Lmac 09). Estes valores observados pode ser justificado pelo desvio significativo do equilíbrio de Hardy-Weinberg (Lmac 02 e Lmac 09) e pela presença de alelos nulos (Lmac 02 e Lmac 08). Desvio do EHW foi observado em todos os *loci* adotados no estudo com esta mesma espécie por Vilas et al. (2012).

Os valores de diversidade genética encontrados para as duas populações são bastante consistentes dos descritos por outros trabalhos envolvendo gêneros pertencente a família Anostomidae (CHIARI e SODRÉ, 1999; CHIARI e SODRÉ, 2001; VILAS et al., 2012) e para espécies continentais (WARD et al., 1994; WOODY e AVISE, 2000).

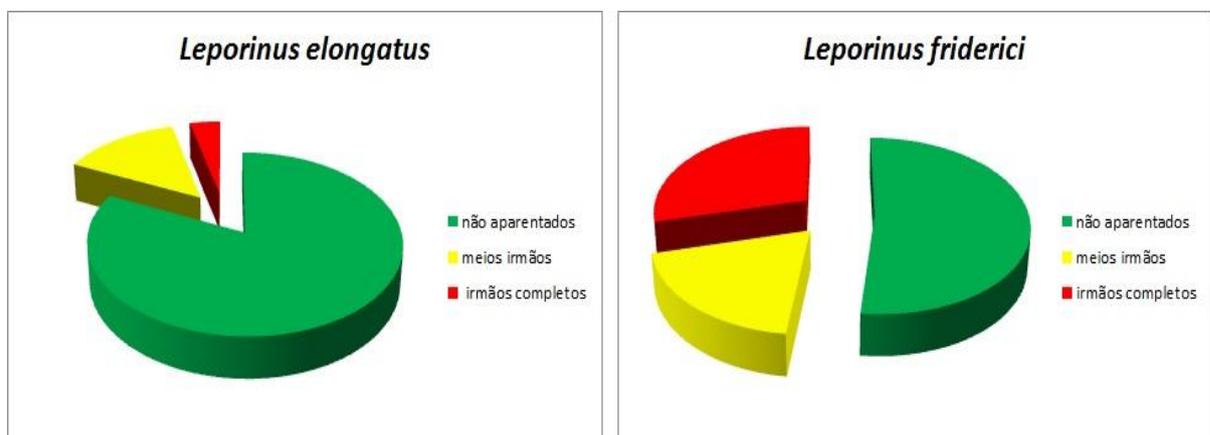
Apesar do alto nível de heterozigosidade da espécie *L. friderici*, demonstrada pelo valor da H_O ser maior do que da H_E . As análises de parentesco indicam uma grande porcentagem de indivíduos aparentados quando comparados com *Leporinus elongatus* e outras espécies pertencentes a ordem Characiformes (MENDONÇA et al., in prep.). Isto possivelmente se deve ao baixo polimorfismo observado nos *loci* analisados, por ter sido empregado de outra espécie (*Leporinus macrocephalus*) o que indica que mesmo apresentando baixo polimorfismo foi possível observar nesta espécie um alto nível de heterozigosidade e variação genética. Já os dados de diversidade genética avaliado para a espécie *L. elongatus* condizem com os dados demonstrados na análise de parentesco, indicando alta diversidade e pouca quantidade de indivíduos aparentados, o mesmo nível de diversidade genética foi observada no trabalho de Martins et al. (2003) para esta mesma espécie em populações naturais provenientes do rio Paraná.

O cálculo do número efetivo populacional (N_e), reforçou a necessidade de medidas conservacionistas para a espécie *L. elongatus*, já que esta apresentou um valor de N_e próximo ao do número de indivíduos amostrados e sugere que os estoques de reprodutores selecionados no presente estudo conseguem representar a diversidade genética presente na população natural. Já a espécie *L. friderici*

apresentou um número efetivo negativo, que revela erros na amostragem desta população, possivelmente relacionado com os *loci* microssatélites adotados no presente estudo.

Análise de parentesco

Além da importância de análises de diversidade genética para a montagem de matrizes de reprodutores, há a grande importância de estimativas do nível de parentesco das populações envolvidas. Assim, os indivíduos pertencentes a espécie *L. elongatus* foram classificados estatisticamente como, não aparentados (82,05 %), meios-irmãos (14,25%) e totalmente aparentados (3,70%). Da mesma forma os indivíduos pertencentes a espécie *L. friderici* tiveram o nível de parentesco estimado, sendo classificados estatisticamente como não aparentados (51,81%), meios-irmãos (19,20%) e totalmente irmãos (28,99%) (Gráfico 1). As planilhas com a representação



dos níveis de parentesco estão apresentadas em forma de apêndices (Apendice 1 e 2) indicando os indivíduos não aparentados, na cor verde, meios-irmãos, na cor amarela e totalmente irmão em vermelho.

Gráfico 1. Análise de parentesco das espécies *Leporinus elongatus* e *Leporinus friderici*, proporção do grau de parentesco entre os indivíduos.

A variação genética é demonstrada pelos níveis de diversidade genética intra e interpopulacional. E a manutenção desta variação é a base da plasticidade evolutiva de uma espécie em resposta a mudanças ambientais (CASTRO et al., 2008). Este fato chama a atenção para a escassez de estudos de monitoramento genéticos populacionais de espécies de peixes continentais. Sendo de grande importância estudos com avaliação inicial da diversidade genética em populações naturais em regiões afetadas pela construção de barramentos e seleção de estoques baseadas e informações genéticas de grande importância como diversidade genética, número efetivo e parentesco entre os indivíduos. Assim o presente trabalho vem a contribuir para futuros estudos na região, para monitoramento destas espécies. Além de propor um manejo adequado para estas populações, como práticas de repovoamento baseadas em informações de extrema importância para a manutenção do *pool* gênico e conseqüente flexibilidade adaptativa destes indivíduos, através da proposta e realização de cruzamentos dirigidos bem sucedidos em relação a manutenção da diversidade genética.

Capítulo 2

**Caracterização de estoques de peixe de valor comercial voltada
à prática de repovoamento no rio Sapucaí-Mirim (SP)**

Resumo

O rio Sapucaí-Mirim pertence a bacia do Alto rio Paraná, esta bacia caracteriza-se por apresentar riqueza de espécies, sendo que 39% das espécies descritas nesta bacia apresentam hábitos migratórios e são de grande importância comercial, como *Prochilodus lineatus*. Espécies como esta dependem de migrações para completar seu ciclo de vida, tendo sua população afetada pela construção de barramentos somada a intensa exploração através da pesca comercial e de subsistência. Informações iniciais a respeito de populações naturais e de grande importância na pesca em áreas impactadas pela construção de Pequenas Centrais Hidrelétricas são escassas. Com a finalidade de analisar a diversidade genética e formar estoques reprodutores para práticas de repovoamento foram empregados seis *loci* microsatélites em uma população pertencente a espécie *P. lineatus*. Os resultados revelaram altos níveis de variabilidade genética, apresentando média de 16,83 alelos por *locus* e 0,836 de H_E e a de 0,736 de H_O . Adicionalmente análises de parentesco revelaram uma relação intrapopulacional de não aparentados (83,29%), meio-irmãos (15,68%) e aparentados (1,03%). Esses valores mostram alta variabilidade intrapopulacional, o que contribui para a formação de estoques de reprodutores visando a manutenção da variação genética em programas de repovoamento.

Palavras-chave: espécies continentais, *Prochilodus lineatus*, marcadores microsatélites, genética de populações, conservação genética.

Introdução

A espécie *Prochilodus lineatus*, popularmente conhecido como curimatá, apresenta hábitos migratórios tanto para fins tróficos como reprodutivos, sendo uma espécie de grande importância econômica e ecológica (GODOY, 1975). Por apresentar a necessidade de realizar migrações longitudinais para completar seu ciclo de vida, populações pertencentes a esta espécie têm sido amplamente afetadas pela construção de Pequenas Centrais Hidrelétricas (PCHs) somado a intensa exploração pelo seu importante valor econômico (AGOSTINHO, 2007).

A fim de minimizar os impactos causados pela construção de reservatórios, diversas ações antrópicas vêm sendo realizadas, como construção de escadas de transposição de peixes e programas de repovoamento (SIROL e BRITO, 2006; AGOSTINHO et al., 2007).

Prática como a de repovoamento vem sendo bastante empregada, no entanto, é realizada sem conhecimento de informações científicas. Informações genéticas são de grande importância a fim de evitar redução no tamanho populacional decorrente ao cruzamento entre indivíduos aparentados, ocasionando perda da variabilidade genética (WANG, 2002; AGOSTINHO et al., 2007; LOPERA-BARRERO et al., 2007). Deste modo, o objetivo do presente trabalho foi utilizar marcadores microssatélites descritos previamente (RUEDA et al., 2011) na população natural da espécie *P. lineatus* a fim de verificar os níveis de diversidade intrapopulacional e parentesco, com intuito de conhecer as características genéticas desta população, reconhecendo os possíveis

impactos causados pelas construções de PCHs em populações naturais que também são afetadas pela pesca intensiva, formando assim estoques de reprodutores voltados a prática de repovoamento, visando minimizar a perda de variação genética e consequente perda do potencial adaptativo desta espécie.

Material e Métodos

Amostragem e extração do DNA

Fragmentos de nadadeira foram coletados de 50 indivíduos pertencentes a espécie *P. lineatus*, provenientes de populações naturais da região do rio Sapucaí-Mirim, São Paulo, onde há a construção de Pequenas Centrais Hidrelétricas (PCHs). Estes indivíduos foram identificados por *tag* magnéticas, conforme descrito por Porto-Foresti (2001), tendo amostras de suas nadadeiras retiradas e conservadas em álcool 100%, para as análises moleculares. Os peixes amostrados foram mantidos em tanques de pisciculturas do estado de São Paulo. Os tecidos originários de nadadeiras dos indivíduos amostrados foram conservados e estocados na coleção do Laboratório de Genética de Peixes (LAGENPE) da Universidade Estadual Paulista (Unesp), Bauru, formando bancos genéticos de tecidos.

A extração de DNA foi feita a partir do kit comercial “*Wizard Genomic Purification kit-Promega*”, os resultados foram analisados no espectrofotômetro NanoDrop 1000, a fim de verificar sua concentração bem como a pureza das amostras, todas tiveram sua concentração uniformizada a 30ng.

Amplificação dos loci por PCR

Foram empregados 13 *loci* microssatélites descritos na literatura por Rueda et al. (2011), desenvolvidos para a espécie *P. lineatus*. Para amplificação dos loci microssatélite foram feitos sistemas de amplificações em multiplex e *singleplex*, levando em conta características como temperatura de anelamento e o tamanho de cada *locus* (pb).

As reações realizadas em multiplex foram feitas com volume final de 15 µl, contendo as seguintes concentrações 1X Kit Qiagen Promega, 2 mM mix de *primers*, 30 ng de DNA. Seguindo uma reação que consiste em uma desnaturalização inicial de 95°C por 15 min, seguida de 30 ciclos que inclui desnaturalização a 94°C por 30s, etapa de hibridação variando entre 52°C a 62°C por 1min e 30 s, desnaturalização a 72°C por 1min e extensão final a 60°C a 30 min. As reações realizadas em *singleplex* foram feitas seguindo as seguintes condições 1X buffer, 2,0 mM de MgCl₂, 0,2 mM de dNTPs, 0,2 mM de cada *primer*, 0,1 U de *Taq* e 30ng de DNA, com volume final de 15 µl. Seguindo basicamente as condições de desnaturação inicial de 95°C por 10 min, seguido de 35 ciclos que inclui uma etapa de desnaturalização a 94°C por 45 s, um período de hibridação a 58°C e uma desnaturalização a 72°C por 50 s e extensão final de 72°C por 10 minutos.

Respeitando características como o tamanho (pb) de cada *locus*, cada um teve seu *primer Reverse* (R) marcado na posição 5' com um dos seguintes fluorocromos: PETTM, FAMTM, NETTM e VICTM. A fluorescência para cada *primer* foi desenhada de forma que os *loci* de mesmo tamanho não compartilhassem o mesmo fluorocromo.

As amostras amplificadas foram genotipadas utilizando o sequenciador ABI 3730xl *DNA Analyzer* (*Applied Biosystems*) e analisados inicialmente no *software GeneMapper* versão 4.0 (*Applied Biosystems*) e revisado manualmente para sua verificação.

Seleção dos loci microssatélite

Primers descritos previamente na literatura (RUEDA et al., 2011) foram utilizados com o intuito de verificar a diversidade genética de populações de espécies continentais como *P. lineatus*, propondo cruzamentos adequados para práticas de repovoamento. Dos 13 *primers* empregados, foi possível padronizar seis destes. O *primer* Pl.09 teve sucesso na amplificação, no entanto não mostrou um alto nível de polimorfismo para a população amostrada. Os *primers* Pl.23, Pl.25 e Pl.28 não apresentaram sucesso na amplificação para a maioria dos indivíduos, e os que tiveram sucesso na amplificação não foi possível observar polimorfismo. O Pl.216 não foi utilizado devido a presença de diversos picos inespecíficos, dificultando a leitura manual e automática.

Análise dos dados

Após a genotipagem dos alelos, foi verificada a presença de alelos nulos, exclusão alélica e presença de bandas de *stuttering*, através do programa *MICRO-CHECKER* versão 2.2.3 (VAN OOSTERHOUT et al., 2004). Os níveis de diversidade para cada *locus* foram estimados através do número de alelos por *locus* e total,

heterozigosidade esperada (H_E) e observada (H_O), usando o programa CERVUS versão 3.0 (KALINOWSKI et al., 2007). Análises do desvio de equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) e cálculo do índice de fixação (F_{IS}) foram estimados utilizando o programa GENEPOP versão 3.3 (RAYMOND e ROUSSET, 1995). Para a montagem do banco de reprodutores, com o intuito de representar a diversidade de populações selvagens, foram feitas análises de parentesco intrapopulacional utilizando o programa SPAGeDI versão 1.4 (HARDY e VEKEMANS, 2002), através do coeficiente de parentesco descrito por Wang (2000).

Resultados e discussão

Análise de diversidade genética

A diversidade genética intrapopulacional foi estimada, através do cálculo da heterozigosidade observada e esperada (H_E , H_O) e número de alelos total e por *locus* (Tabela 1).

Dos seis *loci* utilizados, todos são de repetições dinucleotídicas. Um total de 98 alelos (8-24 alelos por *locus*) foram detectados nesta população pertencente a espécie *P. lineatus*, apresentando uma média de 16,83 alelos por *locus*. Estes valores refletem níveis de variabilidade bastante altos quando comparado com trabalhos anteriores para a espécies do gênero, como *Prochilodus argenteus* e *Prochilodus costatus* (MELO et al., 2013), ou até mesmo quando comparado com número de alelos em estudos

prévios para a espécie *P. lineatus*, onde o número de alelos total foi de 48 (CARVALHO-COSTA et al., 2008). As espécies representantes deste gênero *Prochilodus* apresentam capacidade de realizar grandes migrações e ampla distribuição ao longo dos cursos dos rios da bacia do Alto rio Paraná, o que pode justificar este alto nível de variação genética. De acordo com Pinheiro et al. (1981), indivíduos pertencentes a espécie *P. argenteus* apresentam capacidade migratória de mais de 1.100 quilômetros rio acima em épocas de reprodução, enquanto que no rio Mogi-Guaçu (bacia do Alto rio Paraná) representantes de *P. lineatus* migram uma distância de 1.300 km (GODOY, 1975).

A heterozigosidade observada (H_O) e esperada (H_E) variou entre 0,400-0,900 e 0,543-0,953, respectivamente. A média da heterozigosidade esperada foi de 0,836 e a de heterozigosidade observada de 0,736. Estes dados refletem alta variabilidade genética intrapopulacional, semelhantes aos valores encontrados para espécies de peixes de águas continentais por DeWoody e Avise (2000). Outros trabalhos com espécies pertencentes a ordem dos Characiformes, como *Piaractus mesopotamicus* (pacu), obtiveram uma heterozigosidade observada média, bastante próxima da observada no presente trabalho (LOPERA-BARRERO et al., 2010). Para o cálculo do desvio do equilíbrio de Hardy-Weinberg foi empregada correção de Bonferroni, dos seis *loci* microssatélite utilizados um apresentou desvio do EHW. De acordo com Chevolot et al. (2006) desvios significativos são muito comuns quando marcadores do tipo microssatélite são empregados. A presença de alelos nulos ou *stuttering bands* podem ser responsáveis pela presença destes desvios.

Os valores do índice de fixação (F_{IS}), que podem ser interpretados como coeficientes de endogamia apresentaram valores positivos para todos os *loci*, estes

valores variaram de 0,0198 a 0,2659. Valores positivos para o F_{IS} podem indicar um déficit de heterozigotos na população. Dois *loci* (PI.03 e PI.139) apresentaram valores altos para o índice de fixação, sendo os mesmos onde foi observado desvio do EHW e presença de alelos nulos. Desvios significantes foram observados por HATANAKA et al. (2008), para *Prochilodus costatus*, de sete *loci*, três apresentaram desvio; empregando marcadores menos variáveis como RAPD, Melo et al. (2013), para *Prochilodus argenteus* e *P. costatus*, dos seis *loci* três apresentaram desvio, utilizando microssatélites.

Tabela 1. Diversidade alélica de seis *loci* microssatélites para *Prochilodus lineatus*. N_a , número de alelos por *locus*; H_o , heterozigosidade observada; H_e , heterozigosidade esperada; F_{IS} , índice de fixação; P-value, teste do equilíbrio de Hardy-Weinberg (P -value <0,05; correção de Bonferroni $P \leq 0,0083$), *, *locus* com desvio do EHW.

	PI. 03	PI. 14	PI. 34	PI. 64	PI. 139	PI. 190
N_a	08	18	14	19	24	15
H_o	0,4000	0,7600	0,7200	0,9000	0,8400	0,8000
H_e	0,5434	0,8612	0,8693	0,9360	0,9533	0,8531
F_{IS}	0,2659	0,0198	0,0708	0,0164	0,1199	0,0629
P-value	0,0000*	0,5444	0,4062	0,3533	0,0083	0,7073

Através do cálculo do número efetivo populacional (N_e) foi possível observar um alto valor, que indica que a população natural pertencente a *P. lineatus* apresenta tamanho grande, podendo evidenciar altos riscos de deterioração genética quando os indivíduos selecionados não são suficientes para representar a diversidade genética da população natural. No entanto, é notória a dificuldade de se estimar o N_e adotando métodos indiretos, por estes apresentarem erros muito altos, especialmente quando populações naturais e muito grandes são amostradas (WAPLES e DO, 2010). O presente estudo demonstra uma alta diversidade genética e baixo grau de parentesco entre os indivíduos dessa população, este fato pode ser possivelmente explicado pelos

diversos pontos de coletas em diferentes localidades do rio Sapucaí-Mirim, sendo, portanto o número de indivíduos selecionados suficientes para representar a variabilidade genética da população natural. FRANKLIN (1980) defende que o número mínimo para se evitar o endocruzamento é de 50 indivíduos, a mesma quantidade de indivíduos amostrada neste estudo.

Desta maneira, o emprego de marcadores do tipo microssatélite no presente trabalho se mostrou bastante útil para análises de diversidade genética em populações naturais de *P. lineatus*. Efeitos como *bottleneck* e deriva genética podem levar a redução ou perda da variabilidade genética. Estes efeitos podem ser causados por sistemas de cruzamentos inadequados ou mudanças no ambiente, reduzindo a capacidade dos organismos se adaptarem (FRANKHAM, 1995; WANG, 2002). Nenhuma evidencia destes efeitos foi observado no presente trabalho, o que é demonstrado pelos altos valores de diversidade genética. Assim como foi observado no trabalho de Gacez (2001), onde foram analisadas populações naturais de *P. lineatus*, afetadas por construções de reservatórios, na região do rio Grande.

Através da análise de parentesco intrapopulacional adotando o coeficiente descrito por Wang (2000), foi possível classificar estatisticamente os 50 indivíduos pertencentes a espécie *P. lineatus* como não aparentados (83,29%), meio-irmãos (15,68%) e totalmente aparentados (1,03%) (Gráfico 1). A partir desta análise foi possível formar panel de reprodutores baseado no nível de aparentamento dos indivíduos e levando em conta os índices de diversidade genética (apresentados no apêndice III).

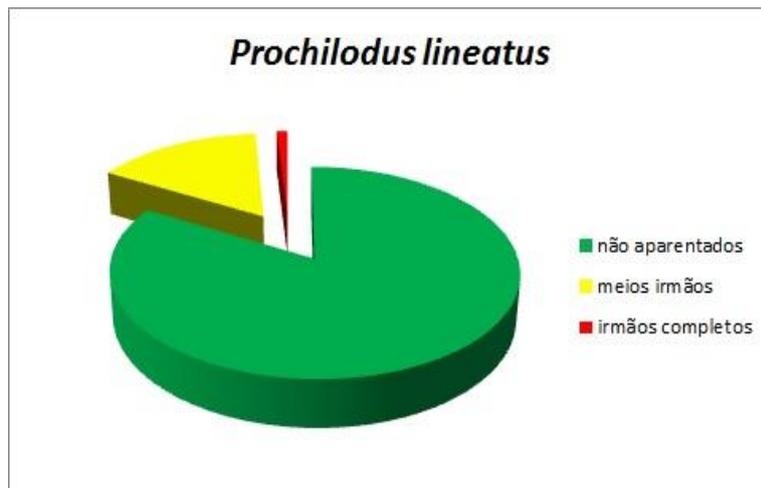


Gráfico1. Análise de parentesco da espécie *Prochilodus lineatus*, proporção do grau de parentesco entre os indivíduos.

O alto grau de variabilidade genética, corroborado através da análise de parentesco, onde não foi possível observar elevado grau de endocruzamento, pode ser explicado pela recente construção de barramentos na região do rio Sapucaí-Mirim, não sendo suficiente para reduzir o número populacional, aumentando consequentemente o nível de endocruzamento em populações da região. O elevado número de indivíduos não aparentados torna-se importante para montagem de estoques de reprodutores adequados voltados a prática de repovoamento, a fim de minimizar a perda do *pool* gênico. Tendo em vista que a perda da variação genética pode levar a perda do potencial adaptativo dos estoques, sendo essencial o monitoramento genético constante de estoques de repovoamento, com intuito de verificar qualquer mudança na estrutura genética com respeito a populações naturais.

Capítulo 3

**Diversidade genética em populações naturais de *Rhamdia
quelen* (SILURIFORMES, HEPTAPTERIDAE) no rio Sapucaí-Mirim
(SP)**

Resumo

Espécies de hábitos migratórios, como a espécie *Rhamdia quelen*, são amplamente afetadas pela fragmentação de ecossistemas aquáticos. Este fato somado a superexploração destes recursos pela pesca comercial tem levado a redução populacional dessas espécies. Com o objetivo de formar estoques de reprodutores, a fim de minimizar os impactos causados pela construção de Pequenas Centrais Hidrelétricas, foram empregados oito *loci* microsatélites em populações naturais de *R. quelen*. Os resultados das análises de diversidade genética revelaram alta variação intrapopulacional, demonstrada pela média de alelos por *locus* (9,25) e de H_o (0,5576) e H_E (0,6915). Adicionalmente através das análises de parentesco foi possível classificar os indivíduos desta população como não aparentados (76,39%), meio-irmão (19,46%) e irmãos completos (4,15%).

Palavras-chave: jundiá, microsatélites, estoques de reprodutores, conservação genética.

Introdução

O rio Paraná é um dos maiores rios brasileiros, formado pela junção de dois grandes rios como, rio Grande e Paranaíba. A bacia do rio Paraná corresponde a um terço do Alto rio Paraná, sendo considerada a bacia de maior riqueza de espécies de peixes do Brasil (BONETTO, 1996). Nesta bacia está localizado o rio Sapucaí-Mirim, tributário do rio Sapucaí, situado a noroeste do estado de São Paulo, compreendendo uma área de aproximadamente 9.166 km. O rio Sapucaí-Mirim não possui grandes centrais hidrelétricas, no entanto, Pequenas Centrais Hidrelétricas (PCHs) como a de Dourado, São Joaquim, Palmeiras, Anhanguera e Retiro estão distribuídas ao longo do rio (ALBERTIN e MAUAD, 2008).

Espécies migradoras devido aos seus hábitos, incluindo grande capacidade de deslocamento e conseqüente necessidade de utilização de diferentes *habitats*, são provavelmente os grupos mais vulneráveis com a construção de barramentos (CAROSFELD et al., 2003; ARTONI et al., 2003). Dentre estas espécies estão os indivíduos pertencentes a espécie *Rhamdia quelen* (Siluriformes, Heptapteridae), representantes desta espécie apresentam grande importância na pesca comercial e em programa de melhoramento voltados a prática de aquicultura (FERRARIS et al., 2007; OLIVEIRA et al., 2009).

Tendo em vista a importância da manutenção destas espécies na ictiofauna brasileira, práticas mitigadoras vêm sendo adotadas, como práticas de repovoamento e construção de escadas de transposição. No entanto essas práticas são adotadas de

maneira equivocada, sem respaldo científico adequado (AGOSTINHO et al., 2007), diminuindo drasticamente o tamanho populacional, devido a efeitos como deriva genética e endocruzamento (FHANKHAM, 1995). Deste modo, marcadores genéticos como aloenzimas, DNA mitocondrial, DNA nuclear são empregados a fim de estimar parâmetros de interesses genéticos e ecológicos como, taxas de migração, tamanho populacional, análises de parentesco, entre outras (SELKOE e TOONEN, 2006).

No entanto, estes marcadores menos variáveis vêm sendo substituídos pelos marcadores microssatélites. Devido ao seu alto grau de polimorfismo, característica codominante e por apresentar herança mendeliana, os microssatélites têm sido amplamente empregados atualmente em estudos populacionais e em análises de parentesco, se mostrando bastante eficientes. Sendo assim, o presente trabalho objetivou a estimativa dos níveis de diversidade genética intrapopulacional e endocruzamento, através de oito *loci* microssatélites descritos por AVARRE et al. (2013), a fim de formar estoques de reprodutores a partir de populações naturais pertencentes a *Rhamdia quelen*, para práticas de repovoamento na região de construção de duas PCHs, Anhanguera e Palmeiras, rio Sapucaí-Mirim, São Paulo.

Material e Métodos

Amostragem, extração e quantificação do DNA

Foram amostrados 51 espécimes pertencente a população natural de *Rhamdia quelen*. Os indivíduos coletados em parceria com Laboratório de Ecologia, Unesp-

Botucatu, no tributário Sapucaí-Mirim, foram identificados com *tag* magnéticas conforme descrito por Porto-Foresti (2001) e tiveram suas nadadeiras retiradas e conservadas em álcool 100% para as posteriores análises moleculares. Os peixes coletados e amostrados foram mantidos em pisciculturas no estado de São Paulo. Os tecidos provenientes de fragmentos de nadadeiras foram conservados e estocados no Laboratório de Genética de Peixes, Unesp, Campus Bauru, compondo um banco de tecidos utilizados para análises moleculares.

O DNA genômico foi obtido seguindo o kit comercial “*Wizard Genomic Purification kit-Promega*”. Os resultados tiveram sua pureza verificada, bem como sua concentração através dos espectrofotômetro NanoDrop 1000. Todas as amostras tiveram sua concentração igualada a 30ng.

Amplificação por PCR

Amplificações dos *loci* microssatélites foram realizadas em reações PCR padrão com concentração final de 15 µl, seguindo as seguintes condições 1X buffer, 2,0 mM de MgCl₂, 0,2 mM de dNTPs, 0,2 mM de cada *primer*, 0,1 U de *Taq* e 30ng de DNA. A reação de PCR foi feita adotando as condições de desnaturação inicial de 95°C por 10 min, seguido de 35 ciclos que inclui uma etapa de desnaturalização a 94°C por 45 s, um período de hibridação a 58°C e uma desnaturalização a 72°C por 50 s e extensão final de 72°C por 10 minutos.

Respeitando características como o tamanho (pb), cada *locus* teve seu *primer Reverse* (R) marcado na posição 5' com um dos seguintes fluorocromos: PET[™],

FAMTM, NETTM e VICTM. A fluorescência para cada *primer* foi desenhada de forma que os *loci* de mesmo tamanho não compartilhassem o mesmo fluorocromo.

As amostras amplificadas foram genotipadas utilizando o sequenciador ABI 3730xl *DNA Analyzer* (*Applied Biosystems*) e analisados inicialmente no *software* GeneMapper versão 4.0 (*Applied Biosystems*) e revisado manualmente para sua verificação.

Seleção dos loci microssatélite

Foram adotados oito *loci* microssatélite dos dez propostos na literatura (AVARRE et al., 2013) para a espécie *Rhamdia quelen*. Os *loci* microssatélites foram selecionados de acordo com o grau de polimorfismo. Dos oito pré-selecionados todos apresentaram êxito na amplificação.

Análise dos dados

A presença de alelos nulos, exclusão alélica e presença de bandas de *stuttering*, foi verificada através do programa MICRO-CHECKER versão 2.2.3 (VAN OOSTERHOUT et al., 2004). Os níveis de diversidade para cada *locus* foram estimados através do número de alelos por *locus* e total, heterozigosidade esperada (H_E) e observada (H_O), utilizando o programa CERVUS versão 3.0 (KALINOWSKI et al., 2007). Análises do desvio de equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) e cálculo do índice de fixação (F_{IS}) foram estimados utilizando o programa GENEPOP versão 3.3 (RAYMOND e ROUSSET,

1995). Para a montagem do banco de reprodutores, com o intuito de representar a diversidade de populações selvagens, foram feitas análises de parentesco intrapopulacional utilizando o programa SPAGeDI versão 1.4 (HARDY e VEKEMANS, 2002), através do coeficiente de parentesco descrito por Wang (2002).

Resultados e Discussão

Diversidade genética intrapopulacional

Marcadores do tipo microssatélite permitiram verificar a presença de uma alta variabilidade para a população de *R. quelen* analisada neste trabalho (Tabela 1). O número de alelos por *locus* variou de três (Rhq.07) a 21 (Rhq.20), apresentando um total de 74 alelos e uma média de 9,25 alelos por *locus*. Estes valores foram superiores ou similares aos encontrados por outros autores para outras espécies pertencentes a ordem dos Siluriformes, como *Pseudoplatystoma corruscans*, como Abreu et al. (2009), onde a média de alelos por *locus* foi de 7,28, tendo 51 alelos totais em espécie pertencente a ordem dos Siluriformes (*Pseudoplatystoma corruscans*) e Pereira et al. (2009) que observou para esta mesma espécie observou uma média alta de alelos (15,28), no entanto não muito diferente do observado no presente estudo que apresentou valores condizentes do descrito para espécies de peixes continentais (WARD et al., 1992; DEDE WOODY e AVISE, 2000).

Os valores de heterozigosidade observada e esperada variaram de 0,21 a 0,90 e 0,25 a 0,90, respectivamente. A média das heterozigosidades foi igual a 0,6915 (H_E) e

0,5576 (H_o). No trabalho de DeDE WOODY e AVISE (2000) foi estimado o número médio de heterozigosidade para peixes de águas continentais de 0,46, mostrando um alto nível de heterozigosidade na população estudada.

Para verificar desvio de equilíbrio de Hardy-Weinberg, foi feito teste utilizando a correção de Bonferroni, dos oito *loci* analisados 50% apresentaram desvio significativo ($P \leq 0,00625$). Foram observados valores significativos do desvio do EHW em quatro dos oito *loci* microsatélites utilizados. Outros estudos empregando marcadores microsatélites mostram que a presença do desvio do EHW é bastante comum para este marcador molecular (CHEVOLOT et al., 2006). Há diversas causas que podem levar ao desvio significativo, como ocorrência de alelos nulos, *stuttering bands* ou *drop-out*, efeito Wahlund, endocruzamento e alta diversidade alélica (SELKOE e TOONEN, 2006; DAKIN e AVISE, 2004). No presente trabalho a presença de desvios do EHW nos quatro *loci* (R_{hq}.08, R_{hq}.15, R_{hq}.20 e R_{hq}.26) possivelmente não se deve a endocruzamento, mas sim devido a presença de alelos nulos identificadas através do programa MICRO-CHECKER nestes mesmos *loci*. Segundo diversos autores a presença de alelos nulos é muito comum quando microsatélites são adotados (ALAM e ISLAM, 2005; CARRERAS-CARBONELL et al., 2006; CHEVOLOT et al., 2006) existem diversas causas para ocorrência deste efeito, como problemas de anelamento dos *primers*, devido a divergência de nucleotídeos, amplificação diferencial relacionada a variação de tamanhos dos alelos, alelos menores amplificam melhor do que os de maior tamanho (WATTIER et al., 1998, DAKIN e AVISE, 2004).

Através do cálculo do índice de fixação (F_{IS}) foi possível observar dois *locus* com valores negativos, indicando um alto índice de heterozigotos na população. Dos oito

loci microssatélites seis apresentaram valores positivos para o F_{IS} . Em outros estudos, para *Pseudoplatystoma corruscans*, foram observados quatro *loci* com valores positivos para o F_{IS} , de sete *loci* analisados. Valores positivos para o índice de fixação foram encontrados para 75% dos *loci* analisados, o que demonstra déficit de heterozigotos. No entanto, estes valores se apresentaram baixos, diferentemente dos *loci* onde foi observado desvio significativo do EHW (Rhq.08, Rhq.15, Rhq.20 e Rhq.26). Nestes *loci* onde o desvio do EHW se mostrou significativo foram observados valores para o F_{IS} além de positivos valores altos.

Adicionalmente as análises de diversidade genética e parentesco, foi estimado o N_e para os indivíduos desta população, tendo em vista a grande importância desta estimativa na área da conservação genética, já que podem indicar a ocorrência de efeitos como *bottleneck*, deriva genética e mutação.. O valor do N_e estimado para esta população revela que a população natural de onde os indivíduos foram amostrados apresenta um tamanho médio, quando comparado com N_e estimados para peixes de água continental (DEWOODY e AVISE, 2000), não indicando nenhum efeito de deriva genética na população.

Tabela 1. Diversidade alélica de oito *loci* microssatélites para *Rhamdia quelen*. N_a , número de alelos por *locus*; H_o , heterozigosidade observada; H_e , heterozigosidade esperada; F_{IS} , índice de fixação; P-value, teste do equilíbrio de Hardy-Weinberg (P-value <0,05; correção de Bonferroni $P \leq 0,0062$), *, *locus* com desvio do EHW.

	Rhq. 07	Rhq. 08	Rhq. 13	Rhq. 15	Rhq. 16	Rhq.20	Rhq.26	Rhq. 28
N_a	03	04	09	07	11	21	07	12
H_o	0,2115	0,2500	0,4808	0,5962	0,8654	0,6538	0,5000	0,9038
H_e	0,2541	0,4683	0,6486	0,7640	0,8114	0,9040	0,7924	0,8889
F_{IS}	0.1689	0.3456	0.0405	0.2214	-0.0672	0.1913	0.3124	-0.0170
P-value	0.3811	0.0000*	0.6173	0.0000*	0.1432	0.0021*	0.0014*	0.2198

Análise de parentesco

Adicionalmente, com intuito de formar estoques de reprodutores, além das análises de diversidade genética intrapopulacional foram feitas análises de parentesco, para verificar o consequente nível de endocruzamento nesta população. Deste modo foi possível agrupar os 51 indivíduos amostrados, como não aparentados (76,39%), meio-irmãos (19,46%) e irmãos-completos (4,15%) (Gráfico 1). Estes resultados estão organizados em planilhas anexadas no apêndice IV, coloridas de forma a identificar a classificação feita em relação ao grau de parentesco, sendo não aparentados (verde), meio-irmão (amarelo) e irmãos-completos (vermelho).

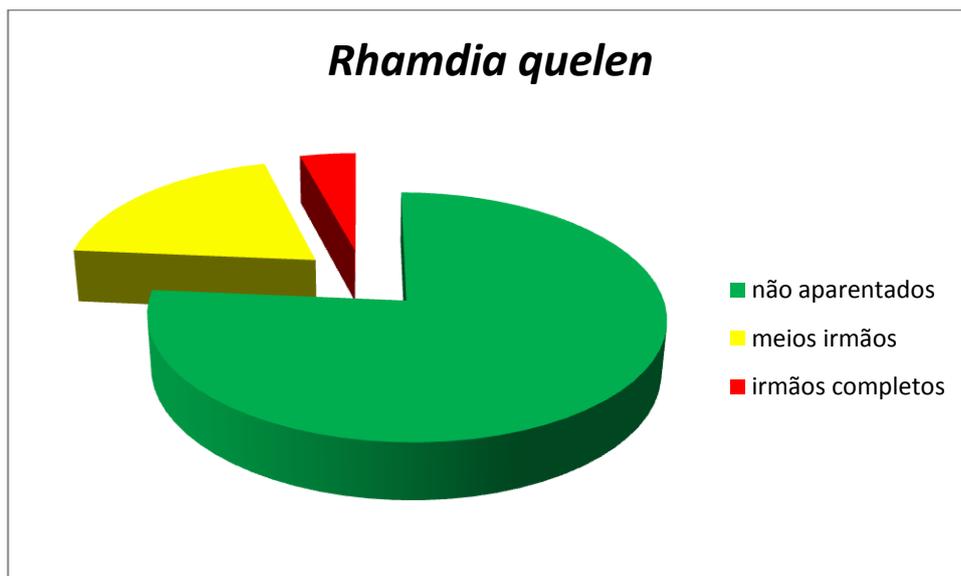


Gráfico 1. Análise de parentesco da espécie *Rhamdia quelen*, proporção do grau de parentesco entre os indivíduos.

Marcadores genéticos como microssatélites, podem ser utilizados para estimar parâmetros tanto de interesse genéticos quanto ecológicos, como taxa de migração, tamanho populacional, efeitos como bottleneck, análises de parentesco (SELKOE e

TOONEN, 2006). Tendo em vista que populações com alto nível de heterozigosidade e baixo nível de parentamento conseguem manter a variação genética da população, o estoque selecionado no presente estudo demonstra representar a variabilidade genética em suas proles. Tendo assim um manejo adequado baseado em informações genéticas importantes para que a maioria dos indivíduos quando soltos na natureza consigam responder negativamente a seleção natural, causada por mudanças ambientais, mantendo a variação presente na população natural ao longo dos anos.

Considerando também a escassez de estudos genéticos populacionais em espécies pertencentes a família Heptapteridae e a importância do monitoramento destas em regiões impactadas pela construção de barramentos, os resultados deste trabalho disponibilizam dados importantes a respeito da diversidade genética, podendo também colaborar com informações para futuros estudos de populações naturais e cultivadas de espécies de bagres tropicais.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Ecosistemas aquáticos continentais vêm sofrendo intervenções humanas nos últimos anos e muitas espécies de peixes estão ameaçadas, raras ou em risco de extinção. No Brasil, há um grande déficit de informações a respeito da ictiofauna neotropical. A falta de estudos relativos a esta fauna, somado a intervenções nos ecossistemas de águas continentais compromete a perpetuação de todas as espécies, inclusive as que ainda não foram descritas (COWX, 2002; AGOSTINHO et al., 2007).

Desta forma práticas de conservação de espécies de peixes tem chamado a atenção, principalmente devido a importância comercial de muitas destas espécies. Em práticas de conservação, a fim de minimizar os impactos causados por interferências antrópicas, diversas ações são de grande importância e devem ser levadas em conta, como levantamentos geográficos das espécies de peixes, revisando o *status* das espécies ameaçadas, fazer levantamentos a respeito da biologia destas espécies, com intuito de promover o manejo, sendo necessária uma imagem clara da estruturação desta espécie, utilizar informações genéticas na conservação e métodos de manejo adequados para cada tipo de interferência, como uso de cruzamentos de espécies ameaçadas, em cativeiro para formação de estoque e fiscalização (COWX, 2002).

Na formação de estoques de reprodutores, a diferenciação genética desde as populações originais naturais podem ser desenvolvidas rapidamente, devido aos extremos níveis de deriva e efeito gargalo, gerado pelo baixo número de peixes adotados como reprodutores, ou utilização de indivíduos aparentados. Estudos

moleculares têm se mostrados eficientes para identificar as possíveis razões da perda da variabilidade genética de populações provenientes de estoques. O principal efeito identificado como causador deste processo é o efeito *bottleneck* (LOPERA-BARRERO et al., 2010). Assim, informações genéticas obtidas através de estudos moleculares podem ser utilizadas para identificar quais espécies estão mais ameaçadas e quais são mais adequadas para se empregar em programas de repovoamento.

Tecnologias genômicas têm permitido o crescimento de investigações detalhadas de diversidade genética, estrutura populacional, migração e introgressão. Recentemente marcadores moleculares como isoenzimas ou DNA mitocondrial foram substituídos por marcadores mais variáveis como os microssatélites, estes por apresentarem codominância, alto grau de polimorfismo, baixo custo e alta reprodutibilidade, estão entre os mais empregados atualmente para o estudo de genética de populações.

Marcadores microssatélites permitiram, no presente estudo, avaliar o grau de diversidade genética de populações pertencentes a espécies migradoras como *Leporinus friderici*, *Leporinus elongatus*, *Prochilodus lineatus* e *Rhamdia quelen*. Estudos prévios durante a construção de barramentos, como o caso deste estudo, são importantes para entender os impactos causados nestas populações através da análise de diversidade genética intrapopulacional, tendo em vista que no Brasil são escassos trabalhos de monitoramento a fim de verificar a real consequência da construção de reservatórios, ou a eficiência de programas de repovoamento ou até mesmo de passagens de peixes (AGOSTINHO et al., 2007).

As populações estudadas em geral apresentaram alta diversidade genética intrapopulacional revelada pela estimativa de índices como heterozigosidade esperada e observada, número de alelos e índice de fixação. Mostrando um bom nível de heterozigotos nas populações amostradas.

Complementando as análises de diversidade genética foram feitas análises de parentesco, que mostraram baixo nível de aparentamento entre os indivíduos destas populações. Espécies, como o caso de *L. friderici*, apresentaram maior grau de parentesco quando comparado com as outras espécies aqui estudadas, isto possivelmente se deve ao baixo polimorfismo apresentados pelos *loci* microssatélites, não representando um real endocruzamento na população, que foi confirmado pelos altos valores de heterozigotos indicados através dos índices de heterozigosidade e pelo índice de fixação, que se mostraram em sua maioria valores negativos. Este fato mostra a necessidade da combinação dessas análises para formar estoques de reprodutores adequados, tendo em vista que análises de parentesco não levam em consideração os níveis de diversidade genética.

Através da estimativa do número efetivo populacional foi possível observar que a espécie *P. lineatus* apresenta uma população de tamanho elevado no ambiente natural, sendo mais difícil a perda da variabilidade genética nesta em populações desta espécie, por esta também se apresentar amplamente distribuída pelo rio Sapucaí-Mirim e pelos rios da bacia do Alto Paraná. No entanto, a espécie *L. elongatus* apresentou N_e bastante próximo do número de indivíduos amostrados, o que sugere que populações desta espécie podem estar sofrendo uma redução, alertando para necessidade de estudos conservacionistas referentes a esta espécie, uma vez que já há

relatos de redução de captura desta espécie na bacia do rio Paraná e Alto Paraná (MARTINS et al., 2003). A espécie *R. quelen* apresentou um número efetivo médio, o que mostra que indivíduos desta espécies não apresentam grandes riscos de perda da variabilidade genética. E por fim a espécie *L. friderici* apresentou valor de N_e negativo, o que demonstra um possível erro de amostragem dos indivíduos, dando importância para a necessidade de emprego ou desenvolvimento de *loci* microssatélites para esta espécie.

Desta forma, marcadores microssatélites adotados no presente trabalho para espécies como *L. elongatus*, *L. friderici*, *P. lineatus* e *R. quelen* se mostraram eficientes para a análise genética destas populações a fim de verificar os níveis de diversidade intrapopulacional e grau de parentesco, com intuito de conhecer as características genéticas desta população. Assim, reconhecendo os possíveis impactos causados pelas construções de PCH, poderemos propor o manejo adequado para conservação da variação genética, através da seleção de matrizes de reprodutores que serão utilizadas para práticas de repovoamento.

Em práticas de conservação da diversidade, para a realização de monitoramentos posteriores, torna-se de extrema importância o conhecimento prévio das características genéticas de populações naturais, como realizado no presente trabalho, a fim de reconhecer os problemas gerados pela modificação dos ambientes aquáticos na diversidade genética de populações naturais e fornecer base para estudos e monitoramentos posteriores. Como perspectiva do presente estudo tem se o monitoramento dos indivíduos liberados na natureza a fim de verificar a viabilidade dos estudos realizados no presente e a constante renovação dos estoques de

reprodutores, com base em estudos genéticos, a fim de manter a diversidade do *pool* gênico presente em populações naturais.

5 REFERÊNCIAS

- ABREU, M. M.; PEREIRA, L. H. G.; VILA, V. B.; FORESTI, F.; OLIVEIRA, C. Genetic variability of two populations of *Pseudoplatystma reticulatum* from the Upper Paraguay River basin. *Genetics and Molecular Ecology*, v. 32, n. 4, p. 868-873, 2009.
- AGÊNCIA NACIONAL DE ENERGIA ELÉTRICA: ANEEL – disponível em www.aneel.gov.br.
- AGOSTINHO, A. A.; GOMES, L. C.; PELICICE, F. M. Ecologia e manejo de recursos pesqueiros em reservatórios do Brasil. Maringá: EDUEM, Maringá, cap. 6, p. 227-381, 2007.
- AGOSTINHO, A. A.; THOMAZ S. M.; GOMES, L. C. Conservation of the Biodiversity of Brazil's Inland Waters. *Conservation Biology*, Malden, v. 19, n. 3, p. 646-652, 2005.
- ALAM, M. S.; ISLAM, M. S. Population genetic structure of Catlacatla (Hamilton) revealed by microsatellite DNA marker. *Aquaculture*, London, v. 246, p. 151-160, 2005.
- ALBERTIN, L.; MAUAD, F. Utilização de simulação computacional no gerenciamento integrado da água na bacia do Sapucaí-Grande no estado de São Paulo. *Minerva*, São Carlos, v. 3, n. 2, p. 215-222, 2008.
- ALLENDORF, E. W.; RYMAN, N. Genetic and management of hatchery stocks. University of Washington Press, Seattle and London, p. 141-159, 1987.
- ALVES, C. B. M.; VIEIRA, F.; MAGALHÃES, A. L. B.; BRITO, M. F. G. Impacts of non-native fish species in Minas Gerais, Brazil: present situation and prospects. *Ecological and Genetic Implications of Aquaculture Activities*, Dordrecht, p. 548, 2007.
- ARTONI, R. F.; MATIELLO, M. C. A. Genética de peixes Neotropicais. Aspectos da conservação genética dos peixes no Parque Estadual de Vila Velha, Paraná, Brasil. *UEPG Ciências Biológicas da Saúde*, Ponta Grossa, v. 9, n. 2, p. 7-15, 2003.
- AVARRE, J., BALASUNDARAM, C., BOUZA, C., CALCATERRA, N. B., CEZILLY, F., CHEN, S., CILOV, M. V. Permanent Genetic Resources added to Molecular Ecology Resources Database 1 December 2012 – 31 January 2013, (January), p. 46–549, 2013.
- BARROSO, R. M.; 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, Bryconiae) using microsatellites. *Aquaculture*, v. 247, p. 51-65, 2005.
- BARROSO, R. M.; HILSDORF, W. S.; MOREIRA, L. M.; MELLO, A. M.; GUIMARÃES, S. E. F.; CABELLO, P. H.; TRAUB-CSEKO M. Identification and characterization of microsatellite loci in *Brycon opalinus* (Cuvier, 1819) (Characiforme, Characidae, Bryconiae). *Molecular Ecology Notes*, Reino Unido, v. 3, p. 297-298, 2003.

- BEAUMONT, A. R.; HOARE, K. Biotechnology and genetics in fisheries and aquaculture. *Blackwell Science*, p. 1-193, 2003.
- BOLLOUX, F.; LUGON-MOULIN, N. The estimation of population differentiation with microsatellite markers. *Molecular Ecology*, Reino Unido v. 11, n. 2, p. 155-165, 2002.
- BONETTO, A. A.; CORDIVIOLA DE YUAN, E.; PIGNALBERI, C. Nuevos datos sobre poblaciones de peces em ambientes lenticos permanentes del Paraná Medio. *Physis*, Rio de Janeiro, v. 30, p. 141-154, 1970.
- BRASIL. MMA-Ministério do Meio Ambiente. Lista Nacional das espécies de invertebrados aquáticos e peixes ameaçadas de extinção. Diário Oficial da União, seção 1, p. 136-142, 2004.
- BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Instrução Normativa nº 005, de 21 de maio de 2004. En prensa.
- BRISCOE, D. A.; MALPICA, J. M.; ROBERTSON, A.; SMITH, G. J.; FRANKHAM, R.; BANKS, R. G.; BARKER, J. S. F. Rapid loss of genetic variation in large captive populations of *Drosophila* flies: implications for the genetic management of captive populations. *Conservation Biology*, v. 6, p. 416-425, 1992.
- BUCKUP, P. A.; MENEZES, N. A; GHAZZI, M. S. (eds.) Catálogo dos peixes marinhos e de água doce do Brasil. Série livros 23. Museu Nacional. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2007.
- CALCAGNOTTO, D.; DESALLE, R. Population genetic structuring in pacu (*Piaractus mesopotamicus*) across the Paraná-Paraguay basin: evidence from microsatellites. *Neotropical Ichthyology*, Porto Alegre, v. 10, n. 4, p. 607-616, 2009.
- CAROSFELD, J.; HARVEY, B.; ROSS, C.; BAER, A. Migratory fishes of South America. World Fisheries Trust/ The World Bank/ International Development Research Centre, Ottawa, 2003.
- CARRERAS-CARBONELL, J.; MACPHERSON, E.; PASCUAL, M. Isolation and characterization of microsatellite loci in *Tripterygion delaisi*. *Molecular Ecology Notes*, v. 4, p. 438-439.
- CARVALHO-COSTA, L. F.; HATANAKA, T., GALETTI, P. M. Evidence of lack of population substructuring in the Brazilian freshwater fish *Prochilodus costatus*. *Genetics and Molecular Biology*, Reino Unido, v. 31, n. 1, p. 377-380, 2008.
- CASTAGNOLLI, N.; CYRINO, J. E. P. Desova induzida do curimatá *Prochilodus scrofa* Steindachner, 1881 (Pisces, Prochilodontidae). *Ciência e Cultura*, Campinas, v. 32, n. 9, p. 1245-1253, 1980.
- CASTRO, R. M. C.; VARI, R. P. Detritivores of the South America fish family Prochilodontidae (Teleostei: Ostariophysi Characiformes): a phylogenetic and revisionary study. Washington, D.C: *Smithsonian Books*, p. 200, 2004.

- CASTRO, R. M. C.; VARI, R.P. Family Prochilodontidae, pp. 65-70 in check list of the freshwaters of South and Central America, edited by Reis R.E., S.O. Kullander and C.J., Ferraris Jr., *Edipucrs 1*, Porto Alegre, 2003.
- CESÁRIO, VINICIUS VENDRAMINI. Estudo sobre a ictiofauna do rio Sapucaí-Mirim, afluente da margem esquerda do Rio Grande no estado de São Paulo: Composição, distribuição espacial e sazonalidade. Tese de Ecologia e Recursos Naturais – Universidade Federal de São Carlos, São Paulo, 2010.
- CHAMBERS, G.K.; MACAVOY, E.S. Microsatellites: consensus and controversy. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B*, Oxford, v. 11, p. 455-476, 2000.
- CHARLESWORTH, B. Effective population size and patterns of molecular evolution and variation. *Nature Reviews Genetics*, v. 10, n. 3, p. 195-205, 2009.
- CHEVOLOT, M.; Ellis, J. R.; Hoarau, G.; Rijnsdorp, A. D.; Stam, W. T.; Olsen, J.L. Population structure of the thornback ray (*Raja clavata* L.) in British waters. *Journal of Sea Research*, v. 56, p. 305-316, 2006.
- CHIARI, L.; SODRÉ, L. M. K. Genetic variability in five species of Anostomidae (Ostariophysi – Characiformes). *Genetics Molecular Biology*, v. 22, p. 517-523, 1999.
- CHIARI, L.; SODRÉ, L. M. K. Study of eight species of the Anostomidae family (Pisces, Characiformes) by RAPD analysis. *Acta Scientiarum: Biology Science*, v. 23, p. 445-451, 2001.
- CHIARI, L.; SODRÉ, L.M.K. Study of eight species of the Anostomidae family (Pisces, Characiformes) by RAPD analysis. *Acta Scientiarum Animal Sciences*, Maringá, v. 22, p. 445-451, 2001.
- CHISTIAKOV, D. A.; HELLEMANS, B., VOLCKAERT, F. M. A. Microsatellites and their genomic distribution, evolution, function and applications: A review with special reference to fish genetics. *Aquaculture*, v. 255, p. 1-29.
- COWX, I. G. Analysis of threats to freshwater fish conservation: past and present challenges. In: COLLARES-PEREIRA, M. J. COELHO, M.M. *Conservation of freshwater fishes: options for the future*, Fishing News Books, Blackwell Science, p. 201, 2002 ver
- DAKIN, E. E.; AVISE, J. C. Microsatellite null alleles in parentage analysis. *Heredity*, v. 93, n. 5, p. 504-509, 2004.
- DEWOODY, J. E.; AVISE, J. Microsatellite variation in marine, freshwater and anadromous fishes compared with other animals. *Journal of Fish Biology*, v. 56, p. 461-473, 2000.
- FAO Perspectivas de la agricultura y del desarrollo rural em las Américas: uma mirada hacia América Latina y el Caribe, p. 145, 2009.

- FERRARIS Jr., C. J. Checklist of catfishes, recente and fóssil (Osteichthyes, Siluriformes), and catalogue of siluriform primary types. *Zootaxa*, v. 1418, n. 1, p. 1-628, 2007.
- FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. 3ª ed. Embrapa-Cernagem, Brasília, 1998.
- FÓRUM PAULISTA DE COMITES DE BACIAS HIDROGRÁFICAS. Comitê da Bacia Hidrográfica do Sapucaí-Mirim Grande. Disponível em:
- FRAKLIN, I. R. Conservation Biology – An evolutionary ecological perspective. *Sinauer Associates*, p. 135-149, 1980.
- FRANKHAM, R. Genetic and extinction. *Biological Conservation*, v. 126, n. 2, p. 131-140, 2005.
- FRANKHAM, R. Inbreeding and extinction: a threshold effect. *Conservation Biology*, v. 9, n. 4, p. 792-799, 1995.
- FRANKHAM, R.; BALLOU, J. D.; BRISCOE, D. A. Fundamentos da genética da conservação. Tradução por Francisco, M. R.; Farias, L. P.; Rodrigues, F. P.; Galetti, P. M. Ribeirão Preto, São Paulo: SBG (Sociedade Brasileira de Genética), p. 280, 2008.
- FROST, L. A., EVANS, B. S., JERRY, D. R. Loss of genetic diversity due to hatchery culture practices in barramundi (Latescalcarifer). *Aquaculture*, London, v. 26, p. 19-25, 2003.
- GARCEZ, D.S. Diagnóstico das comunidades de pescadores artesanais no Estado do Rio Grande do Sul. In: RELATÓRIO FINAL Programa RS-Rural Pesca Artesanal da
- GODINHO, A. L., LAMAS, I. R.; GODINHO, H. P. Reproductive ecology of Brazilian freshwater fishes. *Environmental Biology of Fishes*, v. 87, n. 2, p. 143–162, 2009.
- GODOY, M.P. Peixes do Brasil, sub ordem Characoidei – Bacia do Rio Mogi-Guaçu. *Franciscana*, Piracicaba, v. 4, p. 627, 1975.
- GODOY, M.P. Peixes do Brasil: subordem Characoidei-Bacia do rio Mogi- Guaçu. Piracicaba, São Paulo: Editora Franciscana: v. 4, p. 629-847, 1975.
- GOMES, P.C.; Ribeiro R.P.; Barero N.L.; Povh J.A.; Vargas L.; Sirol R. N. Diversidade genética de três estoques de piapara (*Leporinus elongatus*) utilizando RAPD. *Acta Scientiarum Animal Sciences*, Maringá, v. 30, n. 2, p. 241-247, 2008.
- GOULDING, M. The fishes and the forest: exploration in Amazonian Natural History. *University of California Press*, Berkeley, p. 280, 1981.
- HARDY, O.; VEKEMANS, X. SPAGeDi: a versatile computer program to analyse spatial genetic structure at the individual or population levels. *Molecular Ecology Notes*, v. 2, p. 618–620, 2002.
- HARTZ, S. M.; SILVEIRA, C. M.; CARVALHO, S.; VILLAMIL, C. Alimentação da piava, *Leporinus obtusidens* (Characiformes, Anostomidae), no lago Guaíba, Porto Alegre,

- Rio Grande do Sul, Brasil. Pesquisa Agropecuária Gaúcha, Porto Alegre, v. 6, n. 1, p. 145-150, 2000.
- HARVEY, B., CAROLSFELD, J. Migratory fishes of South America: biology, fisheries and conservation status. *The World Bank*, Washington, p. 1- 18, 2003
- HATANAKA, T.; GALETTI, P.M. RAPD markers indicate the occurrence of structured populations in a migratory freshwater fish species. *Genetics and Molecular Biology*, Ribeirão Preto, v. 26, n. 1, p. 19-25, 2003.
- HATANAKA, T.; HENRIQUE-SILVA, F.; GALETTI JR., P .M. Population substructuring in a migratory freshwater fish *Prochilodus argenteus* (Characiformes, Prochilodontidae) from the São Francisco River. *Genética*, The Hague, v. 126, p. 1-7, 2006.
- HILSDORF, A. W. S.; PETRERE Jr., M. Conservação de peixes na bacia do rio Paraíba do Sul. *Ciência Hoje*, v. 30, n. 180, p. 62-65, 2002.
- HILSDORF, A. W. S.; RESENDE, E. K.; MARQUES, D. K. S. Genética e conservação de estoques pesqueiros de águas continentais no Brasil: Situação atual e perspectivas. Corumbá: Embrapa, Pantanal, p. 44, 2006.
- HORI, T. S. F.; AVILEZ, I. M.; INOUE, L. K.; MORAES, G. Metabolical changes induced by chronic phenol exposure in matrinxã *Brycon cephalus* (Teleostei: Characidae) juveniles. *Comparative Biochemistry and Physiology*, Oxford, v. 143, n. 1, p. 67-72, 2006.
- http://forumpaulista.org/index.php?option=com_content&view=article&id=70&Itemid=77. Acesso em 14 jan. 2012.
- Invasive Species Specialist Group (ISSG) of the Species Survival Commission of the IUCN/World Conservation Union. GISD-The Global Invasive Species Database. Disponível em: <http://www.issg.org//database/species/search.asp?st=100ss>. Acessado em:18 de dezembro de 2011.
- JERRY, D. R., PRESTON, N. P.; CROCOS, P. J.; KEYS, S.; MEADOWS, J. R. S.; LI, Y. Parentage determination of Kumura shrimp *Penaeus (Marsupenaeus) japonicas* using microsatellite markers (Bate). *Aquaculture*, London, v. 235, p. 237-247. 2004.
- 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, p. 1099-1006, 2007.
- LAIKRE, L.; PALM, S.; RYMAN, N. Genetic Population Structure of fishes: Implications for Coastal Zone Management. *Ambio*, Stockholm, v. 34, n. 2, p. 111-119, 2005.
- LANDE, R.; BARROWCLOUGH, G. F. Effective population size, genetic variation, and their use in population management. In: *Viable Populations for Conservation* (ed. By M.E. Soulé), *Cambridge University Press*, Cambridge, p. 87-123, 1987.

- LANGANI, F.; CORREA, R. M. C.; OYAKAWA, O. T.; SHIBATT, O. A.; PAVANELLI, C. S.; CASATTI, L. Diversidade da ictiofauna do Alto Paraná: composição atual e perspectivas futuras. *Biota Neotropica*, Campinas, v. 7, n. 3, p.181- 197, 2007.
- LARINIER, M.; FRANÇOIS, T. The development and Evaluation of downstream by passes for juvenile salmonoides at small hidroelectric plants in France. *American Fishes Society*, EUA, 2000.
- LERVOLINO, F.; RESENDE, E.K.; HILSDORF, A.W.S. The lack of genetic differentiation of Pacu (*Piaractus mesopotamicus*) populations of the Upper-Paraguay Basin revealed by the mitochondrial DNA D-loop region: Implications for fishery management. *Fisheries Research*, Canadá, v. 101, p. 27-31, 2010.
- LI, Y-C.; KOROL, A.B.; FAHIMA, T.; NEVO, E. Microsatellites within genes: structure, function, and evolution. *Molecular Biology and Evolution*, Chicago, v. 21, n. 6. 2004.
- LIU, Z. Fish genomics and analytical genetic technologies, with examples of their potential applications in management of fish genetic resources. *America*, v. 5, p. 145-179, 2007.
- LOCKWOOD, J. L.; CASSEY, P.; BLACKBURN, T. The role of propagule pressure in explaining species invasions. *Trends in Ecology and Evolution*, v. 20, p. 223-228, 2005.
- LOPERA BARRERO, N. Diversidade genética de *Brycon orbignyanus* em sistema reprodutivo seminatural. 2007. Tesis PhD. Universidade de Maringá, Maringá, 2007.
- LOPERA BARRERO, N. Diversidade genética de populações de Piracanjuba (*Brycon orbignyanus*), com a técnica de RAPD. 2005. 45 f. Dissertação Mestrado em Zootecnia, Universidade de Maringá, Maringá, 2005.
- LOPERA BARRERO, N. M.; RIBEIRO, R. P.; POVH, J. A.; SIROL, R. N.; MANGOLIN, C. A. Avaliação genética de populações naturais e de estoques de um programa de repovoamento de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) utilizando marcadores microssatélite. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, Belo Horizonte, v. 62, n.4, p. 954-963, 2010.
- LOPERA BARRERO, N.; RIBEIRO, R. P.; VARGAS, L.; POVH, J. A.; GOMES, P. C.; MANGOLIN, C. A.; OLIVEIRA BOSO, K. M.; GUALDA, T. Caracterização genética de estoques de *Prochilodus lineatus* (Valenciennes, 1836) (Characiformes: Prochilodontidae), utilizados em programas de repovoamento: importância para a ictiofauna e do ecossistema. *Bioscience Journal*, Uberlândia, v. 24, n. 4, p. 86-93, 2008.
- LOPES, T. S., RIBEIRO, R. P.; LOPERA-BARRERO, N. M.; SIROL, R. N.; POVH, J.A.; GOMES, P.C.; VARGAS, L. Caracterização genética de estoques de curimba (*Prochilodus lineatus*) utilizados em programas de repovoamento. *Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal*, Salvador, v. 9, n. 4, p.652-661,2008.

- LOWE-MCCONNELL, R. Fish communities in tropical freshwaters. Longman, New York, p. 337, 1975.
- MAGALHÃES, A. L. B.; ANDRADE, R. F.; RATTON, T. F.; BRITO, M. F. G. Ocorrência da truta-marrom *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum, 1792) (Pisces: Salmonidae) no alto rio Aicurióca e tributários, bacia do Rio Grande, Minas Gerais, Brasil. *Boletim do Museu de Biologia Mello Leitão*, v. 14, p. 33-40, 2002.
- MAIARDES-PINTO, C. S. R.; PAIVA, P.; ANTONIUTTI, D. M.; VERANI, J. R.; JUSTO, C. L. Influência do arraçoamento no nascimento do curimatá *Prochilodus scrofa*, em tanques experimentais de cultivo. *Anais do III Simpósio Brasileiro de Aquicultura*. São Carlos, SP, p. 313-327, 1984.
- MARTINS, C.; WASKO, A. P.; OLIVEIRA, C.; FORESTI, F. Mitochondrial DNA variation in wild population of *Leporinus elongatus* from the Paraná River basin. *Genetics and Molecular Ecology*, v. 26, p. 33-38, 2003.
- MATOSO, D. A.; ARTONI, R. F.; GALETTI JR., P. M. Genetic diversity of the small characid fish *Astyanax* sp., and its significance for the conservation. *Hidrobiologia*, Iztapalapa, v. 527, p. 223-225, 2004.
- MATSUMOTO, C. K.; HILSDORF, A. W. S. Microsatellite variation and population genetic structure of a Neotropical endangered Bryconinae species *Brycon insignis* Steindachner, 1877; implications for its conservation and sustainable management. *Neotropical Ichthyology*, Porto Alegre, v.7, p. 395-402, 2009.
- MCALLISTER, D. E., HAMILTON, A. L., HARVEY, B. Global freshwater biodiversity: striving for the integrity of freshwater ecosystems. *Sea Wind*, v. 11, n. 1, p. 1-140, 1997.
- MINISTÉRIO DA PESCA E AQUICULTURA. Boletim Estatístico da Pesca e Aquicultura, p. 17-22, 2011.
- MOREIRA, A. A.; HILSDORF, A. W. S.; SILVA, J. V.; SOUZA, V. R. Variabilidade genética de duas variedades de tilápia nilótica por meio de marcadores microssatélites. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v. 42, n. 4, p.521-526, 2007.
- MORELLI, K. A.; REVALDAVES, E.; OLIVEIRA, C.; FORESTI, F. Isolation and characterization of eight microsatellite loci in *Leporinus macrocephalus* (Characiformes, Anostomidae) and cross species amplification. *Molecular Ecology Notes*, v. 7, p. 32-34, 2007.
- NELSON, J.S. Fishes of the world. 3 rd edition. John Wiley and Sons, New York, p. 600, 1994.
- NELSON, J.S. Fishes of the world. 4 rd edition. *Hoboken*, New Jersey: John Wiley and Sons, p. 601, 2006.

- NUNNEY, L.; CAMPBELL, K. A. Assessing minimum viable population size: demography meets population genetics. *Trends in Ecology and Evolution*, v. 8, p. 234-239, 1993.
- OJASTI, J. Estudio sobre el estado actual de las especies exóticas. Venezuela, Secretaria Geral de la Comunidad Andina, 223p., 2001.
- OLIVEIRA, C.; ALMEIDA-TOLEDO, L. F.; FORESTI F. Karyotypic evolution in Neotropical fishes. (Pisano, E.; Ozouf-Costaz, C.; Foresti, F; Kappor, B.G. Eds). *Fish Cytogenetics*, USA, Science Publishers, p. 11-152, 2006.
- OLIVEIRA, F.; FORESTI, F; HILSDORF, A. W. S. Genetics of Neotropical fish: from chromosomes to populations. *Fish Physiology Biochemistry*, Amsterdam, v. 35, p. 81-100, 2009.
- PEREIRA, L. H. G.; FORESTI, F.; OLIVEIRA, C. Genetic structure of the migratory catfish *Pseudoplatystoma corruscans* (Siluriformes: Pimelodidae) suggest homing behavior. *Ecology of Freshwater Fish*, v. 18, p. 215-225, 2009.
- PETRERE, M. Migraciones de peces de agua dulce en America Latina: algunos comentarios. *COPESCAL*, FAO, Rome, Doc. Ocas, 1985.
- PINHEIRO, C. V. L. Relatório de pesca no lago de Sobradinho para o ano de 1980. Juazeiro, SUDEPE, 1981.
- PIORSK, N. M., SANCHES, A.; CARVALHO-COSTA, L. F.; HATANAKA, T.; CARRILO AVILA, M.; FREITAS, P. D.; GALETTI Jr., P. M. Contribution of conservation genetics in assessing Neotropical freshwater fish biodiversity. *Brazilian Journal Biology*, São Paulo, v. 68, n. 4 (Suppl.), p. 1039-1050, 2008.
- PORTO-FORESTI, F. Análise das regiões organizadoras de nucléolo polimórficas em truta Arco-íris (*Onchorhynchus mykiss*): mecanismo de herança e efeitos no desenvolvimento. Botucatu: Instituto de Biociências de Botucatu. Tese de doutorado - Universidade Estadual Paulista, p. 119, 2001.
- POVH, J. A; LOPERA-BARRERO, N. M.; RIBEIRO, R. P.; LUPCHINSKI JR., E.; GOMES, P. C., LOPES, T. S. Genetic monitoring of fish repopulation programs using molecular markers, *Ciência e Investigación Agraria*, Santiago, v. 35,n. 1, p. 5-15, 2008.
- RAMELLA, M. S.; KROTH, M. A.; MEURER, S.; NUNER, A. P. O.; ZANIBONI-FILHO, E.; ARISI, A.C.M. Genetic Variability In Four Fishes Species (*Pimelodus maculatus*, *Prochilodus lineatus*, *Salminus brasiliensis*, and *Steindachneridion scripta*) from Uruguay basin. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, Curitiba, v. 49, n. 4, p. 589-598, 2006.
- RAYMOND, M.; ROUSSET, F. GENEPOP 1.2: population genetics software for exact tests and ecumenicism. *Journal Heredity*, v. 86, p. 248-249, 1995.

- REVALDAVES, E.; RENESTO, E.; MACHADO, M. F. P. S. Genetic variability of *Prochilodus lineatus* (Characiformes, Prochilodontidae) in the Upper Paraná River. *Revista Brasileira de Genética*, Ribeirão Preto, v. 20, p. 381-388.
- RINGUELET, A.; ARAMBURU, R.; ALONSO, A. Los peces argentinos de agua dulce. *Investigação Científica*, La Plata, p. 602
- ROSSINI, B. C.; NUNES, A. G.; FREITAS, P. D.; GALETTI, P. M. Isolation and characterization of microsatellite loci of the fresh water fish *Salminus franciscanus*. *Molecular Ecology Resources*, Reino Unido, 2010.
- RUEDA, E.C.; Sommer, J.; SCARABOTTI, P.; MARKARIANI, R.; ORTÍ, G. Isolation and characterization of polymorphic microsatellite loci in the migratory freshwater fish *Prochilodus lineatus* (Characiformes, Prochilodontidae). *Conservation Genetic Resources*, Malden, v. 3, p. 681-684, 2011.
- SABINO, J.; ANDRADE, L. P. Uso e conservação da ictiofauna no ecoturismo na região de Bonito, Mato Grosso do Sul: o mito da sustentabilidade ecológica no rio Baía Bonita (Aquário Natural de Bonito). *Biota Neotropica*, Campinas, v. 3, n. 2, p. 1-9, 2003.
- SANTOS, G. M. Caracterização dos hábitos alimentares e reprodutivos de quatro espécies de “aracus” e considerações ecológicas sobre o grupo do lago Janauacá, AM (Osteichthyes, Characoidae, Anastomidae). *Acta Amazônica*, Manaus, v. 12, n. 4, p. 713-739, 1982.
- SANTOS, G. O. Aspectos importantes para a piscicultura do gênero *Leporinus* Spix, 1829-uma revisão. *Pesquisa Agropecuária Gaúcha*, Porto Alegre, v. 6, n. 1, p. 151-156, 2000.
- SCHLOSSER, I. J. Critical landscape attributes that influence fish population dynamics in headstreams. *Hydrobiologia*, v. 303, p. 71-81, 1995.
- Secretaria da Agricultura e Abastecimento do Estado do Rio Grande do Sul e o Instituto Interamericano de Cooperação para a Agricultura SAA-RS/IICA, p. 35, 2001.
- SELKOE, K. A.; TOONEN, R. J. Microsatellites for ecologists: a practical guide to using and evaluating microsatellite markers. *Ecology Letters*, v. 9, n. 5, p. 615-629, 2006.
- SIROL, R. N.; BRITTO, S. G. Conservação e manejo da ictiofauna: repovoamento. In: NOGUEIRA, M.G.; HENRY, R.; JORCIN, A. Ecologia de reservatórios: impactos e potenciais, ações de manejo e sistema em cascatas. RiMA, São Carlos, p. 275-284, 2006.
- SØNSTEBØ, J. H.; BORGSTRØM, R.; HEUN, M. Genetic structure of brown trout (*Salmo trutta* L.) from the Hardangervidda mountain plateau (Norway) analyzed by microsatellite DNA, a basis for conservation guidelines. *Conservation Genetics*, Dordrecht, v. 8, n. 1, p. 33-44, 2007.

- SOUZA, C. A.; HASHIMOTO, D. T.; PEREIRA, L. H. G.; OLIVEIRA, C.; FORESTI, F.; PORTO-FORESTI, F. Development and characterization of microsatellite loci in *Phracocephalus hemioliopterus* (Siluriformes: Pimelodidae) and their cross species amplification in six related species. *Conservation Genetics Resource*, v. 4, p. 499-501, 2011
- STRECKER, U.; BERNATCHEZ, L.; WILKENS, H. Genetic divergence between cave and surface populations of *Astyanax* in Mexico (Characidae, Teleostei). *Molecular Ecology*, Reino Unido, v. 12, n. 3, p. 699-710, 2003.
- TAUTZ, D. Hipervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. *Nucleic Acid Research*, v. 17, p. 6463-6471, 1989.
- TELLES, C., JORGE, N., SILVA, D. A. Diversidade ictiofaunística e compartimentação do rio Caiapó, Goiás, por usinas hidrelétricas, v. 35, n. 11, p. 1023-1054, 2008.
- 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*, September, v. 4, n. 3, p. 535-53, 2004.
- VARI, R. P. Phylogenetic relationships of the families Curimatidae, Prochilodontidae, Anostomidae, and Ciclodontidae. *Smithsonian Contributions to Zoology*, Washington, v. 378, p. 1-60, 1983.
- VILAS, J. R. B.; Maria, L.; SODRÉ, K.; ORSI, M. L.; Almeida, F. S. De. Genetic diversity of the species *Leporinus elongatus* (Teleostei : Characiformes) in the Canoas Complex - Paranapanema River. *Neotropical Ichthyology*, v. 10, n. 4, p. 821-828, 2012.
- VITULE, J. R. S.; FREIRE, C. A.; SIMBERLOFF, D. Introduction of non-native freshwater fish can certainly be bad. *Fish and Fisheries*, v. 10, p. 98-108, 2009.
- VRIJENHOECK, R. C. Conservation genetics of freshwater fish. *Journal Fish Biology*, Scotland, v. 53 (Supplement A), p. 394-412, 1998.
- WANG, S.; HARD, J. J.; UTTER, F. Genetic variation and fitness in salmonids. *Conservation Genetics*, v. 3, p. 321-333, 2002.
- WAPLES, R. S.; DO, C. Linkage disequilibrium estimates of contemporary N_e using highly variable genetic markers: a largely untapped resource for applied conservation and evolution. *Evolutionary Applications*, v. 3, n. 3, p. 244-262, 2010.
- WARD, R. D.; WOODWARK, M; SKIBINSKI, D. O. A comparison of genetic diversity levels in marine, freshwater, and anadromous fishes. *Journal of Fish Biology*, v. 44, p. 213-232, 1994.
- WASKO, A. P.; GALETTI JR., P. M. PCR primed with minisatellite core sequences yields species-specific patterns and assessment of population variability in fishes of genus *Brycon*. *Journal Applies of Ichthyology*, v. 19, p. 109-113, 2003.

- WASKO, A. P.; GALETTI JR., P. M. RAPD analysis in the Neotropical fish *Brycon lundii*: genetic diversity and its implications for the conservation of the species. *Hydrobiologia*, Iztapala, v. 474, n. 1-2, p. 131-137, 2002.
- WASKO, A. P.; MARTINS, C.; OLIVEIRA, C.; FORESTI, F. Genetic Conservation of Brazilian fishes-Present state and perspectives. *Annual Review of Biomedical Sciences*, Botucatu, v. 6, p. 79, 2009.
- WATTIER, R.; ENGEL, C. R.; SAUMITOU-LAPRADE, P., VALERO, M. Short allele dominance as a source of heterozygote deficiency at microsatellite loci: experimental evidence at the dinucleotide locus Gv1CT in *Gracilaria gracilis* (Rhodophyta). *Molecular Ecology*, v. 7, p. 1569-1573, 1998.
- WELCOMME, R. L. Fisheries ecology of flood plain rivers. London: Longman, p. 317, 1979.
- WHITE, R. J.; KARR, J. R.; NEHLSSEN, W. Better roles for fish stocking and aquatic resource management. In: SCHRAMM, Jr., H.L.; PIPER, R.G. (Ed.). Uses and effects of cultured fishes in aquatic ecosystems. *American Fisheries Society Symposium*, 15. Bethesda, Maryland, p. 527-547, 1995.
- YAN, J.; LIU, S.; SUN, Y.; ZHANG, Z.; LUO, K.; LIU, Y. RAPD and microsatellite analysis of diploid gynogens from allotetraploid hybrids of red crucian carp (*Carassius auratus*) X common carp (*Cyprinus carpio*). *Aquaculture*, London, v. 243, p. 49-60.
- YAZBECK, G. M.; KALAPOTHAKIS, E. Isolation and characterization of microsatellite DNA in the piracema fish *Prochilodus lineatus* (Characiformes). *Genetics and Molecular Research*, Ribeirão Preto, v. 6, n. 4, p. 1026-1034, 2007.

Apêndice I. Grau de parentesco entre indivíduos da espécie *Leporinus elongatus* – coeficiente de parentesco descrito por Wang.

ALL LOCI	Sample	LeM2_004	LeM2_211	LeM2_218	LeM2_221	LeM2_232	LeM2_241	LeM2_243	LeM2_246	LeM2_251	LeM2_258	LeM2_265	LeM2_027	LeM2_276	LeM2_028	LeM2_287	LeM2_269	LeM2_055	LeM2_056	LeM2_072	LeM2_073	LeM2_074	LeM2_077	LeM2_078	LeM2-212	LeM2-075	LeM2-076	LeM2-079
Sample																												
LeM2_004																												
LeM2_211		0,0927																										
LeM2_218		0,1257	0,0646																									
LeM2_221		-0,0878	-0,1113	-0,0987																								
LeM2_232		0,3624	0,6316	0,1563	0,1011																							
LeM2_241		-0,0645	-0,2332	-0,2332	-0,2332	-0,4456																						
LeM2_243		0,4276	0,0503	-0,0309	0,1527	0,3624	-0,0645																					
LeM2_246		0,2645	-0,0189	0,0362	0,0454	0,0526	-0,0645	0,1313																				
LeM2_251		0,0082	0,1188	0,0404	0,0328	0,7242	-0,2332	0,087	0,3119																			
LeM2_258		-0,3066	-0,2702	-0,2702	-0,3066	-0,4283	0,1218	-0,3066	-0,2289	-0,2702																		
LeM2_265		0,0188	0,2443	0,0773	0,0265	0,3297	-0,2332	0,1638	0,0497	0,1083	-0,2702																	
LeM2_027		0,0773	-0,0034	0,1054	0,4146	0,0064	-0,2332	0,1565	0,2906	0,2973	-0,3066	0,2595																
LeM2_276		-0,0696	0,0348	0,2131	-0,2066	0,2494	-0,2332	-0,0537	0,0114	0,1126	-0,2289	0,4214	-0,0294															
LeM2_028		-0,1309	0,0914	-0,1711	-0,0493	-0,167	-0,2332	0,0902	-0,0848	-0,1649	-0,2289	0,2979	0,0829	-0,1346														
LeM2_287		0,0922	0,1258	0,2925	0,2162	0,4348	-0,2332	0,2913	0,4277	0,3181	-0,2702	0,1809	0,4692	-0,0408	0,0076													
LeM2_269		0,0656	-0,0034	-0,0287	-0,0886	0,0064	0,077	-0,0122	0,3793	0,1769	0,0487	0,0486	0,2092	-0,0567	0,0121	0,1118												
LeM2_055		0,0582	0,217	0,0781	-0,0943	0,3624	-0,2174	-0,0067	0,0338	0,0016	-0,2028	0,0832	0,0972	-0,05	0,0323	0,0657	-0,0182											
LeM2_056		-0,0702	0,022	0,1976	-0,1939	0,0526	-0,2332	0,1578	0,0589	0,0222	0,0692	0,0976	-0,0575	0,2313	0,0515	0,037	0,1777	0,0044										
LeM2_072		-0,0208	0,4517	0,1176	-0,1679	0,1563	-0,2332	-0,0987	-0,0316	-0,0273	-0,2702	0,0932	0,0376	0,1022	-0,0182	0,046	0,0551	0,0204	0,0349									
LeM2_073		0,1494	0,0806	0,1162	-0,0987	0,1563	-0,2332	0,1279	0,3202	0,0564	-0,1526	0,0932	0,1213	-0,0189	-0,1019	0,2858	-0,0287	-0,0575	-0,0211	0,0484								
LeM2_074		-0,2602	-0,2341	-0,2341	-0,0358	-0,1827	-0,2332	-0,1146	-0,015	-0,1104	-0,2289	-0,1781	0,0756	-0,2038	-0,1478	-0,1664	-0,1478	-0,0052	-0,2038	-0,2341	-0,1781							
LeM2_077		-0,0309	0,1815	0,256	-0,1679	0,3297	-0,2332	-0,0149	0,0994	0,1083	-0,2702	0,1451	0,0486	0,3502	-0,1649	0,0022	-0,0352	-0,012	0,2633	0,0932	0,0932	-0,1781						
LeM2_078		0,0978	0,0343	0,0289	-0,1161	0,5358	-0,2332	-0,1247	0,141	-0,0594	-0,2289	0,021	0,2171	-0,081	-0,0039	0,0157	0,0629	0,2349	-0,0138	0,0966	0,0289	0,0643	0,1249					
LeM2-212		-0,1972	-0,1608	-0,0676	-0,3066	-0,167	0,0261	-0,3066	-0,0412	-0,1729	-0,2289	-0,1729	-0,0068	-0,1194	-0,0436	-0,0676	-0,0222	-0,0732	-0,2289	-0,0676	0,0296	-0,1506	-0,0635	0,0709				
LeM2-075		-0,1679	0,0286	-0,1375	-0,1679	-0,105	-0,1679	-0,1679	-0,1679	-0,1743	-0,2702	-0,1375	-0,2341	-0,1026	-0,2341	-0,1375	-0,2341	-0,1451	-0,1679	-0,1375	-0,1375	-0,09	0,1191	-0,1679	0,2709			
LeM2-076		-0,1563	-0,1259	-0,0675	-0,2341	-0,3403	-0,2332	-0,2341	-0,0978	-0,1501	-0,2702	-0,1259	-0,0978	-0,1563	-0,1711	-0,1259	-0,0978	-0,132	-0,1711	-0,0675	-0,0675	-0,1679	-0,1259	-0,1563	0,4033	0,3491		
LeM2-079		-0,1161	-0,0965	-0,0838	-0,1939	0,3698	-0,0234	-0,1161	-0,034	0,0311	-0,2702	-0,0146	-0,1131	-0,1026	-0,1649	-0,0838	-0,0871	-0,0575	-0,1048	-0,0838	-0,0146	-0,1781	-0,0146	-0,0987	0,4566	0,1887	0,2407	

Apêndice II. Grau de parentesco entre indivíduos da espécie *Leporinus friderici* – coeficiente de parentesco descrito por Wang.

ALL LOCI	Sample	Lf.M1-201	Lf.M1-203	Lf.M1-206	Lf.M1-209	Lf.M1-214	Lf.M1-216	Lf.M1-219	Lf.M1-222	Lf.M1-224	Lf.M1-226	Lf.M1-230	Lf.M1-231	Lf.M1-236	Lf.M1-237	Lf.M1-240	Lf.M1-242	Lf.M1-247	Lf.M1-248	Lf.M1-249	Lf.M1-251	Lf.M1-96	Lf.M1-97	Lf.M1-98	Lf.M1-99
Sample																									
Lf.M1-201																									
Lf.M1-203		0,428																							
Lf.M1-206		0,6615	0,126																						
Lf.M1-209		-0,3165	-0,1238	0,2808																					
Lf.M1-214		0,5442	-0,0399	-0,1583	0,2865																				
Lf.M1-216		0,2258	-0,224	-0,1056	-0,4206	-0,0703																			
Lf.M1-219		0,5442	0,4392	0,2057	-0,3053	10,000	0,356																		
Lf.M1-222		0,008	0,2399	-0,1423	-0,5046	0,1679	-0,3898	0,1679																	
Lf.M1-224		0,2235	-0,3205	-0,2021	-0,3711	0,4398	0,5872	0,3538	-0,7685																
Lf.M1-226		-0,0225	-0,2318	-0,3502	-0,2824	0,4919	0,2608	0,4332	0,1656	0,5899															
Lf.M1-230		0,5442	-0,0399	0,3647	-0,2365	0,7674	-0,0703	10,000	0,1679	0,4398	0,4919														
Lf.M1-231		0,1961	0,428	0,0458	-0,3165	0,356	-0,2017	0,356	0,8119	-0,5804	-0,0225	0,356													
Lf.M1-236		0,0458	0,7665	0,3843	-0,3165	0,2057	-0,5402	0,2057	0,4734	-0,7307	-0,1728	0,2057	0,6615												
Lf.M1-237		0,3538	0,2488	0,0153	-0,2207	0,8095	0,1656	0,8095	-0,0225	0,5442	0,6237	0,8095	0,1656	0,0153											
Lf.M1-240		0,1805	0,0755	-0,158	-0,669	0,7777	0,5783	0,7777	-0,1958	0,576	0,211	0,7777	-0,0077	-0,158	0,5873										
Lf.M1-242		0,5442	-0,0399	0,3647	-0,2365	0,7674	-0,0703	10,000	0,1679	0,4398	0,4919	10,000	0,356	0,2057	0,8095	0,7777									
Lf.M1-247		0,4734	0,5537	0,1491	-0,3376	0,2694	-0,2009	0,0176	0,0458	0,2255	0,2682	0,2694	-0,1423	0,1962	-0,1728	-0,3461	0,2694								
Lf.M1-248		0,5783	0,1074	-0,1261	-0,083	0,5895	-0,7121	0,5895	-0,3142	-0,1982	0,211	0,5895	-0,1261	-0,1261	0,3991	0,2258	0,5895	-0,3142							
Lf.M1-249		0,1753	0,0952	0,5121	0,5051	0,5718	-0,1962	0,6485	0,1753	-0,2932	-0,061	0,036	0,1753	0,5268	0,4507	0,4177	0,036	-0,0237	-0,2209						
Lf.M1-251		-0,4634	-0,2209	-0,4634	-0,4187	0,0098	-0,4634	0,0098	-0,4634	-0,6612	-0,1879	0,0098	-0,4634	-0,4634	-0,1879	-0,2209	0,0098	-0,4634	-0,2209	0,0098					
Lf.M1-96		10,000	0,406	0,6485	-0,4304	0,5268	0,093	0,5268	0,06	0,1521	0,0721	0,5268	0,06	-0,0345	0,329	0,1074	0,5268	0,6485	0,5006	0,1753	-0,4634				
Lf.M1-97		0,406	-0,0762	-0,1952	-0,1733	-0,0772	-0,3821	0,4177	-0,2326	-0,3669	-0,2865	-0,0772	-0,2326	-0,2326	0,22	-0,0016	-0,0772	-0,1952	0,6485	-0,1895	-0,2209	0,406			
Lf.M1-98		0,5794	0,072	0,546	0,574	-0,0725	-0,2989	0,5997	0,5794	-0,4227	-0,1963	-0,0725	0,5794	0,5794	0,2566	-0,3996	-0,0725	-0,0798	10,000	0,5533	0,5997	0,5794	0,072		
Lf.M1-99		-0,3685	-0,4054	-0,1707	-0,3601	-0,0995	-0,2901	0,3028	0,3145	-0,1931	-0,1952	0,2126	0,3145	-0,4187	0,5006	0,0721	0,2126	-0,4828	0,0721	-0,2922	-0,4304	-0,3685	-0,2932	-0,3482	

