

ANÁLISE GENÉTICA DA REPOSIÇÃO DE ESTOQUES DE PEIXES NA BACIA DO RIO SAPUCAÍ-MIRIM (SP): IMPLICAÇÕES NA CONSERVAÇÃO

BRUNA BUENO MENDONÇA

BOTUCATU-SP

2018

Instituto de Biociências – Seção Técnica de Pós-Graduação
Distrito de Rubião Júnior s.n CEP 13618-970 Botucatu SP Brasil
posgraduacao@ibb.unesp.br

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

"Júlio de Mesquita Filho"

INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS DE BOTUCATU

**ANÁLISE GENÉTICA DA REPOSIÇÃO DE ESTOQUES DE
PEIXES NA BACIA DO RIO SAPUCAÍ-MIRIM (SP):
IMPLICAÇÕES NA CONSERVAÇÃO**

BRUNA BUENO MENDONÇA

FABIO PORTO-FORESTI

Tese apresentada ao Instituto de
Biociências, Campus de Botucatu,
UNESP, para obtenção da
qualificação em doutorado no
Programa de Pós-Graduação em
Ciências Biológicas (Genética).

BOTUCATU - SP

2018

Instituto de Biociências – Seção Técnica de Pós-Graduação
Distrito de Rubião Júnior s.n CEP 18618-970 Botucatu SP Brasil
posgraduacao@ibb.unesp.br

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: LUCIANA PIZZANI-CRB 8/6772

Mendonça, Bruna Bueno.

Análise genética da reposição de estoques de peixes na
bacia do rio Sapucaí-Mirim (SP): Implicações na
conservação / Bruna Bueno Mendonça. - Botucatu, 2018

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista
"Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de
Botucatu

Orientador: Fábio Porto-Foresti
Capes: 20204000

1. Genética de populações. 2. *Astyanax* (Peixe). 3.
Microssatélites (Genética). Biodiversidade - Conservação.

Palavras-chave: *Astyanax lacustris*; Conservação genética;
Genética de populações; Microssatélites; Repovoamento.



“Remember to look up at the stars and not down at your feet. Try to make sense of what you see and wonder about what makes the universe exist. Be curious. And however difficult life may seem, there is always you can do and succeed at. It matters that you don't just give up.”

“Lembre-se de olhar para as estrelas e não para baixo, para os seus pés. Tente achar sentido no que você vê e pergunte sobre o que faz o universo existir. Seja curioso. E por mais difícil que a vida pareça, sempre há algo que você possa fazer e ter sucesso. O importante que você apenas não desista.”

Stephen Hawking

Aos meus pais, Arlindo e Ivete e a minha irmã Larissa.

A conclusão de mais essa etapa não seria possível sem o apoio de vocês.

Agradecimentos

Gostaria de registrar meus agradecimentos a todas as instituições e pessoas que de alguma forma contribuíram com o desenvolvimento deste trabalho, em especial:

Ao financiamento recebido da fundação do ministério da Educação do Brasil, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) sem o qual não seria possível o desenvolvimento deste trabalho.

À CTG Brasil pelo financiamento do projeto “Conservação genética e Reposição de Estoques de Peixes Nativos nos reservatórios das PCHs Palmeiras e Retiro” (fase 2) (processo 1.00132/2015) no qual o presente trabalho está inserido.

Ao programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Genética) do Instituto de Biociências de Botucatu, Unesp, que possibilitou o desenvolvimento deste trabalho.

À seção técnica de Pós-Graduação do Instituto de Biociências de Botucatu, Unesp. Em especial ao Davi por sempre ser muito solícito.

À Faculdade de Ciências da Unesp de Bauru por ceder o espaço para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Departamento de Ciências Biológicas da Unesp, Campus Bauru, e a todos os docentes e servidores que fazem parte deste e contribuíram para minha formação como bióloga. Muito obrigada!

Ao Prof. Dr. Fábio Porto Foresti por proporcionar a vivência em seu laboratório desde o meu segundo ano de graduação, lugar que contribuiu muito para meu crescimento profissional e pessoal. Obrigada por tudo, pela amizade, confiança e pelas oportunidades que me proporcionou nestes anos.

Ao Prof. Dr. Diogo Teruo Hashimoto por colaborar com o presente trabalho e por sempre me receber muito bem em Jaboticabal e em seu laboratório (LAGeAC).

À todos o LAGeAC, por sempre me receberem bem em Jaboticabal. Em especial a Milena e a Raquel, que sempre me ajudaram com as placas de sequenciamento, muito obrigada pela paciência e por estar sempre dispostas a ajudar.

Ao Prof. Dr. Sérgio Ricardo Batlouni e a todos do Laboratório de Reprodução por realizarem e me ajudarem na reprodução neste trabalho e nas estadias em Jaboticabal.

À Sueli por ser muito receptiva em sua piscicultura (Projeto Peixe) sempre com seu café da manhã delicioso, pela dedicação em seu trabalho e pela sua atenção com todos do projeto.

Ao Prof. Dr. Cláudio de Oliveira por ser sempre muito atencioso comigo e não medir esforços para me ajudar quando necessário.

Ao Prof. Fausto Foresti pela atenção e humildade com que o senhor trata a todos, pelos ensinamentos e por sempre disponibilizar o laboratório.

Ao Prof. Dr. Paulino Martínez Portela por estar sempre aberto para me receber em seu laboratório durante o mestrado e também o doutorado, por ser sempre muito atencioso e preocupado, pela sua dedicação e profissionalismo. Muito obrigada!

À Dra. Raquel Fernández-Cebrián por sempre estar disposta a me ajudar e ensinar, sempre com muita paciência. Obrigada pelos ensinamentos!

À todos os pesquisadores, professores e alunos e técnicos da empresa ACUIGEN e do Departamento de Genética da Universidade de Santiago de Compostela

(Lugo, Espanha): Manuel (Manel), Adrián, Jorge, Belén, Carmen, Laura, Carlos, Miguel, Sonia, Susana, Vanessa (Vane), María (Peque), Maria Portela, Lucía, Xoana, Hurzos e Carlha. Obrigada pela vivência nos meses que estive em Lugo e pelos ensinamentos tanto técnicos como de interpretação dos dados, com certeza aprendi muitas coisas que vou levar para minha vida profissional e pessoal. Em especial para o Manuel por estar sempre presente, desde meu mestrado e ser tão solícito comigo. E também a Vane e a Susana por serem pessoas incríveis e fazerem meus dias de trabalho mais divertidos.

À todos que conheci na Espanha: Carlos Cesteros, Carlos Adrio, Xoana, Pepe e Maria. Vocês sempre me recebem muito bem e tornam sempre mais fácil estar longe de casa. Obrigada por me apresentarem com tanto amor a Galícia, me transmitindo esse sentimento que vou levar sempre.

Aos meus amigos e colegas do Laboratório de Genética de Peixes (LAGENPE) de Bauru (Ana Paula, Ana Carolina, Diego, Cahique, Caio Goes, Caio Felipe, Fernanda (Fer), Luana, Manolo, Mariana, Pedro, Raul, Ricardo (Tarja), Rodrigo Zeni, Sandro, Vinicius, Willian (Will) e Yasmin), também àqueles que não estão mais no laboratório (Aline, Andrea, Diogo, Daniela, Egberto, Maíce, Rosângela, Sheila e a Tatiana) e todos os alunos que já passaram por ele. Muito obrigada pelas ajudas no trabalho de forma geral e pelos momentos de distração, que fizeram parte do meu dia a dia por muitos anos. Vocês contribuíram muito para meu crescimento e com este trabalho. Obrigada por todos os momentos e conversas especialmente à Fer, Andrea, Aline, Maíce, Diego e Cahique.

À Catarine, Gabi, Henrique (Mococa), Maíce e Murilo, amigos que fiz em Bauru e me fizeram por muitos anos me sentir em casa, obrigada por tornarem essa cidade mais divertida e feliz, vocês foram essenciais nestes anos.

À minha irmã e melhor amiga Larissa por todos os conselhos e todo apoio que sempre me dá em todas as minhas escolhas, pelos incontáveis momentos juntas (sempre ótimos) e pelas risadas. Amo você!

Aos meus pais Arlindo e Ivete por tudo, nada disso seria possível sem vocês dois. Obrigada por serem pais incríveis e batalharem sempre para me dar o melhor. Admiro muito vocês, não tenho palavras para agradecer e dizer o quanto amo vocês. Obrigada por tudo! Meus maiores exemplos.

RESUMO

Múltiplos fatores antropogênicos têm causado grande interferência nos ecossistemas aquáticos continentais, entre eles estão os represamentos dos rios. As alterações causadas por essas construções afetam profundamente populações de peixes, podendo levar até mesmo a extinção das espécies que não apresentam adaptação às alterações provocadas nestes ecossistemas. Assim, ação como o repovoamento através do supportive breeding tem sido empregada a fim de manter populações naturais vulneráveis. Porém, no Brasil, poucos trabalhos de soltura de alevinos levam em conta características genéticas para a formação dos estoques de reprodutores. Além disso, poucos trabalhos de repovoamento se preocupam com a eficiência destes, não havendo monitoramento da diversidade genética dos indivíduos liberados pós-soltura. O presente estudo empregou *loci* microssatélites a fim de acessar a diversidade e estrutura genética de populações de *Astyanax altiparanae* em Pequenas Centrais Hidrelétricas (PCHs), no rio Sapucaí-Mirim de 2015 a 2017, onde ocorre soltura de alevinos desde 2011. Além disso, foi proposto o uso de marcadores microssatélites, como ferramentas para auxiliar na formação de banco de reprodutores e estimar o índice de recaptura de indivíduos provenientes de estoques de cultivo provenientes de repovoamentos em populações naturais. Os bancos de reprodutores analisados dos anos de 2015 e 2016 mostram que os indivíduos que compõem esse banco apresentam alta diversidade genética ($A = 24, 35$; $A_R = 16,27$; $H_E = 0,856$), com valores do índice de fixação (F_{is}) variando de 0,146 a 0,207 (P -value = 0, 007). O estoque de 2015 apresentou desvios significativos do equilíbrio de Hardy-Weinberg para a maioria dos *loci*. Isto sugere junto com os valores do F_{is} , que este estoque pode apresentar indivíduos pertencentes a diferentes populações, o que indica necessidade da distinção dos reprodutores de acordo com cada PCH respeitando essa diferenciação genética. As análises das diferentes populações da natureza ao longo do ano de 2015 a 2017 também revelaram alta diversidade genética ($A = 23,26$, $A_R = 11,78$, $H_E = 0,918$), não mostrando diminuição destes índices ao decorrer dos anos. Os valores de F_{is} variaram de 0,120 a 0,225 (P -value = 0, 007) e os valores de estruturação genética (F_{st}) variaram de 0 a 0, 023 (P -value = 0,0018). As análises de diversidade genética somada e as de estruturação sugerem que estas populações podem estar sendo homogeneizadas pela soltura de indivíduos provenientes do mesmo estoque. Além disso, os microssatélites se mostraram ferramentas eficientes para o monitoramento de estoques de reprodutores bem como para a estimativa de

recaptura em solturas do rio Sapucaí-Mirim, demonstrando recaptura de 0,19 a 0,79%. Desta forma, o presente trabalho demonstra a importância do uso de marcadores moleculares, como os microssatélites, na estimativa da diversidade genética e dos níveis de parentesco em programas de repovoamento a fim de propor o manejo adequado das diferentes populações e identificar os efeitos destes programas.

ABSTRACT

Multiple anthropogenic factors have caused great interference in continental aquatic ecosystems, among them are the impoundments of the rivers. The changes caused by these constructions deeply affect fish populations and may lead to extinction of species that do not have adaptation to changes in these ecosystems. Thus, actions like the fish stocking through the supportive breeding have been employed in order to maintain vulnerable wild populations. However, in Brazil, few restocking programs take into account genetics characteristics for the foundation of breeding stocks. In addition, scarce studies are concerned with their efficiency, and there are not monitoring of the genetic diversity post release of the fingerlings. This work employed loci microsatellite aiming access the diversity and genetic structure of *Astyanax lacustris* populations in Small Hydroelectric Plants (SHP), in the Sapucaí-Mirim River from 2015 to 2017, where there are releases since 2011. Additionally, it was proposed the use of microsatellites markers as tool to assist in the foundation of breeders stocks and estimate the recapture rate of individuals from breeding of fish farm stocks. The breeders analyzed from the years 2015 and 2016 show that individual that make up this stock show high genetic diversity ($A = 24.35$; $A_R = 16.27$; $H_E = 0.856$), with values of index (F_{is}) ranging from 0.146 to 0.207 (P -value = 0.007). The stock of 2015 presented significant deviations from Hardy-Weinberg equilibrium for most loci. This suggests, along with the F_{is} values, which this stock may present individuals belonging to different populations, indicating need for distinctions of breeders according with each SHP, respecting this genetic differentiation. The analysis of different wild populations throughout the year from 2015 to 2017 also revealed high genetic diversity ($A = 23.26$, $A_R = 11.78$, $H_E = 0.918$), it is not show a decrease of these indexes to over the years. F_{is} values ranged from 0.120 to 0.225 (P -value = 0.007) and structuring values (F_{st}) ranged

from 0 to 0.023 (P -value = 0.0018). Analyses of genetic diversity coupled with genetic structure suggest that these populations may be homogenized by the release of individuals from the same stock. Besides that, the microsatellites markers were powerful tool for the breeding stocks monitoring as well as for the estimation of recaptures in releases in the Sapucaí-Mirim River, demonstrating recapture of 0.19% to 0.79%. Therefore, the present study demonstrates the importance of using molecular markers, such microsatellites, in the evaluation of genetic diversity and levels of relatedness in supportive breeding programs in order to propose the proper management of different populations and identify the effects of these programs.

1 INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Ictiofauna continental	1
1.2 Gênero <i>Astyanax</i> como modelo para eficiência de práticas de repovoamento	2
1.3 Impactos antropogênicos causados nas populações de peixes.....	4
1.4 Estratégias conservacionistas.....	6
1.5 Marcadores moleculares	9
1.5.1 <i>Loci</i> microssatélites	12
1.6 Diversidade genética na conservação	14
1.6.1 Análises familiares na genética da conservação	15
2 OBJETIVOS.....	17
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	18
3.1 Área de amostragem	18
3.2 Material Biológico	20
3.3 Marcação dos exemplares de <i>Astyanax lacustris</i>	21
3.4 Extração de DNA.....	22
3.5 Seleção e aplicação dos loci microssatélites.....	23
3.5.1 Seleção dos loci microssatélites e ajustes das reações moleculares.....	24
3.6 Análise dos dados	26
3.6.1 Diversidade genética e estruturação de <i>A. lacustris</i>	26
3.6.1.1 Diversidade genética intrapopulacional.....	26
3.6.1.2 Diversidade genética entre populações.....	26
3.6.2 Estudo das relações familiares	27
3.6.2.1 Análise de parentesco	27
3.6.2.2 Estimativa da relação pai-descendentes	28
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	29
4.1 Capítulo 1.....	30
4.2 Capítulo 2.....	46
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	63
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	65
7 APÊNDICES.....	80

1 INTRODUÇÃO

1.1 Ictiofauna continental

Os peixes constituem o grupo mais diverso entre os vertebrados, com 27 mil espécies conhecidas (Nelson et al., 2006; Reis et al., 2016), cerca de 28 a 31% dessa diversidade pode ser encontrada na região Neotropical (Léveque et al., 2008; Reis et al., 2016). Novas espécies são descritas a cada ano (Buckup et al., 2007), apenas na América do Sul 465 novas espécies foram descritas nos últimos cinco anos. No Brasil, há a maior riqueza de espécies e maior número de endemismo deste grupo (McCallister et al., 1997; Abell et al., 2008, Albert e Reis, 2011). Uma extraordinária proporção da biodiversidade de peixes está refugiada em ambientes continentais (Buckup et al., 2007; Abell et al., 2008), sendo a maioria pertencente à classe Actynopterygii, distribuídas principalmente em três ordens: Siluriformes (42%), Characiformes (39%) e Cyprinodontiformes (11%) e duas famílias: Characidae (23%) e Loricariidae (19%) (Hales e Petry, 2008). Este elevado número de espécies se deve a grande diversidade e heterogeneidade das bacias hidrográficas desta região, onde o Brasil está inserido (Buckup et al., 2007), o que o possibilita ser o país da megadiversidade de ictiofauna de águas continentais (Nogueira et al., 2010). A maior parte dessa diversidade é encontrada nas bacias do rio Amazonas, Orinoco e Paraná-Paraguai (Langeani et al., 2007; Abell et al., 2008), que juntas reúnem cerca de 3.599 espécies (Reis et al., 2016). A bacia Paraná-Paraguai, também conhecida como La Plata, representa a terceira bacia com maior diversidade de espécies de peixes continentais com cerca de 920 espécies (Reis et al., 2016).

O rio Paraná abriga cerca de 310 espécies em 28 famílias (Langeani et al., 2007; Agostinho et al., 2008; Hales e Petry, 2008). As ordens com maior riqueza registrada são os Characiformes e os Siluriformes, com 80% das espécies, compondo grupos dominantes em ambientes lóticos (Langeani et al., 2007). Essa região abrange os maiores rios do Estado de São Paulo, que são habitados por espécies de pequeno, médio e grande porte, como os lambaris, piaparas, curimbas, pintados e jaús. Espécies de pequeno porte habitam preferencialmente pequenos riachos e cabeceiras dos rios, apresentam alto grau de endemismo e distribuição geográfica restrita, sendo dependentes da vegetação marginal para fins tróficos, reprodutivos e abrigo (Castro e Menezes, 1998). Já espécies migradoras de médio e grande porte apresentam ampla distribuição geográfica, migrando anualmente para reprodução e alimentação, sendo espécies importantes na pesca de subsistência, comercial e na aquicultura (Agostinho et al., 2007).

Apesar da grande diversidade específica de peixes, estes ecossistemas têm perdido grande proporção de suas espécies e habitats quando comparado com ecossistemas marinhos (Revenga et al., 2005; Agostinho et al., 2008; Reis et al., 2016), em face de diversos fatores antrópicos, o que torna importante a inclusão do grupo em programas conservacionistas.

1.2 Gênero *Astyanax* como modelo para eficiência de práticas de repovoamento

O gênero *Astyanax* é um dos mais diversos da família Characidae, com 150 espécies válidas que estão amplamente distribuídas nas bacias brasileiras (Garutti e Britski, 2000; Eschmeyer, 2014), e que se estendem desde o rio Colorado no Texas, Estados Unidos, até o rio Colorado no norte da Patagônia, Argentina (Reis et al., 2003,

Ornelas-Garcia et al., 2008; López et al., 2008). As espécies deste gênero são conhecidas pela grande plasticidade fenotípica e/ou genotípicas, o que mostra a capacidade de se ajustar a diferentes situações ambientais (Orsi et al., 2002).

Dentro desse grupo está a espécie *Astyanax altiparanae*, popularmente conhecida por lambari do rabo amarelo ou tambiu (Prioli et al., 2002), atualmente reconhecida como novo sinônimo de *Astyanax lacustris* (De Lucena e Soares, 2016). Esta espécie é considerada de pequeno porte, chegando a 12 cm de comprimento, é uma espécie migradora de curta distância presente em quase todos os ambientes dulcícolas (Vari e Castro, 2007). Pode ser considerada próxima da base da cadeia trófica, serve de alimento para outras espécies de peixes (Hahn et al., 1997; Prioli et al., 2002) e se alimenta principalmente de insetos, tendo a dieta bastante variada explorando grupos alimentares diferentes (Peretti e Andrian, 2007). Além da sua importância ecológica, de forma geral, espécies do gênero *Astyanax* exibem relevância na aquicultura, por apresentar características biológicas favoráveis para produção e cultivo, na alimentação e na pesca esportiva, servindo como iscas vivas e é também considerada como recurso pesqueiro (Porto-Foresti et al., 2001).

No Brasil, espécies do gênero *Astyanax* são comum e extensivamente distribuídas na bacia rio Paraná (Graça e Pavanelli, 2002). Além de espécies deste gênero esta bacia abriga grande riqueza de espécies ecologicamente e economicamente importantes, entretanto, o curso dos seus principais afluentes está profundamente alterado por represamentos (Agostinho et al., 2008, Hales e Petry, 2008).

A. lacustris (anteriormente nominada como *A. altiparanae*) e outras espécies do gênero são bastante reportadas em diversos estudos, desde estudos filogenéticos, que tratam em tentar solucionar o complexo de espécies que este grupo representa (Moreira-

Filho, 1991; Artoni et al., 2006; Paiva et al., 2006; Rossini et al., 2016), populacionais ecológicos (Orsi et al., 2002) até estudos de diversidade genética e estruturação populacional (Prioli et al., 2002; Sofia et al., 2006; Zaganini et al., 2013), no entanto, esses últimos em sua maioria fazem uso de marcadores moleculares não muito resolutivos como o RAPD.

Ao considerar a fácil e rápida reprodução de *A. lacustris* em cultivo, a abundância desta espécie em bacias onde há maior concentração de barramentos para produção de energia e as frequentes ações de repovoamento nestas regiões, o estudo dessa espécie se torna ideal para compreensão dos efeitos genéticos das ações de estocagem e soltura de juvenis em populações naturais, principalmente relacionado ao declínio populacional e a sobrevivência pós-soltura. Tendo em vista que apenas 17% dos estudos avaliam geneticamente populações naturais suplementadas ou populações reintroduzidas (Attard et al., 2016).

1.3 Impactos antropogênicos causados nas populações de peixes

O grande desenvolvimento urbano e industrial nos últimos anos têm gerado interferências antrópicas negativas em diversos ecossistemas, especialmente nos ecossistemas aquáticos (Cowx, 2002; Agostinho et al., 2008). A biodiversidade aquática continental, incluindo espécies de peixes de todo o mundo são ameaçadas pela fragmentação e redução/perda de habitats, modificação dos regimes dos rios, poluição, introdução de espécies exóticas, perda da conexão entre os habitats devido à construção de barramentos e sobrepesca (Cowx, 2002; Hatanaka et al., 2006; Agostinho et al., 2008; Jelks et al., 2008).

Dentre as ações que afetam os recursos hídricos, a construção de barramento e consequente formação de lagos artificiais podem ser considerados os principais fatores em termos de perda da biodiversidade de ambientes aquáticos (Cowx, 2002; Reis et al., 2016). No Brasil há cerca de 720 reservatórios, a maioria destes com finalidade de produção de energia elétrica e estão distribuídos ao longo do território brasileiro, com maior concentração na região Sul e Sudeste (80%) devido à elevada demanda energética pelas indústrias e centros urbanos nessa região (Agostinho et al., 2008).

Os reservatórios podem ser classificados em grandes Usinas Hidrelétricas (UHEs) e Pequenas Centrais Hidrelétricas (PCHs). Desde 1998, as PCHs são consideradas pelos órgãos públicos como prioridades no incremento do setor elétrico, sendo vistas como uma alternativa para atender as demandas de pequenos centros urbanos e áreas rurais mais afastadas (Albertin e Mauad, 2008; Agostinho et al., 2008). Desta forma, há uma grande concentração de PCHs em rios tributários, como o rio Sapucaí-Mirim, localizado na bacia do rio Alto Paraná, que apresenta a construção de diversas PCHs como a Anhanguera, Dourado, Palmeiras, Retiro e São Joaquim. A fragmentação dos tributários com a construção das PCHs além da fragmentação dos rios principais é preocupante, pois estes são considerados como importantes áreas de abrigos e rotas migratórias durante o período de reprodução e alimentação de espécie migradoras de longas e curtas distâncias (Castro, 1999; Baumgartner et al., 2004; Melo et al., 2013).

Os efeitos dos barramentos nos ambientes aquáticos são bastante discutidos em diversos trabalhos, tanto em nível ecológico como em nível genético populacional. Em nível ecológico, um dos grandes resultados da construção de barramentos é a alteração do sistema do rio para ambiente lacustre, o que leva consequentemente a perda e alteração de habitats. Outra consequência é a fragmentação deste sistema, o que pode

levar a estruturação interpopulacional e conseqüente diminuição da diversidade genética (Wei et al., 1997; Ruban et al., 1997; Agostinho et al., 2008; Esgúicero e Arcifa, 2010; Crook et al., 2015).

Diversos estudos genéticos demonstram as conseqüências destas alterações físicas/ecológicas em populações de peixes, especialmente de espécie migradoras. Zhang e Tan (2010) descreveram a aceleração da diferenciação de populações em espécies migradoras ocasionadas pela construção de barramentos. Assim como Ramos et al. (2012), que observou perda da diversidade genética e taxa de endocruzamento significativa em espécies de *Leporinus elongatus* no complexo Canoas, rio Paranapanema, já alguns estudos com *Prochilodus lineatus*, espécie também migradora, não se notou queda da diversidade genética e aumento da estruturação populacional ocasionadas pela fragmentação do sistema aquático continental (Melo et al., 2013; Ferreira et al., 2017). Uma possível explicação para essa diferença seria a ausência de práticas de repovoamento e/ou ausência de escadas e passagens de peixes na região onde foi realizado o segundo estudo.

A eficiência da construção de escadas de peixes associadas aos barramentos é bastante discutida, sendo estas muitas vezes seletivas para algumas espécies, podendo ser viáveis em alguns casos apenas para o movimento rio acima (Baumgartner, 2006; Agostinho et al., 2007; Crook et al., 2015). Estudos comparativos morfométricos com espécies migradoras como *Salminus hilarii* demonstraram falta de eficiência destas construções para espécies deste gênero (Esgúicero e Arcifa, 2010), que deixa clara a necessidade de investimento e aplicação de outras práticas mitigadoras.

1.4 Estratégias conservacionistas

Práticas conservacionistas têm sido aplicadas no mundo todo a fim de recuperar populações de peixes vulneráveis, algumas delas seriam através da recuperação de habitats, redução da sobrepesca e aplicações de estratégias de gestão em populações impactadas, no entanto, a falta de pessoas disponíveis, vontade política, financiamento e identificação dos principais fatores que se deve concentrar a ação de gestão dessas populações, dificultam que estas ações sejam executadas de forma efetiva (Vieira e Pompeu, 2001; Schreier et al., 2012).

Entre as alternativas com objetivo de conservar populações vulneráveis, o repovoamento está entre a mais empregada por concessionárias do setor hidrelétrico. No rio Alto Paraná esta prática é realizada desde a década de 70, quando passou a ser empregada como principal medida mitigadora para as alterações causadas pela construção de barragens na região, sendo feita pela liberação de indivíduos de espécies nativas e não nativas (Vieira e Pompeu, 2001).

O programa de repovoamento está relacionado a algumas estratégias como *captive breeding* e *supportive breeding*, que têm sido empregadas nas últimas décadas com intuito de aumentar, criar, manter e reestabelecer populações ameaçadas ou que sofrem algum tipo de interferência antrópica. A primeira, *captive breeding*, visa reestabelecer ou manter populações naturais através da soltura de juvenis produzidos em piscicultura a partir de reprodutores isolados em cultivo, já a de *supportive breeding* tem o mesmo objetivo produzindo juvenis em piscicultura a partir de reprodutores selvagens (Schreier et al., 2015).

Captive breeding é uma das mais antigas e tradicionalmente aplicadas em todo o mundo. No Brasil, a ação de repovoamento está intimamente ligada ao desenvolvimento

da aquicultura no país, já que a maioria das espécies de peixes com potencial para piscicultura, produzidas em cativeiro, após a década de 30 foram utilizadas nestes programas (Vieira e Pompeu, 2001). A introdução de indivíduos de cultivo em populações naturais podem ter diversas consequências, como a redução do número efetivo populacional e da diversidade genética, tendo em vista que nessa prática é comum o cruzamento de poucos reprodutores produzindo uma quantidade desproporcional de irmãos entre os juvenis liberados na natureza (Araki e Schmid, 2010; Savary et al., 2017). Ou também, pode gerar mistura do pool gênico de populações através da introgressão a partir de indivíduos de cultivo, causando até mesmo uma substituição completa da diversidade original (Perrier et al., 2011; 2013).

Tendo em vista, que o acasalamento entre indivíduos próximos pode levar ao aumento da homozigose e diminuir o potencial adaptativo dos indivíduos liberados na natureza (Sonstebo et al., 2007; Povh et al., 2008), os programas de estocagem e soltura devem ter como principais objetivos reduzir o risco de perda da diversidade genética e da taxa de endocruzamento nos estoques de reprodutores e em populações naturais (Hedrick e Kalinowski, 2000; Woodworth et al., 2002).

Supportive breeding é uma estratégia conservacionista de estocagem altamente empregada para manter alta densidade e auto-manutenção de populações naturais (Heggenes et al., 2006). Programas de estocagem anual que fazem uso de estoques selvagens tem se mostrado eficientes na redução do efeito fundador, fortemente associado a prática de incubação em pisciculturas devido ao número reduzido de reprodutores (Heggenes et al., 2006; Drauch e Rhodes, 2007; Rourke et al., 2010). Savary et al. (2017) associa a soltura de indivíduos locais de truta do ártico, *supportive breeding*, a restabilização do Equilíbrio de Hardy-Weinberg e dos níveis de variabilidade genética, tendo em vista o efeito gargalo sofrido nessa população nas

décadas de 80-90 devido a introdução de indivíduos alóctones. Apesar desta se mostrar útil na manutenção e/ou restabilização de populações naturais, a maioria dos trabalhos tem como maior preocupação a análise genética dos parentais (Povh et al., 2009; Lopera Barrero et al., 2010; Torregroza et al., 2015) ou dos juvenis antes da soltura em ambiente natural (Torregroza et al., 2015), o que pode não dar uma real visão da eficiência de programas de repovoamento e de suas estratégias, tendo em vista que a taxa de sobrevivência de indivíduos soltos que chegam a maturidade sexual não é muito alta (Caudron et al., 2014).

O sucesso ou fracasso destes programas e estratégias de estocagem depende do cuidadoso controle e monitoramento de características genéticas da progênie produzida em cultivo antes da liberação na natureza, assim como controle dos parentais. Mas também, essencialmente do monitoramento da sobrevivência dos indivíduos pós-soltura, dado que a ação de processos evolutivos como a seleção natural ou eventos estocásticos pode levar a mudanças na composição genética dos indivíduos soltos (Schreier et al., 2015), alterando a diversidade genética de populações suplementadas (natural + soltura).

1.5 Marcadores moleculares

A grande diversidade de marcadores genéticos disponíveis atualmente, devido ao grande desenvolvimento de análises genéticas e métodos de genotipagem, permitiu avanço de diversos campos da genética animal, como a sistemática molecular, biologia evolutiva, ecologia molecular, genética populacional e genética conservacionista, auxiliando no estudo de espécies de peixes continentais (Selkoe e Toonen, 2006; Piorski et al., 2008).

Marcadores como as isoenzimas foram muito utilizadas em estudos de populações de peixes até 2000 (Almeida-Val et al., 1990), a variação deste marcador é gerada através da inserção ou deleção no DNA, gerando uma alteração na sequência dos aminoácidos e conseqüentemente na natureza da proteína, estrutura da enzima (Avisé, 2004). As isoenzimas foram aplicadas em estudos de peixes neotropicais com diversas finalidades como, avaliar a diferenciação intraespecífica de populações que divergem por isolamento geográfico (Renno et al., 1990), estimar a diversidade entre populações de peixes marinhos (Beheregaray e Levy, 2000). No entanto, é necessária a aplicação da aplicação de um número alto de *loci* isoenzimáticos (Yazbeck, 2005).

Diversos outros marcadores moleculares, disponíveis hoje, foram desenvolvidos a partir da associação de métodos como sequenciamento e clonagem às enzimas de restrição. Entre eles temos o AFLP (*Amplified Frangment Length Polymorphism*), RAPD (*Random Amplified Polymorphism DNA*), RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*), DNA mitocondrial, sequenciamento de genes nucleares, microssatélites e SNPs (*Single Nucleotide Polymorphisms*) (Piorski et al., 2008).

A escolha do marcador molecular adequado a ser empregado em cada estudo é essencial, para isso algumas características como dominância, conteúdo informativo, neutralidade, custo e reprodutibilidade devem ser levadas em consideração (Solé-Cava, 2001, Piorski et al., 2008).

Técnicas como as de AFLP e RAPD foram abundantemente utilizadas em estudos de diversidade e estruturação genética de espécies como *A. lacustris* (Leuzzi et al., 2004; Oliveira et al., 2005), *P. lineatus* (Oliveira et al., 2005), *Salminus brasiliensis* (Ramella et al., 2006), *Prochilodus argenteus* (Hatanaka et al., 2006), *Leporinus friderici* (Renno et al., 1991). A grande vantagem destas técnicas é que o conhecimento

prévio do genoma não é necessário, no entanto, estas caíram e desuso por sua baixa reprodutibilidade (Piorski et al., 2008).

A técnica de RFLP envolve a clivagem do DNA com uma ou mais enzimas de restrição, também conhecido como PCR-RFLP, onde após a amplificação de uma região conhecida através da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) há a digestão do produto do PCR em sítios diferentes do DNA através de enzimas de restrição (Schlötterer, 2004; Piorski et al., 2008). Esse método, PCR-RFLP, tem sido amplamente empregado para a identificação de espécies (Wolf et al., 2000; Mendonça et al., 2009; Prado et al., 2011).

Os microssatélites e SNPs são atualmente os marcadores moleculares mais utilizados em estudos genéticos em peixes, sendo o primeiro mais aplicado em estudos de parentesco e paternidade tanto em estoques de cultivo quanto e populações naturais (Hansen et al., 2000; Bentzen et al., 2001; Feldheim et al., 2001; Castro et al., 2004, Schwartz et al., 2007; Sourinejad et al., 2011), e o segundo mais aplicados em estudos de diferenciação de espécies (Campbell et al., 2012) e rastreamento de peixes de cultivo em ambientes marinhos (Primmer et al., 2000; Hayes et al., 2005; Glover et al., 2009; Bylemans 2016). Ambos marcadores são amplamente usados no campo da genética, sendo atualmente os SNPs mais empregados. No entanto, pelo fato dos SNPs serem menos polimórficos que os microssatélites, ou seja, são marcadores bialélicos é necessária a aplicação de maior número de SNPs do que microssatélites para resolução de estudos genéticos populacionais. Além disso, esta característica limita sua aplicação em análises de parentesco (Ignal et al., 2002; Hauser et al., 2011). De acordo com Jones et al. (2010) os SNPs têm poder resolutivo baixo para reconstrução de relações de paternidade, tendo em vista que um descendente heterozigoto não fornece informação dos pais. Desta forma, os microssatélites se mostram como ferramentas chaves em diversos estudos genéticos, principalmente em estudos de parentesco.

1.5.1 Loci microssatélites

Os microssatélites, também conhecidos como STR (Short Tandem Repeats) VNTR (Variable Number Tandem Repeats) ou SSR (Simple Sequence Repeats) (Chistiakov, 2006), têm sido aplicados em diversos campos da ciência, como genética da conservação, genética forense, mapeamento genético, medicina forense, entre outras áreas (Chistiakov, 2006; Selkoe e Toonen, 2006). Na aquicultura é considerado como ferramenta chave por permitir caracterização de estoques genéticos, seleção de reprodutores, mapeamento de *loci* com características quantitativas (QTLs) importantes economicamente, identificação de genes responsáveis por essas características e aplicação em programas de cruzamento (Chistiakov, 2006).

A extensa aplicação destes marcadores se deve a sua ampla distribuição no genoma dos eucariotos e procariotos (Litt e Luty, 1989), tanto em regiões codificantes como não codificantes, sendo mais comum em regiões não codificantes nos eucariotos, o que permite ampla cobertura do genoma destes organismos (Metzgar et al., 2000; Chistiakov, 2006). Além disso, os microssatélites são altamente mutáveis, ou seja, são super variáveis entre populações e espécies, codominantes, relativamente pequenos (pares de base – pb), podendo ser amplificados facilmente em pouca quantidade de DNA, apresentam herança mendeliana e alta reprodutibilidade (Taberlet et al., 1999; Schneider et al., 2004; Barroso et al., 2005; Chistiakov, 2006).

Estes marcadores apresentam repetições em tandem de 1 a 6 pb, apresentam repetições di, tri tetra e hexanucleotídica. Sendo as di, tri e tetra mais comuns em estudos genéticos (Tautz, 1989; Selkoe e Toonen, 2006; Chistiakov, 2006).

Os microssatélites são intensamente empregados em estudos genéticos populacionais em espécies de peixes, apontando estruturação ou falta dela em diversas espécies como *Astyanax mexicanus* (tetra-cego) (Bradic et al., 2012), *A. lacustris* (Zaganini et al., en prep.), *Salmo trutta* (truta marrom) (Sonstebo e Borgstrom, 2006), *Piaractus mesopotamicus* (pacu) (Calcagnotto e Desalle, 2009; Ievolino et al., 2010; Lopera-Barrero et al., 2010), *Pimelodus maculatus* (mandi) (Ribolli et al., 2012), *P. lineatus* (Melo et al., 2013, Lopera-Barrero et al., 2016, Ferreira et al., 2017), *Salvelinus alpinus* (truta do ártico) (Savary et al., 2017).

Além de todas essas aplicações, estes marcadores são também muito aplicados em estudos de paternidade e parentesco tanto em cultivo como em populações naturais (Liu e Cordes, 2004). Questões de paternidade ou reconstrução de pedigrees são destinadas aos microssatélites pela sua alta diversidade alélica, o que permite genótipo único para cada indivíduo como se fosse um *tag*, usando poucos *loci* (Queller et al., 1993). Diversos trabalhos mostram a aplicação destes marcadores para estimar relações em populações de espécies importantes economicamente como, *Scophthalmus maximus* (rodabalo) (Castro et al., 2004), *Oncorhynchus mykiss* (truta-arco-íris) (Herbinger et al., 1995; Bentzen et al., 2001) e salmão do Atlântico (Norris et al., 2000; King et al., 2001; Herbinger et al., 2006).

Desta forma, 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).

1.6 Diversidade genética na conservação

A diversidade genética é uma das três formas de biodiversidade reconhecidas pela IUCN (União Internacional para a Conservação da Natureza) que devem ser conservadas (Mc Neely et al., 1990; Frankham, 2010), é considerada a base de grande parte de toda variação biológica, pois permite que populações submetidas a alterações ambientais respondam a pressões ecológicas no sentido contrário à redução populacional ou até mesmo a extinção local (Reed e Frankham, 2003; Wang, 2002; Hughes et al., 2008). Desta forma, a diversidade genética tem consequências na viabilidade e adaptação de populações naturais (Ryman et al., 1995; Reusch et al., 2005; Zeisset e Beebee, 2012), assim como em outras espécies nessa mesma comunidade, chegando em nível de ecossistema (Bailey et al., 2004; Crutsinger et al., 2006; Hughes et al., 2008).

A diferença entre as taxas na qual a variação genética pode ser gerada e perdida é a motivação básica para a conservação da variabilidade genética intraespecífica. A mutação é o único evento capaz de gerar novos alelos, no entanto, é um evento raro e pode ser ignorado por seres superiores em intervalos de centenas ou milhares de anos. Enquanto que a perda e combinação de alelos podem ocorrer de forma extremamente rápida dentro de uma mesma geração (Ryman et al., 1995).

A variação genética apresenta três principais ameaças, a extinção, que leva a perda completa das combinações de genes, a hibridação, não resulta necessariamente na perda completa de genes, mas sim no rearranjo destes e a perda da variação genética (Ryman et al., 1995). A quantidade de diversidade genética perdida é principalmente discutida em termos de redução da heterozigosidade (H_E). Esse parâmetro é diretamente

proporcional ao número efetivo populacional (N_e). Assim, populações com tamanhos restritos apresentam maior risco de sofrerem efeitos de deriva genética e endocruzamento (Ryman et al., 1995). Problemas relacionados à manipulação do N_e tem sido notado no contexto de programas de soltura (Schreier et al., 2012, Schreier et al., 2015). Diversas publicações discutem o tamanho mínimo necessário para manter a população geneticamente variável e viável (Allendorf e Utter, 1979, Chesser et al., 1980, Franklin, 1980, Soulé, 1980, Nelson e Soulé, 1987).

1.6.1 Análises familiares na genética da conservação

Análises familiares são de extrema importância em várias áreas da pesquisa, especialmente à biologia da conservação, pois permitem a compreensão da população em vários aspectos como, dispersão, comportamento social e sua distribuição (Wilson Ferguson, 2002; Jones e Wang, 2010; Harrison et al., 2013). No caso de populações suplementadas, estas análises se tornam essenciais considerando a necessidade do controle/manutenção da diversidade genética, o efeito do N_e somado aos efeitos das variações ambientais nestas populações.

Estudos familiares podem ser feitos através da estimativa dos níveis de parentesco, pedigree ou estrutura familiar (Jones e Wang, 2010).

Em ambientes controlados, as relações familiares podem ser facilmente construídas por observação, o que não é possível em populações naturais (Ryman et al., 1995, Blouin, 2003; Pemberton, 2008). Ainda assim, nesse segundo caso o estabelecimento das relações familiares podem ser estimadas através de dados gerados por marcadores moleculares (Ryman et al., 1995; Wang e Santure, 2009; Crook et al., 2015).

Em paralelo ao incremento dos marcadores moleculares na genética, diversos métodos estatísticos têm sido desenvolvidos para análise de dados moleculares e estabelecimento das relações familiares (Blouin, 2003; Jones e Ardren, 2003). Todos baseados em herança mendeliana, partem do simples conceito de que os pais passam um de dois alelos para a prole, o que assim carrega um alelo de cada pai, apesar de parecer simples, a aplicação disso torna-se dificultosa quando aplicada a ambientes naturais de grande extensão, pois neste caso nem todos os parentais podem ser amostrados (Wang e Santure, 2009; Crook et al., 2015, Wang, 2016).

A atribuição da relação pais-descendentes pode ser feita através de quatro métodos: exclusão, atribuição categórica, atribuição fracionária e reconstrução de pedigree (Jones et al., 2010). Os métodos mais adotados são os de exclusão e atribuição categórica, onde os genótipos de cada prole são comparados com os genótipos de cada pai (Harrison et al., 2013). O método de exclusão permite a eliminação de determinado pai, quando esse não compartilha pelo menos um alelo de determinado *loci* com a prole. Quando não é possível excluir mais de um candidato pai o método de atribuição categórica pode ser aplicado, onde é medida a probabilidade (*likelihood*) de cada suposto pai-descendente de ser verdadeiro doador de seus respectivos genótipos *multiloci* (Nielsen et al., 2001, Gerber et al., 2003, Kalinowski et l., 2007).

Desse modo, os *loci* microssatélites se tornaram extremamente empregados em análises de parentesco e estrutura familiar (Chistiakov et al., 2006). Por apresentar características como alto polimorfismo e herança co-dominante, estes marcadores permitem a obtenção de genótipos únicos para cada indivíduo (Scheineider et al., 2004; Barroso et al., 2005; Chistiakov, 2006).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

O presente trabalho pretendeu avaliar a eficiência de repovoamentos realizados na região do rio Sapucaí-Mirim para *A. lacustris*, espécie modelo para testar a hipótese da funcionalidade do método de repovoamento em espécies migradoras de curta distância, propondo estratégias de manejo adequadas para a mitigação dos impactos causados por estes empreendimentos ao longo do rio.

2.2 Objetivos específicos

Tendo em vista o importante papel desempenhado pela diversidade genética populacional nos ecossistemas aquáticos continentais e da necessidade de estabelecer estratégias de conservação a fim de minimizar os impactos causados pela construção de PCHs em tributários como o rio Sapucaí-Mirim, o presente trabalho teve por objetivo:

- 1.** avaliar o potencial dos indivíduos coletados de populações naturais para a formação de bancos de reprodutores, através do uso de *loci* microssatélites
- 2.** estimar a estrutura genética de populações naturais de *A. lacustris*, com o objetivo de avaliar os efeitos dos repovoamentos nas PCHs Retiro e Palmeiras e propor manejo adequado destas.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Área de amostragem

O estudo foi conduzido na bacia do rio Sapucaí-Mirim, bacia que se integra a bacia do rio Grande e atravessa os estados de São Paulo e Minas Gerais. O rio Sapucaí-Mirim nasce na Serra da Mantiqueira, na cidade de Campos de Jordão, SP e desagua na cidade de Furnas, atravessando aproximadamente 343 km (34 dentro do estado de São Paulo e 309 km em Minas Gerais). Esta bacia é constituída por três trechos, o Alto Sapucaí (50km), Médio Sapucaí (90km) e Baixo Sapucaí (143 km) (CBH Sapucaí, 2018).

O trecho de amostragem foi o Médio Sapucaí, área onde estão localizadas duas PCHs, PCH Palmeiras e PCH Retiro (Figura 1). Estas duas PCHs somam área de aproximadamente 5,29 km² de reservatório (CTG Brasil, 2018) (Figura 2). Nessa região, há a construção de escadas de peixes e ações de repovoamentos como ações mitigadoras desde o início do funcionamento destas. A PCH Palmeiras teve início das operações em 2012, enquanto que a PCH Retiro teve início em 2013. As amostragens foram feitas através de tarrafa e pesca convencional (vara de pescar), sendo amostrados pontos ao longo do reservatório e nas escadas de transposição de cada PCH no período de 2015 a 2017.

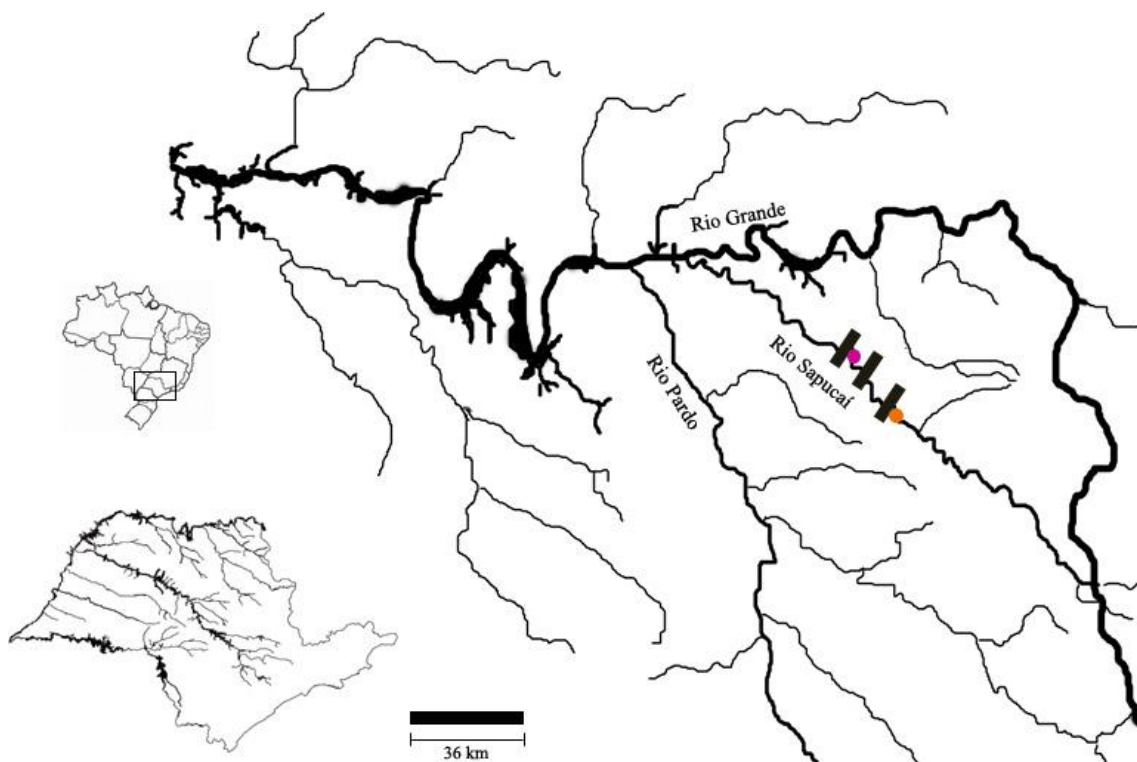


Figura 1. Áreas de amostragem de *Astyanax lacustris* (PCH Retiro representada pelo ponto rosa e PCH Palmeiras representada pelo ponto laranja) no rio Sapucaí-Mirim, onde estão localizadas as duas Pequenas Centrais Hidrelétricas (PCH), bacia do Alto Paraná, estado de São Paulo, Brasil.



Figura 2. Pequenas Centrais Hidrelétricas (PCHs) situadas no rio Sapucaí-Mirim. a' e a'': PCH Palmeiras; b' e b'': PCH Retiro.

3.2 Material Biológico

No total foram capturados 713 de *A. lacustris*, coletados ao longo do rio Sapucaí-Mirim (Tabela 1). Os exemplares correspondem a várias capturas temporais do ano de 2015 a 2017, através de parceria com o Laboratório de Genética em Aquicultura e Conservação (LAGeAC) do Centro de Aquicultura da Unesp (Caunesp). Em geral todos os indivíduos foram coletados no período de reprodução de *A. lacustris*, no período de dezembro a abril.

Todos os exemplares tiveram fragmentos de suas nadadeiras caudais coletadas, conservadas em álcool absoluto 95% em tubos de microcentrífuga e levadas ao Laboratório de Genética e Peixes (LAGENPE), Unesp - Bauru, São Paulo, compondo o banco de tecidos para análises genéticas.

Dos 713 indivíduos, 207 foram encaminhados e mantidos em duas pisciculturas localizadas no estado de São Paulo, piscicultura Projeto Peixe (município de Sales de Oliveira) e no Centro de Aquicultura da Unesp (Caunesp) (Jaboticabal) a fim de manter o banco de reprodutores voltados a prática de repovoamento no rio Sapucaí-Mirim. Os 506 indivíduos restantes tiveram amostras de nadadeiras coletadas objetivando o estudo dos efeitos do repovoamento.



Figura 3. Exemplar de *Astyanax lacustris* (lambari do rabo amarelo).

Tabela 1. Pontos e anos de coleta de *Astyanax lacustris*.

Localidade	Número amostral		
	<i>N</i> (2015)	<i>N</i> (2016)	<i>N</i> (2017)
Reservatório PCH Retiro	64	20	80
Escada PCH Retiro	97	-	-
Reservatório PCH Palmeiras	65	118	-
Escada PCH Palmeiras	62	-	-
Total	288	138	80

Localidade - região onde foram amostrados os indivíduos de *Astyanax lacustris* (Escada/Reservatório) de cada PCH, *N* - número de amostra por ano.

3.3 Marcação dos exemplares de *Astyanax lacustris*

Com intuito de manter os estoques de reprodutores de populações naturais da espécie *A. lacustris*, os indivíduos selecionados para formar banco de reprodutores foram identificados com *tags* magnéticas e mantidos vivos em tanques de pisciculturas.

Tags magnéticas são como pequenos bastonetes de metal magnetizados, que apresentam sistema de identificação semelhante ao código de barras. O procedimento de marcação dos exemplares segue como descrito por Porto-Foresti (2001) (Figura 4). Para facilitar sua manipulação os animais primeiramente são anestesiados em solução de 2g de anestésico (benzocaína) diluídos em 20 L de água, a *tag* é introduzida na região

lombar do peixe, próximo à nadadeira dorsal, com auxílio da seringa injetora. Depois da identificação, sempre que necessário, o espécime pode ser identificado com auxílio do equipamento de leitura.



Figura 4. Identificação dos espécimes usando marcadores magnéticos (*tag*). a - leitor, *tag* e seringas; b - introdução da *tag* subcutânea com auxílio da seringa injetora; c- leitura da *tag* com auxílio do leitor.

3.4 Extração de DNA

A extração de DNA foi feita a partir de fragmentos de nadadeira caudal coletados dos indivíduos amostrados, 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 μl de *Nuclei Lysis Solution* e 4,0 μl de *Proteinase K*, sendo as amostras incubadas por 2 horas a 60°C. Após esse período foram adicionados 4,0 μl de *RNAse*, sendo incubado no banho-maria a 37°C por 30 minutos. Posteriormente foram adicionados 200 μl de *Protein Precipitation Solution* e levados ao gelo por 15 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 μl de isopropanol a temperatura ambiente. Uma nova centrifugação de 4 minutos a 13.000 rpm foi realizada, descartando novamente o sobrenadante após acentrifugação. 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 esta etapa, o resultado da extração e purificação de DNA genômico, assim como sua integridade foi verificada por meio do gel de agarose 1% corado com o corante fluorescente GelRed™ 1X (Uniscience) e visualizado através de transiluminador UV (Loccus Biotecnologia). A partir da amostragem e extração do DNA genômico foram aplicados marcadores moleculares do tipo microssatélite nas populações amostradas, a propósito de analisar a diversidade genética intra e interpopulacional e quantificar a recaptura de indivíduos soltos na natureza em repovoamentos.

3.5 Seleção e aplicação dos *loci* microssatélites

Para o estudo da diversidade genética, estrutura populacional e efeitos de repovoamentos em populações de *A. lacustris* do rio Sapucaí-Mirim foram selecionados *loci* microssatélites. Oito *loci* microssatélites de 11 descritos por Zaganini et al. (2012) foram pré- selecionados, tendo em conta critérios úteis em estudos genético populacionais, como grau de polimorfismo, especificidade e alelos nulos.

Para a otimização destes *loci* os protocolos de amplificação foram adaptados da literatura, sendo feitas modificações nas concentrações de DNA, dNTPs e temperatura de anelamento.

3.5.1 Seleção dos loci microssatélites e ajustes das reações moleculares

Para a amplificação dos microssatélites foi empregada à técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), através do uso de pares de *primers*, *foward* (F) e *reverse* (R) (Tabela 2). Através das características de cada *locus*, sistemas de sequenciamento em conjunto foram feitos, levando em consideração o tamanho (pb) para cada *locus*. Desta forma, todos os *primer foward* (F) foram marcados na posição 5' com os seguintes fluorocromos: PETTM, FAMTM, NETTM e VICTM (Applied Biosystems). A fluorescência para cada *primer* foi desenhada de forma que os *loci* de mesmo tamanho não compartilhassem o mesmo fluorocromo (Tabela 3).

A amplificação dos *loci* microssatélites foi conduzida em duas reações diferentes com apenas um par de *primers*, *foward* (F) e *reverse* (R), separadamente. A reação para os *loci* *Asty* 4, *Asty* 12, *Asty* 15, *Asty* 21 e *Asty* 23 contém volume final de 18,5 µl com as seguintes concentrações, 1,4X de Buffer, 94 µM de dNTPs, 3,12 mM de MgCl₂, 2,5 mM de cada *primer*, 0,25 U de *Taq* e 10- 30 ng de DNA. A reação para os *loci* *Asty* 16, *Asty* 26 e *Asty* 27 contém volume final de 25 µl, com as seguintes concentrações, 1X de Buffer, 150 µM de dNTPs, 1,5 mM de MgCl₂, 2 mM de cada *primer*, 0,2 U de *Taq* e 10- 30 ng/µl de DNA. Todos os *loci* microssatélites foram amplificados no termociclador Veriti 96-Well Thermal Cycler (Applied Biosystems), seguindo as condições de desnaturação inicial a 95° C por 5 min, seguida de 35 ciclos que inclui desnaturação a 95° C por 30 s, hibridização variando de 55° C a 60° C por 30s, desnaturação a 72° C por 5s e extensão final a 72° C por 5 min (mais detalhes tabela 3).

As amostras amplificadas foram genotipadas utilizando o sequenciador automático ABI 3730xl DNA Analyzer (Applied Biosystems), os resultados foram

analisados GeneMapper versão 4.0 (Applied Biosystems) e revisados manualmente para sua verificação.

Tabela 2. Descrição dos *loci* microssatélites desenvolvidos para *Astyanax lacustris* por Zaganini et al. (2012).

<i>Loci</i>	Sequência do <i>primer</i>	Repetição	Tamanho (pb)	Ta (°C)
Asty 4	GGTCACTGGAGGACAGATGTT GGCATGTGCTTGAATGGA	(AC) ₁₇	200	53
Asty 12	AGACACAATCAGCCGCCGAAATG ATCCCCTCTCCACAACCCAACACA	(GT) ₈	163	58
Asty 15	CAACTTTTACTTAAAACCTGC ATGGGTCTTTACTGCTGAATGTAT	(AC) ₁₇ -(CT) ₆	212	50
Asty 16	AAAGTAAAGGGCATCTGTGGAGAA AGAGGGCATCATTGTACATTTTTG	(AC) ₁₀	165	52
Asty 21	TTTATGGGGACCGTGAGATGTGC CAGGGGCAGCGGTGATACCT	(CA) ₉	150	57
Asty 23	TCAATGGAACCTATGGACAAC GTGGGAAGTAGCCTAATAAATA	(CA) ₁₂	160	52
Asty 26	CCCATTGATCCTGCCTCTAA CAGTCCTGACACAGAGAT	(GT) ₈	190	58
Asty 27	GCATTGTTTCAGGTTGGGTCT AAACGTGGTGAGAGGGAGTG	(GT) ₈	150	58

Loci - identificação de cada *locus*; Sequência do *primer* - sequência do par de *primer* (*forward* e *reverse*); Repetição - motivo de repetição de cada *loci*; Tamanho - tamanho de cada *loci* em pares de bases (pb); Ta - temperatura de anelamento.

Tabela 3. *Loci* analisados em *Astyanax lacustris*.

<i>Loci</i>	Tamanho (pb)	Ta (°C)	Fluorocromo	SET ABI
Asty 4	200	55	FAM	I
Asty 15	163	55	VIC	I
Asty 16	212	55	PET	I
Asty 23	165	60	NED	I
Asty 12	160	60	PET	II
Asty 21	190	55	NED	II
Asty 26	150	60	FAM	II
Asty 27	200	60	FAM	II

Loci - identificação do *locus*; Tamanho - tamanho de cada *locus* em pares de base (pb), Ta - temperatura de anelamento de cada par de *primer*, Fluorocromo - marcação fluorescente de cada *primer forward* (F), Set ABI - *loci* genotipados em sets.

3.6 Análise dos dados

Os dados produzidos foram analisados através de programas estatísticos para a descrição da diversidade, estruturação e efeitos de repovoamentos de populações naturais.

3.6.1 *Diversidade genética e estruturação de A. lacustris*

3.6.1.1 *Diversidade genética intrapopulacional*

A presença de alelos nulos, problemas de nomeação alélica, alelos *dropout* e *stuttering* foram verificados através do MICRO-CHECKER versão 2.2.3 (Van Oosterhout et al., 2004).

A diversidade genética por *locus* foi estimada usando número de alelos (A), heterozigosidade esperada (H_E) e heterozigosidade observada (H_O) através do programa ARLEQUÍN 3.1 (Excoffier et al., 2010). Para a estimativa dos desvios do equilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE) e do índice de fixação (F_{is}) foi empregado o programa GenePop versão 3.4 (Raymond e Rousset, 1995). O nível de endogamia intrapopulacional e de riqueza alélica (A_R) foram estimados utilizando o *software* Fstat, 2.9.3 (Goudet, 2002). E por fim, o número efetivo populacional (N_e) foi estimado através do programa NeEstimator versão 2.01 (Peel et al., 2004), utilizando frequência alélica mínima (MAF) de 0,1 e o método de desequilíbrio de ligamento.

3.6.1.2 *Diversidade genética entre populações*

Para avaliar a estruturação genética entre populações de *A. lacustris*, foram obtidos os índices de diferenciação populacional (F_{ST}) (Weir e Cockerham, 1984)

através do programa ARLEQUÍN 3.1 (Excoffier et al., 2010), o teste múltiplo foi conduzido com 10.000 permutações. Valores significantes (P -value $<0,05$) foram ajustados usando correção sequencial de Bonferroni (Rice, 1989).

Adicionalmente foi empregado o programa STRUCTURE 2.3.1 (Pritchard et al., 2000), através do qual foram conduzidas análises de desagregação em métodos bayesianos com intuito de estimar número de unidades populacionais (K), atribuindo os indivíduos a suas populações de origem, a partir das frequências alélicas baseado no critério descrito por Evanno et al. (2005). Foi permitido o modelo de ancestralidade não misturada (*no admixture model*) a propósito de permitir uma resolução máxima, uma vez que este parâmetro assume que cada indivíduo vem exclusivamente de uma das populações e é mais indicado para verificar uma estruturação populacional sutil (Pritchard et al., 2000). Foram utilizados alelos correlacionados, 20 réplicas para cada valor de K , 500.000 gerações da cadeia de Markov Monte Carlo (MCMC), com períodos de *burn-in* de 200.000 e assumindo K de 2 a 10 para a espécie em estudo.

3.6.2 Estudo das relações familiares

As relações familiares entre indivíduos de populações de *A. lacustris* foram estimadas através da análise de parentesco aos pares e da atribuição da relação pais-descendentes.

3.6.2.1 Análise de parentesco

Com o propósito de analisar o potencial dos microssatélites para a estimativa de parentesco, a probabilidade de não exclusão dos candidatos pais e o nível de parentesco entre os indivíduos amostrados foram estimados. Média de não exclusão de paternidade para um candidato pai (NE-1P) e média de probabilidade de não exclusão para segundo

candidato pai (NE-2P) foi estimado usando o *software* CERVUS versão 3.0 (Kalinowski et al., 2007).

As análises de parentesco aos pares foi medida através do pacote de Análises de Padrões Espaciais de Diversidade Genética (SPAGeDI) versão 1.4 (Hardy e Vekemans, 2002), através do coeficiente (r) descrito por Wang (2002). Os valores do coeficiente r aos pares permitiram a classificação de três níveis de parentesco entre os indivíduos, considerando o seguinte critério: irmãos-completos (FS), com $r > 0,375$; meios-irmãos (HS) com valores de r entre 0,125 e 0,375 e não aparentados (UR), com $r < 0,125$ (Pino-Querido et al., 2010).

3.6.2.2 *Estimativa da relação pai-descendentes*

Para a atribuição da relação pai-descendentes foi empregado o programa CERVUS versão 3.0 (Kalinowski et al., 2007), que usa o método de atribuição categórica por verossimilhança (*likelihood*). A probabilidade de cada candidato pai (ou casal) ser candidato à descendência testada, foi obtida a partir do *log* da relação de verossimilhança (“*LOD score*”) daquele candidato sendo o pai verdadeiro em relação a um indivíduo tomado aleatoriamente da população de referência.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados e discussão dos dados obtidos no presente trabalho, relacionados à diversidade genética, estruturação populacional e efeitos dos repovoamentos em populações de *Astyanax lacustris* foram organizados em forma de dois capítulos:

Capítulo 1

Genética aplicada à seleção de estoques de reprodutores de *Astyanax lacustris* (Characidae, Teleostei) em programas de repovoamento

Capítulo 2

Monitoramento genético pós-soltura em programas de *supportive breeding* de populações de *Astyanax* na bacia do Alto Paraná

CAPÍTULO 1

Genética aplicada à seleção de estoques de reprodutores de *Astyanax altiparanae* (Characidae, Teleostei) em programas de repovoamento

Resumo

Em face das ameaças que os ecossistemas aquáticos vêm sofrendo, diversas ações mitigadoras são aplicadas a fim de manter ou recuperar a diversidade genética de populações vulneráveis. O repovoamento está entre as práticas mais empregadas com essa finalidade, no entanto, o sucesso desta prática depende de vários fatores como o estudo e monitoramento genético dos bancos de reprodutores. Desta forma, o presente trabalho aplicou marcadores microsatélites para analisar geneticamente os níveis de diversidade genética e o grau de parentesco de dois estoques de reprodutores de *A. altiparanae*, provenientes de populações naturais do rio Sapucaí. Foram genotipados sete *loci* microsatélites em 207 indivíduos pertencentes a dois bancos de reprodutores de anos consecutivos (2015 e 2016). Os estoques de reprodutores apresentaram-se similares, entre si, em relação ao número de alelos, riqueza alélica, heterozigosidade observada e esperada, apresentando alta diversidade genética ($A = 24, 35$; $A_R = 16,27$; $H_O = 0,699$; $H_E = 0,856$). A análise de parentesco mostrou indivíduos com baixo grau de parentesco, o estoque de 2015 apresentou total de 86,40% de indivíduos não aparentados e o de 2016 apresentou 91,74%. Os indivíduos amostrados apresentaram alto valor de diversidade genética, o que mostra que estes indivíduos apresentam bom potencial para formar estoques de reprodutores em práticas de conservação.

Introdução

Os peixes constituem um grupo muito diverso entre os vertebrados (Nelson et al., 2006; Reis et al., 2016). O Brasil abriga a maior diversidade de espécies continentais devido a grande heterogeneidade de suas bacias (Léveque et al., 2008; Reis et al., 2016), apesar disso, estes ecossistemas tem perdido grande proporção de seus habitats e conseqüentemente de suas espécies (Agostinho et al., 2008). Alterações como poluição, inserção de espécies exóticas, fragmentação, modificação do fluxo natural dos rios e sobrepesca têm sido considerados grande ameaça às espécies continentais, especialmente às espécies de peixes (Agostinho et al., 2008; Jelks et al., 2008).

A construção de barramentos para a produção de energia está entre a mais profunda alteração ambiental para espécies de ambientes dulcícolas (Reis et al., 2016). A construção de hidrelétricas, assim como a de Pequenas Centrais hidrelétricas alteram todo o sistema do rio, alterando todo o padrão de distribuição de espécies migradoras e de certa forma podendo levar a extinção das espécies que não conseguem se adaptar às alterações (Godinho e Godinho, 1994; Agostinho et al., 2008).

Uma forma de minimizar essa ameaça é a criação e aplicação adequada de projetos de recuperação de habitats, de redução da sobrepesca de populações de espécies ameaçadas e de levantamento genético e biológico prévio e posterior à interferência humana nestes ecossistemas (Schreier et al., 2012). No entanto, a falta de esforço e financiamento político e de projetos com objetivos bem definidos tem dificultado estas ações (Vieira e Pompeu, 2001; Schreier et al., 2012), levando a má ou não execução de projetos de levantamento e monitoramento genético e biológico de populações de peixes vulneráveis.

Os ambientes aquáticos, de forma geral sofrem ameaças resultantes de profundas alterações no curso dos rios, assim como nos ambientes marinhos. Diversos trabalhos apontam a aquicultura conservacionista aliada a programas de soltura de alevinos, como uma ferramenta que pode ser aplicada em conjunto com fatores ecológicos para a conservação/manutenção de populações impactadas por alterações ambientais (Doyle et al., 2001; Schreier et al., 2012; Lopera-Barrero et al., 2016a; b).

Apesar da aquicultura conservacionista se apresentar como uma ferramenta importante há diversos problemas que vêm com a aplicação desta. Como por exemplo, quando ocorre a liberação na natureza de indivíduos provenientes de cultivo, que apresentam *pool* gênico diferenciado dos indivíduos selvagens, gerando introgressão genética a partir dos indivíduos de cultivo ou até mesmo total substituição do *pool* gênico da população natural (Schreier et al., 2012; 2015). Outro grande problema da estocagem de indivíduos em cultivo para a propagação em ambiente natural é o uso do número limitado de reprodutores para a produção de milhões de descendentes, o que gera o efeito gargalo de garrafa, levando a redução da variabilidade genética (Pante et al., 2001). Além disso, a seleção de poucos indivíduos sem considerar as características genéticas destes, pode levar ao risco de endocruzamento nos estoques (Pante et al., 2001; Aho et al., 2006).

Projetos de repovoamentos, com estratégias como o *supportive breeding* para manutenção de populações vulneráveis, devem ter como objetivo principal o repovoamento com peixes provenientes da mesma população, a fim de evitar a mistura e desequilíbrios e perda de adaptações. Além de reduzir ao máximo a taxa de endocruzamento, através do conhecimento genético dos bancos de reprodutores (Hedrick e Kalinowski, 2000; Woodworth et al., 2002).

O presente trabalho aplicou marcadores microssatélites em estoque reprodutores provenientes de populações naturais voltados à prática de repovoamento de *Astyanax altiparanae*. Espécie amplamente distribuída na bacia do rio Paraná, região sudeste do Brasil, onde estão há a construção de UHEs e PCHs em diversos rios e tributários, assim como o rio Sapucaí, tributário importante da bacia do Alto Paraná, onde há a construção de três Pequenas Centrais Hidrelétricas (PCHs) que estão ativas desde o ano de 2013.

O objetivo do trabalho foi verificar o potencial dos indivíduos para a formação de estoques de reprodutores empregados em programas de repovoamento no rio Sapucaí, assim como validar os microssatélites como ferramentas aplicáveis para monitoramento de estoques mantidos em pisciculturas.

Material e métodos

Amostragem e extração de DNA

Foram analisados 207 indivíduos de *A. altiparanae* provenientes de populações naturais, sendo 180 espécimes coletados no ano de 2015 e 27 coletados no ano de 2016 a fim de formar e manter o banco de reprodutores de programas de repovoamento realizado no rio Sapucaí, bacia do Alto Paraná, São Paulo, Brasil. As amostras foram coletadas em duas PCHs construídas ao longo do rio, PCH Palmeiras e PCH Retiro, que tiveram seu funcionamento iniciado nos anos de 2012 e 2013, respectivamente (Figura 1).

Para identificação posterior, cada indivíduo foi marcado com tags magnéticas como descrito por Porto-Foresti (2001), e mantidos em tanques de pisciculturas a fim de estabelecer um banco de reprodutores para propagação na natureza pela prática de

repovoamento. Amostras de nadadeiras foram preservadas em álcool 95% e mantidos no banco de tecidos do Laboratório de Genética de Peixes (LAGENPE), Universidade Estadual Paulista (Unesp), Bauru, São Paulo, Brasil.

O DNA foi extraído e purificado através do kit comercial “Wizard Genomic Purification kit-Promega” e teve sua integridade verificada através de gel de agarose 1% corado com GelRed 1X (Uniscience) e visualizado em transiluminador UV (Loccus Biotecnologia).

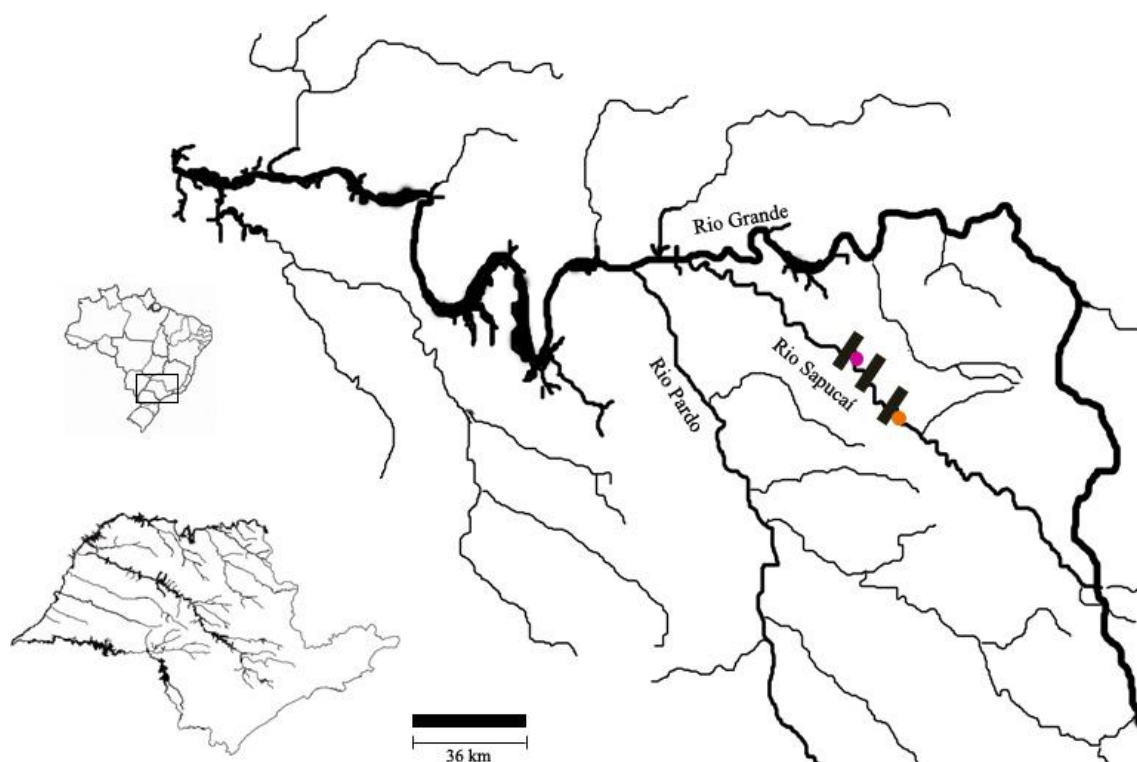


Figura 1. Áreas de coleta dos estoques de reprodutores de *Astyanax altiparanae* (ponto rosa representa a PCH Retiro e o ponto laranja a PCH Palmeiras) no rio Sapucaí, onde estão localizadas as duas Pequenas Centrais Hidrelétricas (PCH), bacia do Alto Paraná, estado de São Paulo, Brasil.

Amplificação e genotipagem dos loci microssatélites

Os oito *loci* empregados no presente estudo foram previamente descritos por Zaganini et al. (2012) para *A. altiparanae*. Todos os *primers forward* (F) foram marcados na posição 5' com os seguintes fluorocromos: PETTM, FAMTM, NETTM, e VICTM (Applied Biosystems) e combinados para serem sequenciados em conjunto, considerando a variação do tamanho alélico (Tabela 1).

A amplificação dos *loci* microssatélites foi conduzida em duas reações diferentes com apenas um par de *primers, forward* (F) e *reverse* (R), separadamente. A reação para os *loci* Asty 4, Asty 12, Asty 15, Asty 21 e Asty 23 contém volume final de 18,5 µl com as seguintes concentrações, 1,4X de Buffer, 94 µM de dNTPs, 3,12 mM de MgCl₂, 2,5

mM de cada *primer*, 0,25 U de *Taq* e 10 a 30 ng de DNA. A reação para os *loci* Asty 16, Asty 26 e Asty 27 contém volume final de 25 μ l, com as seguintes concentrações, 1X de Buffer, 150 μ M de dNTPs, 1,5 mM de $MgCl_2$, 2 mM de cada *primer* e 0,2 U de *Taq*. Todos os *loci* microssatélites foram amplificados no termociclador Veriti 96-Well Thermal Cycler (Applied Biosystems), seguindo as condições de desnaturação inicial a 95° C por 5 min, seguida de 35 ciclos que inclui desnaturação a 95° C por 30 s, hibridização variando de 55° C a 60° C por 30s, desnaturação a 72° C por 5s e extensão final a 72° C por 5 min (mais detalhes tabela 1).

As amostras foram genotipadas no sequenciador automático ABI 3730xl DNA Analyzer (Applied Biosystems) e os resultados foram analisados no programa GeneAmp version 4.0 (Applied Biosystems).

Tabela 1. Loci analisados em *Astyanax altiparanae*.

Loci	Sequência do primer	Repetição	Tamanho (pb)	Ta (°C)	Fluorocromo	SET ABI
Asty 4	GGTCACTGGAGGACAGATGTT GGCATGTGCTTGAATGGA	(AC) ₁₇	200	55	FAM	I
Asty 15	CAACTTTTACTTAAAACCTGC ATGGGTCTTTACTGCTGAATGTAT	(AC) ₁₇ -(CT) ₆	212	55	VIC	I
Asty 16	AAAGTAAAGGGCATCTGTGGAGAA AGAGGGCATCATTGTACATTTTTG	(AC) ₁₀	165	55	PET	I
Asty 23	TCAATGGAACCTATGGACAAC GTGGGAAGTAGCCTAATAAATA	(CA) ₁₂		60	NED	I
Asty 12	AGACACAATCAGCCGCCGAAATG ATCCCCTCTCCACAACCCAACACA	(GT) ₈	160	60	PET	II
Asty 21	TTTATGGGGACCGTGAGATGTGC CAGGGGCAGCGGTGATACCT	(CA) ₉	190	55	NED	II
Asty 26	CCCATTGATCCTGCCTCTAA CAGTCCTGACACAGAGAT	(GT) ₈	150	60	FAM	II
Asty 27	GCATTGTTTCAGGTTGGGTCT AAACGTGGTGAGAGGGAGTG	(GT) ₈	200	60	FAM	II

Loci - identificação do locus; Tamanho - tamanho de cada locus em pares de base (pb), Ta - temperatura de anelamento de cada par de primer, Fluorocromo - marcação fluorescente de cada primer forward (F), Set ABI - loci genotipados em sets.

Análise dos dados

Os microssatélites foram empregados para estimar os valores de diversidade genética intra e interpopulacional dos estoques de reprodutores, além do grau de parentesco entre os reprodutores de cada ano. Dos oito microssatélites, Asty 21 foi excluído das análises dos dois estoques por problemas de amplificação.

Diversidade genética

A diversidade genética por *locus* e total foi estimada usando o número de alelos (A), heterozigosidade esperada (H_E) e heterozigosidade observada (H_O) usando o *software* ARLEQUÍN versão 3.1 (Excoffier et al., 2010). Desvios do equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) e índice de fixação (F_{is}) foram estimados usando o GENEPOP versão 3.3 (Raymond e Rousset, 1995). Riqueza alélica foi estimada através do programa Fstat versão 2.9.3 (Goudet, 2002). O tamanho efetivo populacional (N_e) foi estimado através do programa NeEstimator versão 2.01 (Peel et al., 2004), utilizando frequência alélica mínima (MAF) de 0,1 e o método de desequilíbrio de ligamento.

Análise de parentesco

Com o objetivo de analisar o potencial dos marcadores microssatélites para estimativas de parentesco, a probabilidade de não exclusão de candidatos pais e o nível de parentesco entre eles foram avaliados. A probabilidade média de não exclusão de paternidade para um candidato pai (NE-1P) e a probabilidade média de não exclusão para segundo pai (NE-2P) foram estimadas usando o programa CERVUS versão 3.0 (Kalinowski et al., 2007).

A análise de parentesco aos pares foi estimada usando o *Pacote Análise de Padrões Espaciais de Diversidade Genética* (SPAGeDI) versão 1.4 (Hardy e Velemans, 2002), através do coeficientes de parentesco descrito por Wang (2002). Valores de r

entre os pares de indivíduos permitiu classificá-los em categorias de parentesco, considerando o seguinte critério: irmãos-completos (FS), quando $r > 0,375$; meio-irmãos (HS), quando r estiver entre 0,125 e 0,375; e não aparentados (UR) quando $r < 0,125$ (Pino-Querido et al., 2010).

Resultados

Diversidade genética

Os *loci* aplicados no presente trabalho demonstraram alta variabilidade genética em ambos os estoques de *Astyanax altiparanae* analisados ($A = 24, 35$ e $A_R = 16,27$; $H_E = 0,856$) (Tabela 1). O estoque Rp 2015 valores médios: $A_R = 16,85$; $H_O = 0,732$; $H_E = 0,849$ e o estoque Rp 2016 apresentou valores médios de: $A_R = 15, 69$; $H_O = 0,666$; $H_E = 0,856$. Além disso, foi estimado o número efetivo populacional (N_e) dentro de cada estoque. Não foi encontrada grande diferença entre o tamanho amostral (N) e o tamanho efetivo populacional (N_e) em ambos. Rp 2015 apresentou N_e de 141,4 e Rp 2016 apresentou N_e de 25, ambos considerando a menor frequência de alelos de 0,05. Os dois estoques apresentaram valores de número de alelos bem diferentes entre eles, o Rp 2015 ($A = 32,42$) apresentou A maior que Rp 2016 ($A = 16,28$), o que reflete a diferença no tamanho amostral. Porém os valores de riqueza alélica ($A_R = 16,85$ e $A_R = 15,69$) e heterozigosidade esperada ($H_E = 0,863$ e $H_E = 0,849$) foram muito similares.

Desvios significativos do EHW, após a correção de Bonferroni ($P < 0,007$) foram observados para dois *loci* em Rp 2015 e Rp 2016 (Asty 15 e Asty 16), sendo que o Rp 2015 apresentou desvios significativos para mais dos *loci* (Asty 26 e Aty 27). Os valores do índice de fixação (F_{is}) se mostraram positivos e significativos variando de -0,001 a 0,625, após a correção de Bonferroni ($P < 0,007$) quatro *loci* apresentaram

valores significativos (Asty 15, Asty 16, Asty 23 e Asty 27) nos dois estoques (Todas as estimativas e estatísticas de diversidade estão na Tabela 1).

Tabela 2. Diversidade alélica média dos sete *loci* microssatélites aplicados em *Astyanax altiparanae*.

	Estoque 2015 (Rp 2015)	Estoque 2016 (Rp 2016)
<i>Média</i>		
<i>A</i>	32,42	16,28
<i>A_R</i>	16,85	15,69
<i>H_O</i>	0,732	0,666
<i>H_E</i>	0,863	0,849
<i>Fis</i>	0,146	0,207
NE-1P	$3,96 \times 10^{-4}$	$2,01 \times 10^{-3}$
NE-2P	$1,32 \times 10^{-5}$	$8,9 \times 10^{-5}$

A – número de alelos por *locus*; *H_O* – heterozigosidade observada; *H_E* - heterozigosidade esperada; *Fis* – índice de fixação; NE-1P – média de valores de não exclusão para primeiro pai candidato, NE-2P média de não exclusão para segundo pai candidato.

Análise de parentesco

Considerando os efeitos em estoques de reprodutores que podem ser causados devido a falta de diversidade genética, número efetivo reduzido e alto nível de parentesco, além da diversidade genética foi estimado para cada estoque o potencial de exclusão de paternidade dos *loci* empregados e o grau de parentesco entre os indivíduos de cada estoque.

Os microssatélites empregados apresentaram valores combinados de não exclusão de um primeiro candidato pai (NE-1P) e segundo candidato pai (NE-2P) de $3,96 \times 10^{-4}$ e $1,32 \times 10^{-5}$, respectivamente para RP 2015 e para Rp 2016 os valores combinados foram NE-1P = $2,01 \times 10^{-3}$ e NE-2P = $8,9 \times 10^{-5}$.

A análise de parentesco aos pares permitiu inferir que os estoques de reprodutores de 2015 e 2016 apresentam baixo índice de indivíduos totalmente

aparentados e elevado índice de indivíduos sem nenhum grau de parentesco (Figura 1 e Figura 2). O Rp 2015 apresentou 86,40% de indivíduos não aparentados, 12,43% de indivíduos meio-irmãos e 1,17% indivíduos irmãos-completos. Já o Rp 2016 apresentou 91,74% de indivíduos não aparentados, 8,26% de indivíduos meio-irmãos e 0% de indivíduos irmãos-completos.

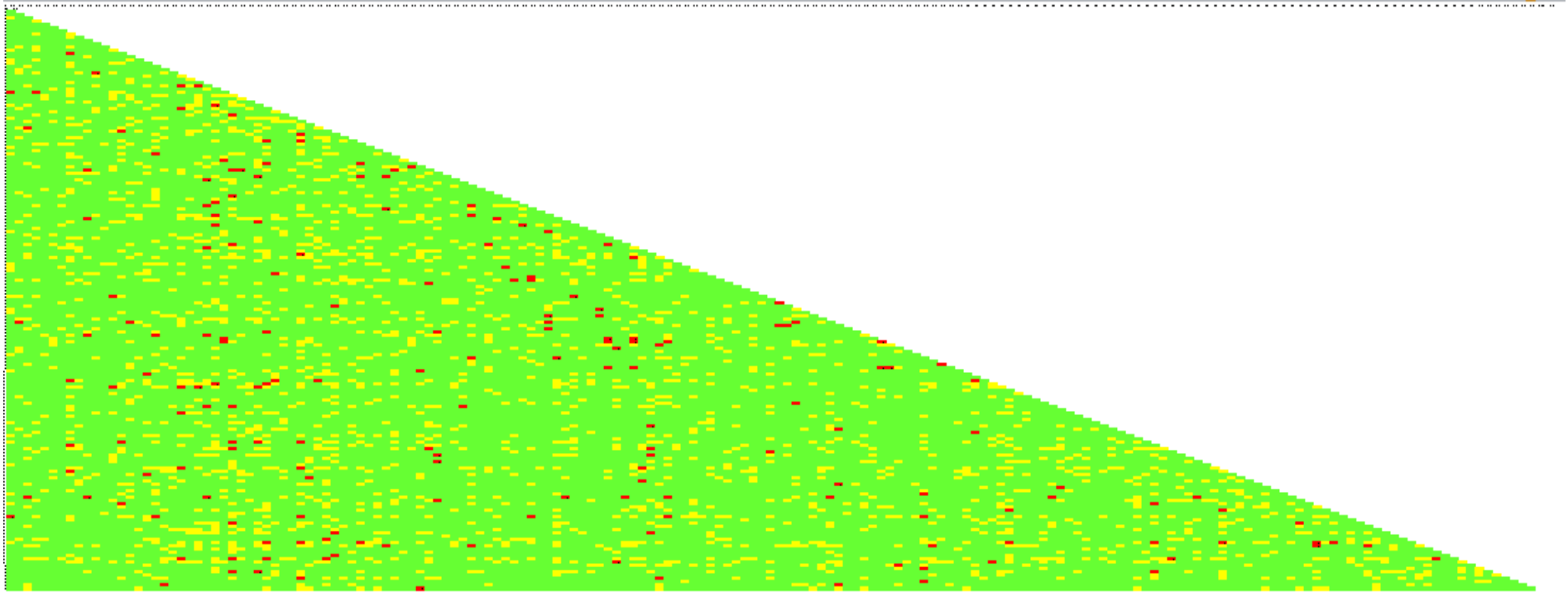


Figura 2. Proporção do coeficiente (r) de parentesco entre os indivíduos reprodutores de *Astyanax altiparanae* selecionados para formar o banco de reprodutores de 2015. Em verde estão identificados os indivíduos classificados como não aparentados (UR), em amarelo os meios-irmãos (HS) e em vermelho os irmãos completos (FS)

Indivíduos	F_000002	F_000006	F_000008	F_000011	M_000012	F_000016	F_000017	M_000018	M_000022	M_000024	M_000026	M_000027	M_000028	F_000029	F_000032	M_000038	M_000041	M_000043	F_000045	F_000049	M_000052	M_000055	M_000057	M_000059	F_000060	M_000061	
F_000002																											
F_000006	-0,1212																										
F_000008	-0,0803	-0,1468																									
F_000011	-0,0416	0,0645	-0,1311																								
M_000012	-0,0843	-0,1023	-0,1585	0,1421																							
F_000016	-0,0187	-0,0766	-0,1194	-0,0997	-0,1676																						
F_000017	-0,0472	0,0684	-0,0531	-0,0036	-0,1482	-0,0007																					
M_000018	0,2745	-0,0873	-0,042	0,0294	-0,17	0,2609	0,0265																				
M_000022	-0,027	0,1473	0,0117	0,1538	-0,1374	0,0746	0,0816	0,1232																			
M_000024	0,0048	-0,0297	-0,1468	-0,0416	-0,1676	-0,0766	-0,1414	-0,0404	-0,0761																		
M_000026	-0,1485	0,1103	-0,165	-0,0751	-0,1092	-0,1765	-0,1253	-0,1575	-0,1765	-0,1485																	
M_000027	0,0085	-0,1797	0,077	-0,1401	-0,1401	-0,1797	0,0293	0,0257	-0,1401	-0,1797	-0,1917																
M_000028	-0,0075	0,1313	-0,1194	0,0409	-0,1676	-0,033	0,1238	-0,0282	0,1909	-0,0459	-0,1765	-0,1175															
F_000029	-0,0467	0,1026	-0,1151	0,1216	-0,1374	-0,1406	0,0816	-0,0541	0,1216	0,1026	-0,1485	-0,0323	0,0915														
F_000032	0,0792	-0,1046	-0,1018	-0,0344	-0,1874	0,2203	0,1359	0,0755	-0,013	0,0494	-0,1765	-0,2043	-0,0739	-0,1493													
M_000038	-0,1594	-0,1594	-0,1194	-0,0082	0,2379	-0,0915	-0,1414	-0,1002	-0,0997	-0,0187	-0,0143	-0,1797	-0,0915	0,0915	-0,1605												
M_000041	-0,0385	-0,1212	0,0134	-0,1676	0,0558	0,0649	-0,0096	-0,0785	-0,1676	-0,0166	-0,1485	-0,0876	-0,0874	-0,1295	-0,0766	-0,0187											
M_000043	0,0194	-0,0915	-0,1468	-0,1676	-0,0968	-0,0679	-0,0239	-0,0294	0,0645	-0,0385	-0,1174	-0,0719	-0,1594	-0,1295	-0,1227	-0,1594	0,0936										
F_000045	0,0939	0,2532	0,0016	-0,1374	-0,0874	-0,0761	-0,0631	0,1448	0,0032	-0,0082	0,0095	-0,0323	-0,1676	0,0481	-0,1874	-0,0416	0,1026	0,0111									
F_000049	0,1454	0,1538	-0,1034	0,05	-0,0046	-0,0739	-0,053	0,2053	0,0585	0,0048	0,1879	-0,1797	0,015	-0,0997	0,0352	-0,1324	-0,1212	0,0413	0,163								
M_000052	-0,0467	-0,1295	-0,0039	-0,1374	0,0032	-0,1676	-0,1482	-0,0873	-0,1374	-0,1295	-0,1485	-0,0323	-0,027	-0,0166	-0,1874	-0,027	0,0409	-0,1295	-0,0166	-0,1295							
M_000055	0,0007	-0,0087	-0,0493	-0,0468	-0,0468	-0,1874	0,0685	-0,0066	-0,0468	-0,1493	-0,1485	-0,0512	-0,0468	0,0498	-0,1493	-0,0468	-0,0087	-0,1493	-0,0908	-0,1493	0,1413						
M_000057	0,1013	-0,1559	-0,0492	-0,0459	-0,1211	-0,0806	0,0653	0,1775	0,1099	-0,1559	0,0732	-0,0344	-0,0806	-0,0014	-0,1485	-0,0198	-0,1559	-0,0001	0,1264	0,0279	-0,1211	-0,0751					
M_000059	-0,0333	-0,1594	-0,1034	-0,0146	-0,1676	0,0369	-0,0562	0,2129	-0,1406	0,0494	-0,1765	-0,1462	-0,1324	-0,0467	0,0876	-0,1324	-0,0119	-0,1594	-0,0201	0,0048	-0,1676	-0,1874	-0,0361				
F_000060	-0,0766	-0,1374	-0,1034	-0,1406	-0,1295	0,0582	-0,0096	-0,0541	-0,1406	-0,1594	-0,0848	0,0202	-0,0824	-0,0467	-0,1493	-0,0739	-0,0333	-0,1594	-0,0848	-0,1212	0,13	-0,1289	-0,0361	-0,1212			
M_000061	0,0104	0,0136	-0,0426	-0,1279	-0,1559	0,3682	-0,0306	0,3298	0,1869	-0,0539	0,1533	-0,166	0,035	-0,0464	0,0215	-0,1174	-0,1211	0,0104	-0,0001	0,1135	-0,1559	-0,1343	0,1859	-0,1032	0,0526		
M_000063	-0,1023	0,2151	0,0536	-0,0696	-0,1374	0,0409	-0,0764	-0,0206	-0,0696	-0,1676	0,0732	0,0694	-0,0997	-0,1105	-0,1605	-0,0412	-0,1676	-0,1676	0,2452	0,0112	0,0714	-0,1227	0,1131	-0,1406	0,0827	0,0279	

Figura 3. Proporção do coeficiente (r) de parentesco entre os indivíduos reprodutores de *Astyanax altiparanae* selecionados para formar o banco de reprodutores de 2016. Em verde estão identificados os indivíduos classificados como não aparentados (UR), em amarelo os meios-irmãos (HS) e em vermelho os irmãos completos (FS).

Discussão

Diversidade genética

Os valores de diversidade genética indicam que os estoques amostrados apresentam alta variabilidade genética ($A = 24,35$; $A_R = 16,27$ e $H_E = 0,856$). Trabalhos prévios com marcadores RAPD, descrevem valores médios de H_E de 0,214 para *A. altiparanae* no rio Paranapanema (Oliveira et al., 2005). Desvios significativos do EHW foram observados na maioria dos *loci* para o estoque Rp 2015, que junto com valores positivos e significativos do F_{is} indicam que este desvio é causado por um excesso de homozigotos no estoque. O excesso de homozigotos, ou déficit de heterozigotos, pode ser ocasionado por vários fatores como a presença de alelos nulos no *loci* aplicados, ao forte endocruzamento, ao efeito gargalo de garrafa e ao efeito Wahlund (Johnson e Black, 1984; Nielsen et al., 2003; Selkoe e Toonen, 2006). Devido ao fato dos indivíduos estudados serem de populações naturais, não havendo nenhuma geração de seleção, no presente trabalho o déficit de heterozigotos pode ser explicado devido ao efeito gargalo de garrafa. Este efeito pode ter ocorrido pela existência de populações naturais com tamanhos muito grandes, e amostragem de apenas uma parte desta.

Análise de parentesco

Junto às análises de diversidade genética o estudo do grau de parentesco entre os indivíduos de estoques de reprodutores é de extrema importância a fim de saber como estes indivíduos estão relacionados. Diversos trabalhos mostram que um ponto importante de programas de *supportive breeding* está fortemente relacionado com o número de reprodutores usados para fundar novas gerações (Pante et al., 2001; Koljonen

et al., 2002; Scherier et al., 2012), com o esquema de cruzamento (Scherier et al., 2012), considerando que acasalamentos entre indivíduos aparentados tem consequências deletérias em todos os aspectos (Frankham et al., 2010) e a forma de soltura dos juvenis na natureza.

Os *loci* microssatélites empregados mostraram bom potencial de exclusão para estudos de parentesco ($NE-1P = 3,96 \times 10^{-4}$ e $NE-2P = 1,32 \times 10^{-5}$; $NE-1P = 2,01 \times 10^{-3}$ e $= 8,9 \times 10^{-5}$). As análises de parentesco dos estoques corroboram com os valores de variabilidade genética observada neste estudo, mostrando que nos dois estoques a taxa de indivíduos não relacionados geneticamente é alta, o estoque de 2016 apresentou níveis maiores de indivíduos não aparentados, não sendo uma diferença significativa quando comparado com o estoque de 2015, já que este apresenta número de reprodutores menor.

Ao considerar que o endocruzamento tem consequências deletérias em vários aspectos da reprodução e sobrevivência, incluindo habilidade de acasalamento, fecundidade, sobrevivência dos alevinos e idade de maturação sexual. O presente trabalho se torna importante por propor o uso de marcadores moleculares, como os microssatélites, como ferramenta para selecionar e monitorar estoques de reprodutores em pisciculturas, podendo ser aplicado principalmente a práticas de *supportive breeding*, mas também voltado à aquicultura.

CAPÍTULO 2

Monitoramento genético pós-soltura em programas de *supportive breeding* de populações de *Astyanax lacustris* (Characidae, Teleostei) na bacia do Alto Paraná

Resumo

Práticas de repovoamentos em rios se tornaram comuns em ambientes com intensa interferência antropogênica. Sendo esta considerada uma pratica mitigadora capaz de auxiliar na recuperação ou manutenção da diversidade genética, uma vez que esta é a base para as respostas dos organismos às alterações ambientais. Porém, a maioria dos trabalhos existentes quando tratam desta ação conservacionista, não consideram a manutenção da diversidade genética dos estoques naturais posterior às solturas. O presente trabalho aplicou *loci* microssatélites com intuito de acessar a diversidade e estruturação genética de populações naturais de *Astyanax lacustris* ao longo de três anos consecutivos a fim de verificar se houve alteração genética após eventos de soltura no rio Sapucaí-Mirim, bacia do Alto Paraná, SP. Além disso, foram feitos teste de paternidade entre os estoques de cultivo e amostragens da natureza, objetivando avaliar a recaptura de indivíduos provenientes de cultivo. Os resultados mostraram que os estoques naturais das PCHs Palmeiras e Retiro apresentam alta variabilidade genética ao longo dos anos ($A = 23,26$, $A_R = 11,78$, $H_E = 0,918$), tendo a riqueza alélica variando de 10,41 (Reservatório da PCH Retiro de 2017) a 12,72 (Reservatório da PCH Retiro de 2016) e a heterozigosidade esperada de 0,832 (Reservatório da PCH Retiro 2016) a 0,881 (Reservatório da PCH Palmeiras 2015). Os valores do número efetivos populacionais variaram de 16,3 a 110,7 de acordo com o tamanho amostrado das diferentes populações. A maioria dos *loci* apresentaram desvios significativos do Equilíbrio de Hardy-Weinberg e valores referentes ao índice de fixação positivo e também significativo, variando de 0,120 a 0,225 ($P\text{-value} < 0,05$, após correção de Bonferroni $P\text{-value} < 0,007$). Além da alta diversidade genética observada nas populações amostradas, foi possível observar valores de estruturação significativos que variaram de 0 a 0,0023. Os dados obtidos no presente estudo mostram que não houve redução na variação genética ao longo dos anos, sendo o repovoamento uma ação que contribui de forma positiva para esta manutenção.

Introdução

Diversas ações antrópicas têm sido consideradas grande ameaça aos ambientes aquáticos. Poluição, introdução de espécies alóctones, construção de barreiras, represamento dos rios e sobre pesca estão entre as ações de grande interferência para as espécies aquáticas (Agostinho et al., 2008; Esguícero e Arcifa, 2010). Tanto os ecossistemas marinhos, quanto os ecossistemas aquático continentais sofrem as consequências destas ações, no entanto, as construções de barramentos para geração de energia estão entre os maiores riscos para espécies dulcícolas. Isso porque estas construções levam a uma grande alteração no sistema fluvial, ocasionando em mudanças no padrão de distribuição de espécies migradoras e consequente redução e até mesmo extinção das espécies que não apresentam adaptação às alterações provocadas nestes ambientes (Agostinho et al., 2008).

Desta forma, programas de repovoamento são empregados em rios impactados pelos barramentos. Estes são considerados como ferramenta importante a fim de manter ou recuperar a diversidade genética presente nas populações naturais, considerando que esta é a base para respostas das populações em relação às alterações ambientais (Fisher, 1930; Red e Frankham, 2002; Hughes et al., 2008).

O repovoamento consiste na propagação de juvenis provenientes de pisciculturas em ambientes que estão sofrendo algum tipo de interferência humana. A produção destes alevinos pode ser feita por meio de estratégias, como o *captive breeding* e *suppotive breeding*. A primeira visa restabelecer ou manter populações naturais por meio da liberação de juvenis produzidos em piscicultura a partir de reprodutores isolados em cultivo e a segunda, visa o mesmo a partir reprodutores selvagens (Schreier et al., 2015).

A introdução de indivíduos de cultivo na natureza pode ter grandes consequências, como a redução da diversidade genética gerada pela soltura de muitos indivíduos produzidos provenientes de bancos de progenitores de tamanhos reduzidos; e como a introgressão genética, causada pela mistura ou até mesmo total substituição do *pool* gênico de indivíduos de cultivo em populações naturais. Assim, há diversos trabalhos em que são feitas análises genéticas dos parentais para ver se estes conservam os níveis de diversidade genética adequados e maximizam o tamanho efetivo (Doyle et al., 2001; Aho et al., 2006; Povh et al., 2008; Lopera Barrero et al., 2015; Lopera-Barrero et al., 2016; Ribeiro et al., 2016), atribuindo que os alevinos refletem características genéticas de seus progenitores.

Em contrapartida, os alevinos quando liberados na natureza estão expostos a diversos fatores evolutivos, o que pode levar a uma alteração da diversidade genética pós-soltura. De acordo com Schreier et al. (2015), trabalhos que focam apenas no monitoramento genético dos reprodutores usados em repovoamentos leva a superestimação a conservação da diversidade genética em populações naturais, devido à mortalidade pós soltura (Schreier et al., 2015). Dessa forma, o sucesso de programas de repovoamento está relacionado não apenas ao estudo e monitoramento genético do banco de reprodutores, mas também ao estudo e monitoramento da diversidade genética pós soltura de populações selvagens.

Astyanax lacustris, popularmente conhecida como lambari ou lambari do rabo amarelo, está amplamente distribuída na região Neotropical, apresentando maior concentração na bacia do Alto Paraná. A espécie é conhecida pela sua alta plasticidade fenotípica, reprodutiva, gerações curtas e por representar a base da cadeia trófica, servindo de alimento para peixes maiores e apresentando dieta bastante variada por explorar grupos alimentares diferentes (Peretti e Andrian, 2007). Apesar de serem

amplamente distribuídas nas bacias brasileiras, poucos trabalhos abordam espécies do gênero *Astyanax* em estudos genéticos populacionais, sendo estes essenciais para o desenvolvimento e melhoramento de projetos com propósito conservacionista.

Esse trabalho teve por objetivo avaliar os efeitos de repovoamentos realizados no rio Sapucaí-Mirim, a fim de verificar se há manutenção da diversidade genética pós-soltura em populações de *A. lacustris* e avaliar a diversidade genética e a estruturação populacional de duas populações através de marcadores moleculares, no período de três anos no rio Sapucaí-Mirim, localizado na bacia do Alto Paraná, São Paulo, Brasil. Este estudo no rio Sapucaí-Mirim se torna essencial a propósito de entender os efeitos causados em populações de espécies migradoras de curtas distâncias, como o lambari, pois são realizadas na região solturas anuais há quatro anos.

Material e Métodos

Amostragem e extração de DNA

Os animais utilizados no estudo são provenientes de populações naturais de *A. lacustris* (lambari), coletadas no rio Sapucaí-Mirim, tributário da bacia do Alto Paraná, São Paulo.

Foram analisados 506 indivíduos de populações naturais de *A. lacustris* coletados ao longo do rio Sapucaí-Mirim. As amostragens correspondem a várias capturas temporais entre os anos de 2015 a 2017, nas duas Pequenas Centrais Hidrelétricas (PCHs) (Figura 1): PCH Palmeiras e Retiro, em funcionamento no rio Sapucaí-Mirim desde o ano de 2012 e 2013, respectivamente. Durante a coleta foram amostradas segmentos de nadadeira caudal dos exemplares, sendo estes preservados em

álcool 95% para posteriores análises moleculares, compondo o banco de tecidos do Laboratório de Genética de Peixes (LAGENPE), Universidade Estadual Paulista (Unesp), Bauru, São Paulo.

As amostragens do ano de 2015 correspondem as duas PCHs, onde foram coletados exemplares nas escadas de transposição e acima das PCHs, nos reservatórios (Rr 2015). No ano de 2016 foram amostrados espécimes das duas PCHs, no entanto, apenas dos reservatórios destas. Em 2017 foram amostrados apenas indivíduos coletados na PCH Retiro, no reservatório (mais detalhes tabela 1). Todos os tecidos foram conservados em álcool absoluto para posteriores análises moleculares, compondo o banco de tecidos do LAGENPE.

O DNA foi extraído e purificado através do kit comercial “Wizard Genomic Purification kit-Promega” e teve sua integridade verificada através de gel de agarose 1% corado com GelRed 1X (Uniscience) e visualizado em transiluminador UV (Loccus Biotecnologia).

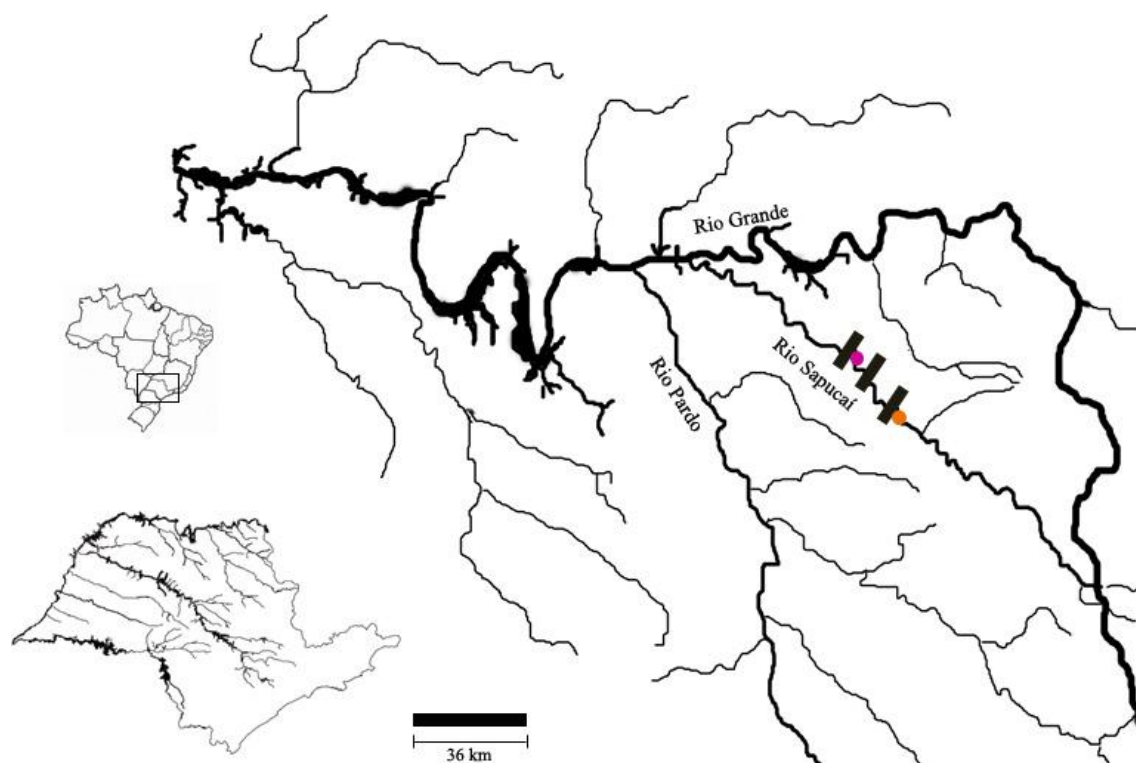


Figura 1. Áreas de coleta dos estoques de reprodutores de *Astyanax lacustris* (ponto rosa representa a PCH Retiro e o ponto laranja a PCH Palmeiras) no rio Sapucaí-Mirim, onde estão localizadas as duas Pequenas Centrais Hidrelétricas (PCH), bacia do Alto Paraná, estado de São Paulo, Brasil.

Tabela 1. Localidades analisadas no estudo e seus respectivos anos de amostragem.

Localidade	Código da população	2015	2016	2017
PCH Retiro Reservatório	RR 2015/RR 2016/ RR 2017	64	20	80
PCH Retiro Escada	ER 2015	97	-	-
PCH Palmeiras Reservatório	RP 2015/RP 2016	65	118	
PCH Palmeiras Escada	EP 2015	62	-	-
Total	-	288	138	80

Amplificação e genotipagem dos loci microssatélites

Os oito *loci* empregados no presente estudo foram previamente descritos por Zaganini et al. (2012) para *A. lacustris*. Todos os *primers forward* (F) foram marcados na posição 5' com os seguintes fluorocromos: PETTM, FAMTM, NETTM, e VICTM (Applied Biosystems) e combinados para serem sequenciados em conjunto, considerando a variação do tamanho alélico (Tabela 2).

A amplificação dos *loci* microssatélites foi conduzida em duas reações diferentes com apenas um par de *primers, forward* (F) e *reverse* (R), separadamente. A reação para os *loci* Asty 4, Asty 12, Asty 15, Asty 21 e Asty 23 contém volume final de 18,5 µl com as seguintes concentrações, 1,4X de Buffer, 94 µM de dNTPs, 3,12 mM de MgCl₂, 2,5 mM de cada *primer* e 0,25 U de *Taq*. A reação para os *loci* Asty 16, Asty 26 e Asty 27 contém volume final de 25 µl, com as seguintes concentrações, 1X de Buffer, 150 µM de dNTPs, 1,5 mM de MgCl₂, 2 mM de cada *primer* e 0,2 U de *Taq*. Todos os *loci* microssatélites foram amplificados no termociclador Veriti 96-Well Thermal Cycler (Applied Biosystems), seguindo as condições de desnaturação inicial a 95° C por 5 min, seguida de 35 ciclos que inclui desnaturação a 95° C por 30 s, hibridização variando de 55° C a 60° C por 30s, desnaturação a 72° C por 5s e extensão final a 72° C por 5 min (mais detalhes tabela 2).

As amostras foram genotipadas no sequenciador automático ABI 3730xl DNA Analyzer (Applied Biosystems) e os resultados foram analisados no programa Geneapper versão 4.0 (Applied Biosystems).

Tabela 2. Loci analisados em *Astyanax lacustris*.

<i>Loci</i>	Tamanho (pb)	Ta (°C)	Fluorocromo	SET ABI
Asty 4	200	55	FAM	I
Asty 15	163	55	VIC	I
Asty 16	212	55	PET	I
Asty 23	165	60	NED	I
Asty 12	160	60	PET	II
Asty 21	190	55	NED	II
Asty 26	150	60	FAM	II
Asty 27	200	60	FAM	II

Loci - identificação do locus; Tamanho - tamanho de cada locus em pares de base (pb); Ta - temperatura de anelamento de cada par de *primer*; Fluorocromo - marcação fluorescente de cada *primer forward* (F); Set ABI loci genotipados em sets.

Análise dos dados

Diversidade genética intrapopulacional

A diversidade genética por locus e total foi estimada usando o número de alelos (A), heterozigosidade esperada (H_E) e heterozigosidade observada (H_O) usando o software ARLEQUÍN versão 3.1 (Excoffier et al., 2010). Desvios do equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) e índice de fixação (F_{is}) foram estimados usando o GENEPOP versão 3.3 (Raymond e Rousset, 1995). Riqueza alélica foi estimada através do programa Fstat versão 2.9.3 (Goudet, 2002). O tamanho efetivo populacional (N_e) foi estimado através do programa NeEstimator versão 2.01 (Peel et al., 2004), utilizando frequência alélica mínima (MAF) de 0,1 e o método de desequilíbrio de ligamento.

Diversidade genética interpopulacional

Para avaliar a estruturação genética entre populações de *A. lacustris*, foram obtidos os índices de diferenciação populacional (F_{ST}) (Weir e Cockerham, 1984) através do programa ARLEQUÍN 3.1 (Excoffier et al., 2010), o teste múltiplo foi conduzido com 10.000 permutações. Valores significantes (P -value $<0,05$) foram ajustados usando correção sequencial de Bonferroni (Rice, 1989).

Adicionalmente foi empregado o programa STRUCTURE 2.3.1 (Pritchard et al., 2000), através do qual foram conduzidas análises de desagregação em métodos bayesianos com intuito de estimar número de unidades populacionais (K), atribuindo os indivíduos a suas populações de origem, a partir das frequências alélicas baseado no critério descrito por Evanno et al. (2005). Foi permitido o modelo de ancestralidade não misturada (*no admixture model*) a propósito de permitir uma resolução máxima, uma vez que este parâmetro assume que cada indivíduo vem exclusivamente de uma das populações e é mais indicado para verificar uma estruturação populacional sutil (Pritchard et al., 2000). Foram utilizados alelos correlacionados, 20 réplicas para cada valor de K , 500.000 gerações da cadeia de Markov Monte Carlo (MCMC), com períodos de *burn-in* de 200.000 e assumindo K de 2 a 10 para a espécie em estudo.

Análise de paternidade

As análises de paternidade entre os progenitores conservados como reprodutores no Centro de Aquicultura da Unesp, Campus Jaboticabal, e os indivíduos amostrados de populações naturais do rio Sapucaí-Mirim foram feitas usando o programa CERVUS versão 3.0 (KALINOWSKI et al., 2007). A probabilidade de cada candidato pai (ou casal) ser candidato à descendência testada, foi obtida a partir do *log* da relação de verossimilhança (“*LOD score*”) daquele candidato sendo o pai verdadeiro em relação a um indivíduo tomado aleatoriamente da população de referência (Marshall et al., 1998).

Resultados

Diversidade genética

Foram genotipados 506 indivíduos de sete grupos amostrados de *A. lacustris* (RR 2015, ER 2015, RP 2015, EP 2015, RR 2016, RP 2016 e RR 2017). Todos os *loci* se mostraram polimórficos. O estoque do Reservatório da PCH Retiro de 2015 (RR 2015) apresentou valores médios de número de alelos por *loci* (A) de 23,00; riqueza alélica (A_R) de 11,95; heterozigosidade esperada (H_E) de 0,860 e número efetivo populacional (N_e) de 58,9. O estoque da Escada da PCH Retiro de 2015(ER 2015) exibiu valores médios de $A= 28,43$, $A_R = 11, 34$; $H_E = 0,874$ e $N_e = 80,6$. A população de Reservatório da PCH Palmeiras do mesmo ano (RP 2015) mostrou valores multiloci de A igual a 24,28; A_R igual a 12,48; H_E igual a 0,881 e N_e igual a 59,1 . Os indivíduos amostrados na Escada da PCH Palmeiras de 2015 (EP 2015) apresentaram valores de diversidade alélica de $A= 21,57$; $A_R = 11,86$; $H_E = 0,875$ e $N_e = 51,7$. A população amostrada no Reservatório da PCH de Retiro em 2016 (RR 2016) exibiu valores de A igual a 12,14; A_R igual a 10,41; H_E igual a 0,712 e N_e igual a 16,3. O estoque estudado do Reservatório de Palmeiras deste mesmo ano (RP 2016) apresentou valores médios de diversidade alélica de $A= 25,57$; $A_R = 11,75$; $H_E = 0,686$ e $N_e = 100,7$. E por fim a população analisada do Reservatório da PCH de Retiro de 2017 (RR 2017) apresentou valores multiloci de 27,85 alelos por *locus*, 12, 72 de riqueza alélica, heterozigosidade esperada de 0,871 e número efetivo populacional de 66,5 (Tabela 3).

Desvios significativos do EHW ($P < 0,007$, após a correção de Bonferroni) foram observados em todas as populações para dois *loci* microssatélites (Asty 15 e Asty 16), além disso, a população ER 2015 apresentou desvios em mais dois *loci* (Asty 23 e Asty 26), a RP 2016 em mais um *loci* (Asty 12) e a RR 2017 (Asty 4, Asty 23 e Asty

26). Valores positivos de F_{is} , indicando déficit de heterozigotos foram observados para a maioria dos *loci* para as populações estudadas, além de positivos os valores se apresentaram significativos ($P < 0,007$) (Apêndice 2). As populações RR 2015, RP 2015 e EP 2015 apresentaram valores positivos e significativos em dois *loci* (Asty 15 e Asty 16), a população ER 2015 em quatro *loci* (Asty 15, Asty 16, Asty 23 e Asty 26). Nas populações do ano de 2016, a RR 2016 apresentou valores positivos e significativos em três dos *loci* analisados (Asty 15, Asty 16 e Asty 23) e PR 2016 revelou valores de F_{is} positivos e significativos em dois *loci* (Asty 12 e Asty 16). O estoque RR 2017 apresentou valores significativos ($P < 0,007$) para cinco dos *loci* aplicados (Asty 04, Asty 15, Asty 16, Asty 23 e Asty 26).

Tabela 3. Diversidade alélica média dos sete *loci* microssatélites aplicados em populações de *Astyanax lacustris*.

	RR 2015	ER 2015	RP 2015	EP 2015	RR 2016	RP 2016	RR 2017
<i>Média</i>							
A	23,00	28,43	24,28	21,57	12,14	25,57	27,85
Ar	11,95	11,34	12,48	11,86	10,41	11,75	12,72
H_o	0,752	0,701	0,771	0,726	0,712	0,686	0,668
H_E	0,860	0,874	0,881	0,875	0,832	0,862	0,871
<i>P-value</i>	-	-	-	-	-	-	-
<i>Fis</i>	0,120	0,187	0,125	0,165	0,159	0,199	0,225

A – número de alelos por *locus*; H_o – heterozigosidade observada; H_E heterozigosidade esperada; EHW – teste do equilíbrio de Hardy-Weinberg ($P\text{-value} < 0,05$; correção de Bonferroni $P < 0,007$); Negrito - *locus* com desvio do EHW, F_{is} – índice de fixação.

Tabela 4. Tamanho efetivo populacional em diferentes populações de *Astyanax lacustris*.

População	N	N_e (0,01)
RR 2015	64	58,9
ER 2015	97	80,6
RP 2015	65	59,1

EP 2015	62	51,7
RR 2016	20	16,3
RP 2016	118	100,7
RR 2017	80	66,5

N – censo populacional amostrado; N_e – tamanho efetivo populacional usando a menor frequência alélica de 0,01.

Os valores de F_{st} variaram de 0,000 (RR 2015 e RP 2015) a 0,023 (ER2015 e RR 2016) (Apêndice 3). Comparando as populações por ano, foi possível observar diferenças estatisticamente significativas ($P < 0,05$) entre os dois grupos da PCH Retiro (RR 2015 e ER 2015) e também entre o estoque amostrado na escada da PCH Retiro (ER 2015) e os dois grupos da PCH Palmeiras (RP 2015 e EP 2015) (Tabela 5). Ao considerar os três anos (2015, 2016 e 2017) os valores de F_{st} revelaram diferenças significativas entre os três reservatórios da PCH Retiro (RR 2015, RR 2016 e RR2017) (Tabela 6).

Tabela 5. Valores de F_{st} entre pares de populações de *Astyanax lacustris* amostradas em 2015.

	RR	ER	RP	EP
RR	0			
ER	0,009 *	0		
RP	0,000	0,011*	0	
EP	0,0043	0,006*	0,006	0

Em negrito valores considerados significativos ($P < 0,05$), *, valores considerados significativos para $P < 0,001$, 1023 permutações.

Tabela 6 . Valores de F_{st} entre pares de populações de *Astyanax lacustris* de Reservatório Retiro ao longos de três anos.

	RR 2015	RR 2016	RR 2017
RR 2015	0		
RR 2016	0,013	0	
RR 2017	0,005	0,013	0

Em negrito valores considerados significativos ($P < 0,05$), *, valores considerados significativos para $P < 0,001$, 1023 permutações.

A análise de identificação de grupos de populações por intermédio do programa STRUCTURE indicou $K = 2$, com a população da escada da PCH Retiro (ER 2015) tendo divisões de dois grupos distintos (Figura 2) (os *bar plots* de $K = 3$ a $k=6$ estão no apêndice 4).

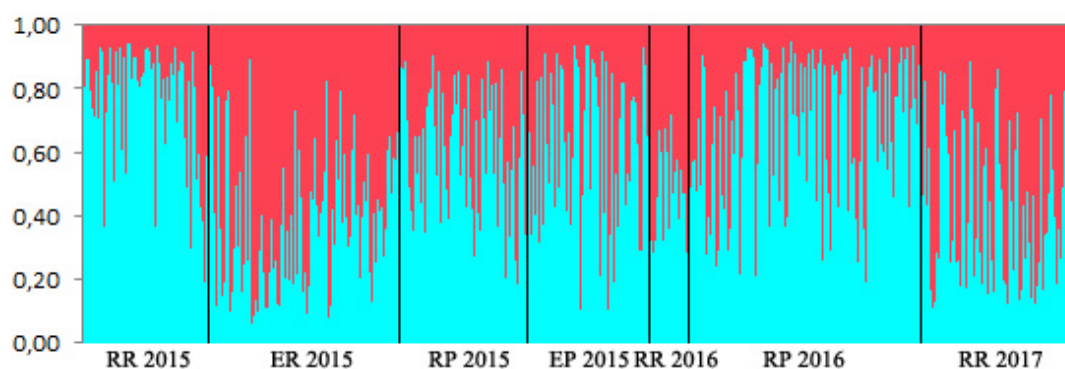


Figura 2. Estrutura *bar plot* das populações de *Astyanax lacustris*, estimada pelo programa STRUCTURE utilizando $K = 2$. Cada cor indica um grupo com base em semelhanças genotípicas. As legendas das populações estão indicadas na tabela 1.

Análise de paternidade

Através da estimativa de paternidade de candidatos pais (casais) considerando intervalos de confiança de 80 a 95%, foi possível atribuir 0,19% de descendentes aos casais analisados, considerando intervalo de confiança de 95% e com intervalo de confiança de 80% foi possível atribuir 0,79% de descendentes.

Discussão

Diversidade genética

O estudo da diversidade genética se torna essencial em populações naturais de peixes, pois através desta é possível entender como esta diversidade está distribuída entre as populações (Carvalho et al., 1993). Desta maneira, dados como estes

contribuem e são essenciais para o sucesso de ações conservacionistas, como o repovoamento.

Os valores de diversidade genética encontrados para os sete grupos de *A. lacustris* do presente trabalho ($A = 23,26$, $A_R = 11,78$, $H_E = 0,918$), mostram que estas populações de maneira geral apresentam alta diversidade genética, considerando que valores menores ($A = 9,1$; $H_E = 0,540$) foram descritos na literatura para espécies de peixes continentais (De Woody e Avise, 2000). E valores semelhantes ($A = 15,6$, $A_R = 10,7$, $H_E = 0,846$) foram retratados por Zaganini (2013) para populações da mesma espécie em diferentes rios da bacia do Alto Paraná.

Desvios das frequências genotípicas do Equilíbrio de Hardy Weinberg juntamente com o índice de endogamia permitem identificar se fatores evolutivos estão atuando em determinada população. A mistura genética de populações diferentes e o efeito de deriva genética estão entre estes fatores. Outro problema comum que também pode refletir nas frequências genotípicas no caso de marcadores microssatélites é a presença de alelos nulos (Selkoe e Toonen, 2006; García de León et al., 1997). No entanto, a presença de alelos nulos na maioria dos *loci* aplicados é descartada, tendo em vista que Zaganini et al. (2012) que descreveu os microssatélites usados neste estudo relata presença de alelos nulos apenas nos *loci* Asty 16 e Asty 21, sendo que o segundo marcador foi excluído das análises no atual trabalho. Assim, sendo possível presença de alelos nulos apenas no microssatélite Asty 16. Em contrapartida, a maioria das populações apresentaram desvios do Equilíbrio de Hardy-Weinberg para a maioria dos *loci* utilizados.

O déficit de heterozigotos sugerido pelos desvios do Equilíbrio de Hardy-Weinberg e valores do índice de endogamia pode ser dar pelo efeito de deriva genética a

partir do gargalo de garrafa ocasionado pela seleção de um número amostral a partir da população original. Ou seja, por a população amostrada apresentar número inferior ao tamanho da população natural, não refletindo um real problema na população natural, ao considerar que o ambiente estudado tem grandes proporções.

As análises de estruturação genética apresentaram valores significativos entre populações do ano de 2015 e entre as populações dos três anos do Reservatório da PCH Retiro, no entanto, estes valores apesar de significativos são considerados baixos. Como foi descrito por Wright (1978), valores entre 0 e 0,05 indicam baixo nível de diferenciação genética. No entanto, apesar de apresentam pouca diferenciação não pode ser ignorada a existência de subpopulações, especialmente em programas de conservação que tem o propósito de manter a diversidade da população natural. De acordo com Laikre et al. (2005) desconsiderar este fato pode resultar na perda da variação genética. Além disso, as análises de agrupamento revelam que há dois grupos de populações no estoque amostrado na Escada da PCH Retiro 2015 e no Reservatório da PCH de Retiro 2017. Estes dois estoques foram os que também apresentaram estruturação genética com a maior parte dos estoques, esta diferenciação possivelmente se deu ao fato de que a população da escada da PCH Retiro sofra influências de outras populações de lambari rio abaixo, onde não há a construção de PCHs e a população do reservatório da PCH Retiro sofra influência da escada de peixes.

Desta forma, é possível concluir que a prática de repovoamento na região das PCHs no rio Sapucaí-Mirim contribuiu para a manutenção da variação genética em populações de *A. lacustris*, no entanto, é importante ressaltar a necessidade de respeitar a subdivisão dentro de algumas populações para formação de bancos de reprodutores.

Análise de paternidade

Poucos trabalhos estudam a eficiência de repovoamentos através da análise de recaptura dos indivíduos liberados na natureza, os trabalhos existentes fazem uso de marcadores físicos como *tags* magnéticas, coloração, entre outros (Serafy et al., 1999; Støttrup et al., 2002; Iglesias et al., 2003). Oliveira et al. (2005) aplicou marcadores microsatélites com essa finalidade para *Prochilodus lineatus* no reservatório de Jurumirim, no rio Paranapanema, São Paulo, Brasil. De acordo, com Bert et al. (2002) os marcadores moleculares podem ser amplamente empregados em diferentes campos da aquicultura conservacionista, assim como na identificação de padrões de dispersão e sobrevivência dos animais cultivados após a liberação no meio natural.

Desta forma, os microsatélites aplicados no presente estudo, com o propósito de estimar a recaptura e consequente taxa de sobrevivência de alevinos liberados na natureza através da análise de paternidade se mostraram eficientes. Foi possível identificar a proporção de 0,19% a 0,79% de indivíduos coletados em populações naturais que foram atribuídos como filhos de casais que compõem os estoques de reprodutores para práticas de soltura no rio Sapucaí-Mirim. Quando comparado com outros trabalhos que fazem uso de marcadores moleculares para esta finalidade, os valores apresentados neste estudo são relativamente baixos, como por exemplo, Oliveira et al. (2005) atribuiu cerca e 7% dos indivíduos coletados como sendo fruto do repovoamento após 18 meses de soltura. Porém, neste estudo o tempo entre a soltura e recaptura foi maior, justificando uma taxa reduzida e a espécie aqui estudada apresenta ciclo de vida curto quando comparado com *P. lineatus*.

Deste modo, os dados obtidos sugerem que apesar de poucos indivíduos liberados na natureza sobreviverem, há indivíduos provenientes de repovoamentos na região. E ainda que os indivíduos liberados não sejam suficientes para aumentar o

número de indivíduos dos estoques selvagens, estes não podem ser desconsiderados, pois podem ser importantes para um aumento temporário das populações de *A. lacustris*.

De forma geral os dados do presente trabalho apontam que as populações analisadas apresentam alta variação genética, o que revela que as práticas de repovoamentos ainda que não tenham a eficiência esperada sob as populações naturais, contribuem para a manutenção da diversidade genética, mesmo que temporariamente. As informações aqui obtidas são importantes para uso em futuros trabalhos área de conservação e com a espécie *A. lacustris*, tendo em vista que são escassos s trabalhos genéticos populacionais com esta espécie. Além disso, é mostrada a necessidade do conhecimento genético pós soltura das populações naturais como meio de estimar os efeitos dos repovoamentos e nortear estas ações.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Como resultado de diversas alterações nos ambientes aquáticos continentais, os peixes são considerados o grupo mais ameaçado dentro dos vertebrados. Assim, diversas ações mitigadoras são propostas, no entanto, problemas como falta de objetivo bem definido e a falta de conhecimento genético e biológico das populações naturais podem levar a ineficiência destas práticas conservacionistas.

O repovoamento através da estratégia de *supportive breeding* está entre a prática mais empregada para manter ou reestabelecer a variação genética em populações de espécies vulneráveis. Porém, a maior parte dos trabalhos genéticos que envolvem esta ação foca mais no monitoramento dos bancos de reprodutores, existindo poucos trabalhos que envolvem também o monitoramento pós-soltura. Tendo poucas informações da principal questão que envolve esta prática, sua eficiência na manutenção da variação genética em estoques selvagens.

Deste modo, o atual estudo visou conhecer primeiro a população natural, como estão distribuídas e o nível de variação genética que elas apresentam; aplicar ferramentas genéticas para selecionar os melhores reprodutores do ponto de vista genético e por fim monitorar as populações naturais ao longo dos anos, a propósito de analisar a variação genética após o repovoamento.

Os dados obtidos mostraram que os marcadores microssatélites foram eficientes na estimativa da variação e distribuição genética das populações, bem como na seleção dos indivíduos do estoque de reprodutores. O que revela que estes marcadores podem ser instrumentos aplicáveis com sucesso tanto práticas conservacionistas como também na aquicultura. Além disso, os indivíduos eleitos para compor o banco de reprodutores apresentaram baixo grau de parentesco e alta variação genética, mostrando bom potencial para contribuir na produção de alevinos com aptidão para sobreviver às

variações ambientais. Por fim, o estudo de diversidade, estruturação genética e recaptura das populações naturais ao longo dos anos demonstraram que a prática de repovoamento tem contribuído para a manutenção da variação genética destas populações, ainda que temporariamente.

As informações obtidas e ferramentas genéticas aplicadas neste trabalho servem como base para futuros estudos com objetivo de manter ou recuperar populações em áreas de interferência antropogênica. Mostrando a necessidade de se estimar a diversidade genética pós-soltura no decorrer dos anos, bem como utilizar estes dados para verificar a eficiência de projetos de repovoamentos.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abell R, Thieme ML, Revenga C., Bryer M, Kottelat M, Bogutskaya N, Petry P (2008) Freshwater Ecoregions of the World: A New Map of Biogeographic Units for Freshwater Biodiversity Conservation. *BioScience*, 58(5), 403. <http://doi.org/10.1641/B580507>
- Agostinho A.A.; Gomes L.C.; Pelicice F.M. (2007) Ecologia e manejo de recursos pesqueiros em reservatórios do Brasil. Maringá: EDUEM, Maringá, cap. 6, p. 227-381.
- Agostinho AA; Pelicice FM, Gomes LC (2008) Dams and the fish fauna of the Neotropics region: impacts and management related to diversity and fisheries. *Brazilian Journal of Biology*.
- Aho T, Rönn J, Piironen J, & Björklund M (2006) Impacts of effective population size on genetic diversity in hatchery reared Brown trout (*Salmo trutta* L.) populations. *Aquaculture*, 253(1-4), 244–248. <http://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2005.09.013>
- Albert JS, Petry P & Reis RE (2011). Major biogeographic and phylogenetic patterns. In *Historical Biogeography of Neotropical Freshwater Fishes* (Albert, J. S. & Reis, R. E., eds), pp. 21–58. Berkeley, CA: University of California Press.
- Allendoff FW e Utter FM (1979) Population genetics. *Fish Physiol.* 8,407-54.
- Almeida-Val FVM, Schwantes, MLB. e Val AL (1990). Ldh Isozymes. In *Amazon Fish. I. Electrophoretic studies on two species from Serrasalmidae family: Mylosoma duriventris and Colossoma macropomum*. *Comp. Biochem. Physio.*, vol. 95B, p. 77-84.
- Araki H, & Schmid C (2010) Is hatchery stocking a help or harm?. Evidence, limitations and future directions in ecological and genetic surveys. *Aquaculture*, 308(SUPPL.1), S2–S11. <http://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2010.05.036>
- Artoni RF, Shibatta OA, Gross MC, Schneider CH, Almeida MC., Vicari MR. e Bertollo LAC (2006) *Astyanax aff. fasciatus* Cuvier, 1819 (Teleostei; Characidae): evidences of a species complex in the upper rio Tibagi Basin (Paraná, Brazil). *Neotrop. Ichth.*, vol. 4, 197–202.
- Attard CRM, Möller LM, Sasaki M, Hammer MP, Bice CM, Brauer CJ, ... Beheregaray LB (2016). A novel holistic framework for genetic-based captive-breeding and reintroduction programs. *Conservation Biology: The Journal of the Society for Conservation Biology*, 30(5), 1060–1069. <http://doi.org/10.1111/cobi.12699>
- Avise JC (2004) *Molecular markers, natural history and evolution molecular markers*. 2 ed. Sunderland: Sinauer Associates; Inc. Publishers. p. 475-540
- Bailey RC, Norris RH, and Reynoldson TB (2004) *Bioassessment of freshwater ecosystems—using the reference condition approach*. Kluwer Academic Publishers, Boston.

- Barroso RM; Hilsdorf AWS; Moreira HLM et al. (2005) Genetic diversity of wild and cultured populations of *Brycon opalinus* (Cuvier, 1819) (Characiforme, Characidae, Bryconinae) using microsatellites. *Aquaculture*, v.247, p.51-65.ca
- Baumgartner G, Nakatani K, Gomes LC (2004) Identification of spawning sites and natural nurseries of fishes in the upper Paraná River, Brazil. *Environmental Biology of Fishes*, 71, 115–125.
- Baumgartner LJ, Reynoldson N, Gilligan DM (2006) Mortality of larval Murray cod (*Maccullochella peelii peelii*) and golden perch (*Macquaria ambigua*) associated with passage through two types of low-head weirs. *Mar. Freshw. Res.* 57, 187–191
- Beheregaray LB, Levy JA (2000) Population genetics of the silverside *Odonthes argentinensis* (Teleostei, Atherinopsidae): evidence for speciation in an estuary of southern Brazil. *Copeia* 2:441–447
- Bentzen P, Olsen JB, McLean JE, Seamons TR, Quinn TP (2001) Kinship analysis of Pacific salmon: insights into mating, homing, and timing of reproduction. *J. Heredity*, 92, 127–136.
- Bert TM, Seyom S, Tringali MD, McMillen-Jackson A (2002) Methodologies for conservation assessment of the genetic biodiversity of aquatic macro-organisms. *Braz. J. Biol.*, 62: 387-408.
- Blouin MS, (2003) DNA-based methods for pedigree reconstruction and kinship analysis in natural populations. *Trends Ecol. Evol.* 18, 503–511.
- Buckup PA; Menezes NA; Ghazzi MS (2007) (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.
- Bylemans J, Maes GE, Diopere E, Cariani A, Senn H, Taylor MI, Ogden R (2016) Evaluating genetic traceability methods for captive-bred marine fish and their applications in fisheries management and wildlife forensics. *Aquaculture Environment Interactions*, 8, 131–145. <http://doi.org/10.3354/aei00164>
- Calcagnotto D, & DeSalle R (2009) Population genetic structuring in pacu (*Piaractus mesopotamicus*) across the Paraná-Paraguay basin: evidence from microsatellites. *Neotropical Ichthyology*, 7: 607-616.
- Carvalho GR (1993) Evolutionary aspects of fish distribution: genetic variability and adaptation. *J Fish Biol*, 43(Suppl. A):53-73.
- Castro J, Bouza C, Presa P, Pino-Querido A, Riaza A, Ferreiro I, Martínez P (2004) Potential sources of error in parentage assessment of turbot (*Scophthalmus maximus*) using microsatellite loci. *Aquaculture*, 242(1-4), 119–135. <http://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2004.09.010>

- Castro RMC (1999) Evolução da ictiofauna de riachos sul- americanos: padrões gerais e possíveis processos causais. In: Caramaschi, E.P, Mazzoni R., Peres-Neto, P.R. (eds) *Ecologia de Peixes de Riachos*. PPGE-UFRJ, Rio de Janeiro, pp 139–155
- Castro RMC. & Menezes NA. (1998) Estudo diagnóstico da diversidade de peixes do Estado de São Paulo. In *Biodiversidade do Estado de São Paulo, Brasil: Síntese do conhecimento ao final do século XX, vertebrados* (R.M.C. Castro, ed.). WinnerGraph, São Paulo, p .1-13.
- Caudron A, Lasne E, Gillet C, Guillard J, & Champigneulle A (2014) Thirty years of reoligotrophication do not contribute to restore self- sustaining fisheries of Arctic charr, *Salvelinus alpinus*, in Lake Geneva. *Fisheries*
- Chesser RK, Smith MH, Brisbin IL (1980) Management and maintenance of genetic variability in endangered species. *Int. ZooYb*, 20, 146-154.
- China Three Georges Corporation Brasil – CTG Brasil (2018) <http://ctgbr.com.br/> - acessado 15 de fevereiro de 2018.
- Chistiakov DA, Hellemans B, & Volckaert FAM (2006) Microsatellites and their genomic distribution, evolution, function and applications: A review with special reference to fish genetics. *Aquaculture*, 255(1-4), 1–29. <http://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2005.11.031>
- Comitê da Bacia Hidrográfica do rio Sapucaí – CBH Sapucaí (2018) <http://www.cbhsapucaí.org.br/cbh/Pagina.do;jsessionid=13gn7tajxu7lu?idSecao=15> - acessado 15 de fevereiro de 2018.
- Cowx IG (2002) Analysis of threats to freshwater fish conservation: past and present challenges. In: Collares-Pereira MJ, Coelho MM *Conservation of freshwater fishes: options for the future*, Fishing New Books, Blackwell Science, p. 201.
- Crook DA, Lowe WH, Allendorf FW, Eros T, Finn DS, Gillanders BM, Hughes JM (2015) Human effects on ecological connectivity in aquatic ecosystems: Integrating scientific approaches to support management and mitigation. *Science of the Total Environment*, 534, 52–64. <http://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.04.034>
- Crutsinger GM, Collins MD, Fordyce JA, Gompert Z, Nice CC, Sanders NJ (2006) Plant genotypic diversity predicts community structure and governs an ecosystem process. *Science* 313, 966–968.
- De Lucena CAS., & Soares HG (2016) Review of species of the *Astyanax bimaculatus* “caudal peduncle spot” subgroup sensu Garutti & Langeani (Characiformes, Characidae) from the rio la Plata and rio São Francisco drainages and coastal systems of southern Brazil and Uruguay. *Zootaxa*, 4072(1), 101–125. <http://doi.org/10.11646/zootaxa.4072.1.5>

- DeWoody JA, Avise JC (2000) Microsatellite variation in marine, freshwater and anadromous fishes compared with other animals. *Journal of Fish Biology*, 56, 461–473.
- Doyle RM, Perez-Enriquez R, Takagi M, & Taniguchi N (2001). Selective recovery of founder genetic diversity in aquacultural broodstocks and captive, endangered fish populations. *Genetica*, 111(1-3), 291–304. <http://doi.org/10.1023/A:1013772205330>
- Drauch AM, Rhodes OE Jr. (2007) Genetic evaluation of the lake sturgeon reintroduction program in the Mississippi and Missouri Rivers. *N Am J Fish Manag* 27: 434–442.
- Eschmeyer WN (Eds). (2012) *Catalog of Fishes: Genera, Species, References*. California Academy of Sciences (<http://research.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/fishcatmain.asp>). Versão eletrônica acessada 25 de Janeiro de 2018.
- Esguícero ALH., & Arcifa MS (2010) Fragmentation of a Neotropical migratory fish population by a century-old dam. *Hydrobiologia*, 638, 41–53. <http://doi.org/10.1007/s10750-009-0008-2>
- Evanno G, Regnaut S and Goudet J (2005) Detecting the number of cluster of individuals using the software structure: A simulation study. *Molecular Ecology*, v. 14, p. 2611-2620.
- Excoffier L e Lischer HEL (2010) Arlequin suite ver. 3.5: A new series of programs populations genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources*, 10, 564-567.
- Federal U, & Grosso DM (2009) Monitoramento da variabilidade genética de pacu, 1191–1195.
- Feldheim KA, Gruber SH, Ashley MV (2001) Multiple paternity of a lemon shark litter (Chondrichthyes: Carcharhinidae). *Copeia*, 2001, 781– 786.
- Ferreira DG, Souza-Shibatta L, Shibatta OA, Sofia SH, Carlsson J, Dias JHP, Makrakis, MC (2017) Genetic structure and diversity of migratory freshwater fish in a fragmented Neotropical river system. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 27(1), 209–231. <http://doi.org/10.1007/s11160-016-9441-2>
- Fisher RA (1930) *The genetical theory of natural selection*. Oxford: Oxford University Press
- Frankham R (2010). Challenges and opportunities of genetic approaches to biological conservation. *Biological Conservation*, 143(9), 1919–1927. <http://doi.org/10.1016/j.biocon.2010.05.011>

- Franklin IR (1980) Evolutionary change in small populations, In Soulé ME e Wilcox BA, eds Conservation Biology. An Evolutionary- Ecological Perspective, Sunderland, MA: Sinauer, pp.135-149.
- García De León FJ, Chikhi L and Bonhomme F (1997) Micro- satellite polymorphism and population subdivision in natu- ral populations of European sea bass *Dicentrarchus labrax* (Linneo 1758) *Mol Ecol* 6:51-62.
- García De León FJ, Chikhi L E Bonhomme F (1997) Microsatellite polymorphism and population subdivision in natu- ral populations of European sea bass *Dicentrarchus labrax* (Linneo 1758), *Mol Ecol*, 6:51-62.
- Garutti V & H Bristki (2000) Descrição de uma nova espécie de *Astyanax* (Teleostei: Characidae) da bacia do alto rio Paraná e considerações sobre as demais espécies do gênero. *Comunicações do Museu de Ciências e Tecnologia da PUCRS, Série* <http://doi.org/10.1590/S1415-47572002000400008>
- Gerber S, Chabrier P, Kremer A (2003) famoz: a software for parentage analysis using dominant, codominant and uniparentally inherited markers. *Molecular Ecology Notes*, 3, 479–481.
- Glover KA, Hansen MM, & Skaala Ø (2009) Identifying the source of farmed escaped Atlantic salmon (*Salmo salar*): Bayesian clustering analysis increases accuracy of assignment. *Aquaculture*, 290(1-2), 37–46. <http://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2009.01.034>
- Godinho HP, Godinho AL (1994) Fish communities in southeastern Brazilian river basins submitted to hydroelectric impoundments. *Acta Limnologica Brasiliensis* 5: 187–197.
- Goudet J (2002) FSTAT, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices version 2.9.3. Available from <http://www.unil.ch/izea/software/Fstat.html>. Updated from Goudet (1995).
- Hahn, NS, Andrian IF, Fugi R e Almeida VLL (1997). Ecologia trófica, p.209-228. In: Vazzoler AEAM, Agostinho AA e Hahn NS (ed.). *A planície de inundação do alto rio Paraná: aspectos físicos, biológicos e socioeconômicos*. Maringá, Editora da Universidade Estadual de Maringá, 460p.
- Hales Jennifer, Petry Paulo (2006). *Freshwater Ecoregions of the World*. Disponível em: <http://www.feow.org/ecoregions>.
- Hansen MM, Nielsen EE, Ruzzante DE, Bouza C, & Mensberg KD (2000) Genetic monitoring of supportive breeding in brown trout (*Salmo trutta* L.), using microsatellite DNA markers. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 2139(1991), 2130–2139. <http://doi.org/10.1139/cjfas-57-10-2130>
- Hardy O; Vekemans X (2002) SPAGeDi: a versatile computer program to analyse spatial genetic structure at the individual or population levels. *Molecular Ecology Notes*, v.2, p. 618–620.

- Harrison, H. B., Saenz-Agudelo, P., Planes, S., Jones, G. P., & Berumen, M. L. (2013). Relative accuracy of three common methods of parentage analysis in natural populations. *Molecular Ecology*, 22(4), 1158–1170. <http://doi.org/10.1111/mec.12138>
- Hartl DLe Clark AG (1997) Principles of Population Genetics. Sinauer, Canadá, 542 pp.
- Hatanaka T, Henrique-Silva F, & Galetti PM (2006) Population substructuring in a migratory freshwater fish *Prochilodus argenteus* (Characiformes, Prochilodontidae) from the São Francisco River. *Genetica*, 126, 153–159. <http://doi.org/10.1007/s10709-005-1445-0>
- Hauser L, Baird M, Hilborn R, Seeb LW, & Seeb JE (2011) An empirical comparison of SNPs and microsatellites for parentage and kinship assignment in a wild sockeye salmon (*Oncorhynchus nerka*) population. *Molecular Ecology Resources*, 11(SUPPL. 1), 150–161. <http://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2010.02961.x>
- Hayes, B, Sonesson, AK, & Gjerde B (2005). Evaluation of three strategies using DNA markers for traceability in aquaculture species. *Aquaculture*, 250(1-2), 70–81. <http://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2005.03.008>
- Hedrick PW, Kalinowski ST (2000) Inbreeding depression in conservation biology. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 31, 139–162.
- Heggenes J, & Roed, KH (2006) Do dams increase genetic diversity in brown trout (*Salmo trutta*)? Microgeographic differentiation in a fragmented river. *Ecology of Freshwater Fish*, 15(4), 366–375. <http://doi.org/10.1111/j.1600-0633.2006.00146.x>
- Herbinger CM, O'Reilly PT, & Verspoor E (2006) Unravelling first-generation pedigrees in wild endangered salmon populations using molecular genetic markers. *Molecular Ecology*, 15(8), 2261–2275. <http://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2006.02923.x>
- Herbinger CM, Roger, WD, Pitman RP, Plaquet D, Mesa KA, Morris DB, Wright JM, Cook D (1995) DNA fingerprint based analysis of paternal and maternal effects on offspring growth and survival in communally reared rainbow trout. *Aquaculture*, 137, 245–256.
- Hughes AR, Inouye BD, Johnson MTJ, Underwood N, & Vellend M (2008) Ecological consequences of genetic diversity. *Ecology Letters*, 11(6), 609–623. <http://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2008.01179.x>
- Iervolino F, de Resende EK, & Hilsdorf AWS (2010) The lack of genetic differentiation of pacu (*Piaractus mesopotamicus*) populations in the Upper-Paraguay Basin revealed by the mitochondrial DNA D-loop region: Implications for fishery management. *Fisheries Research*, 101(1-2), 27–31. <http://doi.org/10.1016/j.fishres.2009.09.003>
- Iglesias J, Ojea G, Otero JJ, Fuentes L (2003) Comparison of mortality of wild and released reared group turbot, *Scophthalmus maximus*, on an exposed beach (Ría

- de Vigo, NW Spain) and a study of the populations dynamics and ecology of the natural population. *Fisheries Management and Ecology*, 10: 51-59.
- Ignal AV, & Ilan DM (2002) A review on SNP and other types of molecular markers and their use in animal genetics, 34, 275–305. <http://doi.org/10.1051/gse>
- Jelks HL, Walsh SJ, Burkhead NM, Contreras-Balderas S e outros (2008) Conservation status of imperiled North American freshwater and diadromous fishes. *Fisheries*, 33: 372–407.
- Jones AG e Ardren WR (2003) Methods of parentage analysis in natural populations. *Mol. Ecol.* 12: 2511–2523.
- Jones AG, Small CM, Paczolt KA, Ratterman NL (2010) A practical guide to methods of parentage analysis. *Mol Ecol Resour* 10: 6–30
- Jones OR, & Wang J (2010) Molecular marker-based pedigrees for animal conservation biologists. *Animal Conservation*, 13(1), 26–34. <http://doi.org/10.1111/j.1469-1795.2009.00324.x>
- Júnio da Graca W & Pavanelli CS (2002) *Astyanax altiparanae* Garutti & Britski, 2000 (Osteichthyes, Characidae) in the Iguaçú River basin. *Acta Scientiarum. Biological Sciences*, 24(October 2014), 451–453.
- Kalinowski ST, Taper ML, Marshall TC (2007) Revising how the computer program Cervus accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. *Mol. Ecol.* 16, 1099–1106.
- King TL, Kalinowski ST, Schill WB, Spidle AP & Lubinski BA (2001) Population structure of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.): a range-wide perspective from microsatellite DNA variation. *Mol. Ecol.*, 10: 807–821.
- Koljonen ML, Tähtinen J, Säisä M, Koskiniemi J (2002) Maintenance of genetic diversity of Atlantic salmon (*Salmo salar*) by captive breeding programmes and the geographic distribution of microsatellite variation. *Aquaculture* 212, 69–92.
- Laikre L; Palm S; Ryman N (2005) Genetic Population Structure of Fishes: Implications for Coastal Zone Management. *Ambio*, (34)2:111-119.
- Langeani F (2007) Diversidade da ictiofauna do Alto Rio Paraná : composição atual e perspectivas futuras. *Biota Neotropica*, 7(3), 181–197. <http://doi.org/10.1590/S1676-06032007000300020>
- Leuzzi MSP, Almeida FS, Orsi ML & Sodr e LMK (2004) Analysis by RAPD of the genetic structure of *Astyanax altiparanae* (Pisces, Characiformes) in reservoirs on the Paranapanema River, Brazil. *Genetics and Molecular Biology*, 27: 355–362.
- L ev eque C, Oberdorff O, Paugy D, Stiassny MLJ y Tedesco PA (2008). Global diversity of fish (Pisces) in freshwater. *Freshwater Animal Diversity Assessment - Developments in Hydrobiology* 198: 545-567.

- Lévêque CT, Oberdorff D, Paugy MLJ, Stiassny e. Tedesco PA (2008) Global diversity of fish (Pisces) in freshwater. *Freshwater Animal Diversity Assessment - Developments in Hydrobiology*; 198: 545-567.
- Litt M; Luty JA (1989) A hypervariable microsatellite revealed by invitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac-muscle actin gene. *American Journal of Human Genetics*, v.44, n.3, p.397-401.
- Liu ZJ; Cordes JF (2004) DNA markers technologies and their applications in aquaculture genetics. *Aquaculture*, 238 (1): 37.
- Lopera-Barrero NM, Ribeiro RP, Povh JA, Sirol RN, & Mangolin CA (2010) Avaliação genética de populações naturais e de estoques de um programa de repovoamento de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) utilizando marcadores microssatélite. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinaria E Zootecnia*, 62(4), 954–963. <http://doi.org/10.1590/S0102-09352010000400027>
- Lopera-Barrero NM, Tanamati F, Del Pilar Rodriguez-Rodriguez M, Povh JA, Poveda-Parra AR, Otone, RAA, Ribeiro RP (2016) Cross-amplification of heterologous microsatellite markers in *Rhamdia quelen* and *Leporinus elongatus*. *Semina: Ciências Agrárias*, 37(1), 517–524. <http://doi.org/10.5433/1679-0359.2016v37n1p517>
- López H, Menni R, Donato M & Miquelarena A (2008) Biogeographical revision of Argentina (Andean and Neotropical Regions): an analysis using freshwater fishes. *Journal of Biogeography*, 35, 1564-1579.
- McAllister DE., Hamilton AL., e Harvey B (1997) Global freshwater biodiversity: striving for the integrity of freshwater ecosystems. *Sea Wind* 11(3):1–142.
- McNeely, JA, Miller, KR, Reid, WV, Mittermeier, RA, Werner, TB (1990). *Conserving the World's Biological Diversity*. IUCN, World Resources Institute, Conservation International, WWF-US and the World Bank, Washington, DC.
- Melo BF, Sato Y, Foresti F, & Oliveira C (2013) The roles of marginal lagoons in the maintenance of genetic diversity in the Brazilian migratory fishes *Prochilodus argenteus* and *P. Costatus*. *Neotropical Ichthyology*, 11(3), 625–636. <http://doi.org/10.1590/S1679-62252013000300016>
- Mendonça FF, Hashimoto DT, Porto-Foresti F, Oliveira C, Gadig OBF, & Foresti F (2009). Identification of the shark species *Rhizoprionodon lalandii* and *R. porosus* (Elasmobranchii, Carcharhinidae) by multiplex PCR and PCR-RFLP techniques. *Molecular Ecology Resources*, 9(3), 771-773.
- Metzgar D, Bytof J, Wills C (2000) Selection against frameshift mutations limits microsatellite expansion in coding DNA. *Genome Res.* 10, 72–80.
- Moreira-Filho O, Bertollo LAC (1991) *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae): a species complex. *Rev Bras Genet*, 14:331–358.

- Nelson JS (2006) *Fishes of the world*. 4 rd edition. Hoboken, New Jersey: John Wiley and Sons, p. 601.
- Nelson K, Soulé M (1987) Genetical conservation of exploited fishes, In Ryman N e Utter F, eds *Population Genetics and Fishery Management*. Seattle and London: Washington Sea Grant Publications/ Univ. Washington Press, pp. 345-368.
- Nielsen R, Mattila DK, Clapham PJ, Palsboll PJ (2001) Statistical approaches to paternity analysis in natural populations and applications to the North Atlantic humpback whale. *Genetics*, 157, 1673–1682.
- Norris AT, Bradley DG, and Cunningham EP (2000) Parentage and relatedness determination in farmed Atlantic salmon (*Salmo salar*) using microsatellite markers. *Aquaculture*, 182:73–83.
- Oliveira C, Foresti F, & Hilsdorf AWS (2009) Genetics of neotropical fish: From chromosomes to populations. *Fish Physiology and Biochemistry*, 35(1), 81–100. <http://doi.org/10.1007/s10695-008-9250-1>
- Oliveira C, Pereira AC, Galhardo E, Foresti F, Moreira JA (2005) Análise genética de populações selvagens de curimatá (*Prochilodus lineatus*) e lambari (*Astyanax altiparanae*) do rio Paranapanema, utilizando marcadores de RAPD. Disponível em: . Acesso em: 25 nov.
- Ornelas-Garcia CP, Domínguez-Domínguez O & Doadrio I (2008) Evolutionary history of the fish genus *Astyanax* Baird & Girard (1854) (Actinopterygii, Characidae) in Mesoamerica reveals multiple morphological homoplasies. *BMC Evolutionary Biology*, 8: 1-17
- Orsi ML (2001) *Biologia populacional de Astyanax altiparanae* Garutti & Britski, 2000 (Teleostei, Characidae) da bacia do rio Paranapanema (baixo do rio Tibagi). Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 25(4), 401–407.
- Orsi ML, Shibatta, OA, Silva-Souza AT (2002) Caracterização biológica de populações de peixes do rio Tibagi, localidade de Sertanópolis, p. 425-432. In: Medri ME, Bianchini E, Shibatta OA, Pimenta JA (Eds). *A bacia do rio Tibagi*, Londrina, UEL.
- Paiva SR, Dergam JA; Machado F (2006) Determining management units in southeastern Brazil: the case of *Astyanax bimaculatus* (Linnaeus, 1758) (Teleostei: Ostariophysi: Characidae). *Hydrobiologia*, n. 560, p. 93-404.
- Pante M, Gjerde B, McMillan I (2001) Inbreeding levels in selected populations of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture* 192, 213–224.
- Peel D, Ovenden JR, Peel SL (2004) *NEESTIMATOR: Software for Estimating Effective Population Size, Version 1.3*. Queensland Government: Department of Primary Industries and Fisheries, Brisbane, Queensland.

- Pemberton JM (2008). Wild pedigrees: the way forward. Proc. Roy. Soc. Lond. Ser. B Biol. Sci. 275, 613–621.
- Peretti D, & Andrian IDF (2008) Feeding and morphological analysis of the digestive tract of four species of fish (*Astyanax altiparanae*, *Parauchenipterus galeatus*, *Serrasalmus marginatus* and *Hoplias aff. malabaricus*) from the upper Paraná River floodplain, Brazil. Brazilian Journal of Biology, 68(3), 671–679. <http://doi.org/10.1590/S1519-69842008000300027>
- Perrier C, Guyomard R, Bagliniere JL, Evanno G (2011) Determinants of hierarchical genetic structure in Atlantic salmon populations: Environmental factors vs. anthropogenic influences. Molecular Ecology, 20, 4231–4245.
- Perrier C, Guyomard R, Bagliniere JL, Nikolic N, Evanno, G (2013) Changes in the genetic structure of Atlantic salmon populations over four decades reveal substantial impacts of stocking and potential resiliency. Ecology and Evolution, 3, 2334–2349.
- Pino-Querido A, Hermida M, Vilariño M, Bouza C, & Martínez P (2010). Statistical properties and performance of pairwise relatedness estimators using turbot (*Scophthalmus maximus* L.) family data. Aquaculture Research, 41(4), 528–534. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2009.02344.x>
- Piorski NM, Sanches A, Carvalho-Costa LF, Hatanaka T, Carrillo-Avila M, Freitas PD, & Galetti PM (2008) Contribution of conservation genetics in assessing neotropical freshwater fish biodiversity. Brazilian Journal of Biology = Revista Brasileira de Biologia, 68(4 Suppl), 1039–1050. <http://doi.org/10.1590/S1519-69842008000500011>
- Porto-Foresti F (2001) Análise das regiões organizadoras de nucléolo polimórficas em truta Arco-íris (*Onchorhynchus mykiss*): mecanismo de herança e efeitos no desenvolvimento, 119 f. Tese de Doutorado, Instituto de Biociências de Botucatu - Universidade Estadual Paulista, Botucatu.
- Porto-Foresti F (2001) Análise das regiões organizadoras de nucléolo polimórficas em truta Arco-íris (*Onchorhynchus mykiss*): mecanismo de herança e efeitos no desenvolvimento, 119 f. Tese de Doutorado, Instituto de Biociências de Botucatu - Universidade Estadual Paulista, Botucatu.
- Povh JA, Lopera Barrero NM, Ribeiro RP, Lupchinski Jr. E, Gomes PC, & Lopes TS. (2008). Monitoreo genético en programas de repoblamiento de peces mediante marcadores moleculares. Ciencia E Investigación Agraria, 35(1), 5–15. <http://doi.org/10.4067/S0718-16202008000100001>
- Povh JA, Ribeiro RP, Lopera-Barrero NM, Gomes PC, Blanck, DV, Vargas L, Jacometo, CB and Lopes TS (2009) Monitoramento da variabilidade genética de pacu, *Piaractus mesopotamicus*, do programa de aumento de estoque do rio Paranapanema. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec. 61 (5), 1191-1195

- Prado FD, Hashimoto DT, Mendonca FF, Senhorini JA, Foresti F, & Porto-Foresti F (2011). Molecular identification of hybrids between 42 Neotropical catfish species *Pseudoplatystoma corruscans* and *Pseudoplatystoma reticulatum*. *Aquaculture Research*, 42(12), 1890-1894.
- Primmer CR, Koskinen MT, Piironen J (2000) The one that did not get away: individual assignment using microsatellite data detects a case of fishing competition fraud. *Proc. R. Soc. Lond., B Biol. Sci.* 267, 1699–1704.
- Prioli SMAP., Prioli AJ., Júlio Jr. HF, Pavanelli CS, Oliveira AV, Carrer H, Carraro DM e Prioli LM (2002) Identification of *Astyanax altiparanae* (Teleostei, Characidae) in the Iguaçú River, Brazil, based on mitochondrial DNA and RAPD markers. *Genetics and Molecular Biology*, vol. 25, no. 4, p. 421-430.
- Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P (2000) Inference of population Structure using multilocus genotype data. *Genetics*, 155 (2):945–59.
- Queller DC, Strassmann JE, Hughes CR (1993) Microsatellites and kinship. *Trends in Ecology and Evolution*, 8, 285–288.
- Ramella MS, Kroth MA, Meurer S, Nuñez APDO, Zaniboni Filho E, & Arisi ACM (2006) Genetic variability in four fish species (*Pimelodus maculatus*, *Prochilodus lineatus*, *Salminus brasiliensis* and *Steindachneridion scripta*) from Uruguay River Basin. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 49(4), 589–598. <http://doi.org/10.1590/S1516-89132006000500008>
- Ramos JVB, Sodr e LMK, Orsi ML, & de Almeida FS (2012) Genetic diversity of the species *Leporinus elongatus* (Teleostei: Characiformes) in the canoas complex - Paranapanema river. *Neotropical Ichthyology*, 10(4), 821–828. <http://doi.org/10.1590/S1679-62252012000400015>
- Raymod M; Rousset F (1995) GENEPOP 1.2: population genetics software for exact tests and ecumenicism. *Journal Heredity*, v. 86, p. 248-249.
- Reed DH, & Frankham R (2003) Correlation between Fitness and Genetic Diversity\Correlaci n entre Adaptabilidad y Diversidad Gen tica. *Conservation Biology*, 17(1), 230–237. <http://doi.org/10.1046/j.1523-1739.2003.01236>.
- Reis RE, Albert, JS, Di Dario, F, Mincarone, MM, Petry, P, & Rocha, LA (2016) Fish biodiversity and conservation in South America. *Journal of Fish Biology*, 89(1), 12–47. <http://doi.org/10.1111/jfb.13016>
- Renno JE, Machordom A, Blanquer A, & Boursot P (1991) Polymorphism of mitochondrial genes in populations of *Leporinus friderici* (Bloch, 1794): intraspecific structure and zoogeography of the Neotropical fish. *Gen tica*, 84(2), 137–142. <http://doi.org/10.1007/BF00116554>
- Renno JF, Berrebi P, Boujard T, Guyomard R (1990) Intra- specific genetic differentiation of *Leporinus friderici* (Anostomidae, Pisces) in French Guiana and

- Brazil: a genetic approach to the refuge theory. *J Fish Biol* 36:83– 95. doi:10.1111/j.1095-8649.1990.tb03522.x
- Reusch TBH, Ehlers A, Haemmerli A & Worm B (2005) Ecosystem recovery after climatic extremes enhanced by genotypic diversity. *Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A.*, 102, 2826–2831.
- Revenga C, Campbell I, Abell R, de Villiers P, Bryer M. (2005) Prospects for monitoring freshwater ecosystems towards the 2010 targets. *Philosophical Transactions of the Royal Society B* 360: 397–413.
- Ribeiro RP; Lopera-Barrero NM.; Povh, JA; Rodriguez-Rodriguez MP; Fornari, DC; Baumgartner, G; Baumgartner D; Souza, FP; Poveda-Parra AR (2016) Genetic diversity of *Salminus brasiliensis* wild populations in downstream and upstream Cachoeira -Branca, Verde River MS Brazil: a preliminary view. *Semina: Ciências Agrárias, Londrina*, v. 37, n. 1, p. 507-516.
- Ribolli J, de Melo CMR, & Zaniboni-Filho E (2012) Genetic characterization of the neotropical catfish *Pimelodus maculatus* (Pimelodidae, Siluriformes) in the Upper Uruguay River. *Genetics and Molecular Biology*, 35(4), 761–769. <http://doi.org/10.1590/S1415-47572012005000060>
- Rice WR (1989). Analyzing table of statistical tests. *Evolution*, 43: 223-225.
- Rossini BC., Oliveira CAM, Gonçalves De Melo FA, De Araújo Jo Bertaco V, Díaz De Astarloa JM, Rosso JJ, Oliveira C (2016) Highlighting *Astyanax* species diversity through DNA barcoding. *PLoS ONE*, 11(12), 1–20. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0167203>
- Rourke ML, McPartlan HC, Ingram BA, Taylor AC (2010) Biogeography and life history ameliorate the potentially negative genetic effects of stock on Murray cod (*Maccullochella peelii pealii*). *Mar Freshw Res* 61: 918–927
- Ruban GI (1997) Species structure, contemporary distribution and status of the Siberian sturgeon, *Acipenser baerii*. *Environmental Biology of Fishes*, 48, 221–230.
- Ryman N, Utter F, & Laikre L (1995) Protection of intraspecific biodiversity of exploited fishes. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 5(4), 417–446. <http://doi.org/10.1007/BF01103814>
- Savary R, Dufresnes C, Champigneulle A, Caudron A, Dubey S, Perrin N, & Fumagalli L (2017) Stocking activities for the Arctic charr in Lake Geneva: Genetic effects in space and time. *Ecology and Evolution*, 7(14), 5201–5211. <http://doi.org/10.1002/ece3.3073>
- Schlotterer C (2004) The evolution of molecular markers – just a matter of fashion? *Nature Reviews Genetics*, 5,63–69.

- Schneider PM., Bender K, Mayr WR, Parson W, Hoste B, Decorte R 2004. STR analysis of artificially degraded DNA results of a collaborative European exercise. *Forensic Sci. Int.* 139, 123–134.
- Schreier A, Stephenson S, Rust P, & Young S (2015) The case of the endangered Kootenai River white sturgeon (*Acipenser transmontanus*) highlights the importance of post-release genetic monitoring in captive and supportive breeding programs. *Biological Conservation*, 192, 74–81. <http://doi.org/10.1016/j.biocon.2015.09.011>
- Schreier AD, Rodzen J, Ireland S, & May B (2012) Genetic techniques inform conservation aquaculture of the endangered Kootenai river white sturgeon *Acipenser transmontanus*. *Endangered Species Research*, 16(1), 65–75. <http://doi.org/10.3354/esr00387>
- Schwartz, M. K., Luikart, G., & Waples, R. S. (2007). Genetic monitoring as a promising tool for conservation and management. *Trends in Ecology and Evolution*, 22(1), 25–33. <http://doi.org/10.1016/j.tree.2006.08.009>
- Selkoe KA, & Toonen, RJ (2006) Microsatellites for ecologists: A practical guide to using and evaluating microsatellite markers. *Ecology Letters*, 9(5), 615–629. <http://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2006.00889.x>
- Serafy JE, Ault JS, Capo TR, Schultz DR (1999) Red drum, *Sciaenops ocellatus* L., stock enhancement in Biscayne Bay, FL, USA: assessment of releasing unmarked early juveniles. *Aquaculture Research*, 30: 737-750.
- Sofia SH, Silva CRM, Galindo BA, Almeida FS, Sodr e LMK, & Martinez CBR (2006) Population genetic structure of *Astyanax scabripinnis* (Teleostei, Characidae) from an urban stream. *Hydrobiologia*, 553(1), 245–254. <http://doi.org/10.1007/s10750-005-1106-4>
- Sonstebo JH.; Borgstrom R; Heun M (2007) Genetic structure of brown trout (*Salmo trutta* L.) from the Hardann gervidda mountain plateau (Norway) analyzed by microsatellite DNA, a basis for conservation guidelines. *Conservation Genetics*, Dordrecht, v. 8, n. 1, p. 33-44.
- Soul e ME (1980) Thresholds for survival: maintaining fitness and evolutionary potential. In Soul e ME e Wilcox BA, eds *Conservation Biology. An Evolutionary-Ecological Perspective*, Sunderland, MA: Sinauer, pp. 151-169.
- Sourinejad, I (2011). Assignment of progeny in mixed milt fertilization of Caspian brown trout *Salmo trutta caspius* using microsatellite DNA markers: Implications for conservation. *African Journal of Nourinejad*, 10 (June), 5084–5090. <http://doi.org/10.5897/AJB10.664>
- St ttrup JG, & Sparrevohn CR (2007). Can stock enhancement enhance stocks? *Journal of Sea Research*, 57(2-3 SPEC. ISS.), 104–113. <http://doi.org/10.1016/j.seares.2006.09.005>

- Taberlet P and Luikart G (1999) Non-invasive genetic sampling and individual identification. *Biol. J. Linn. Soc.* 68, 41–55
- Técnico R, Doutorando De Sanduíche, Nelson RJ, & Wood CC (2005) *Genética Populacional de Peixes Migratórios*.
- Torregroza AC, River M, Torregroza-espinoza AC, Carlos J, & Gilberto N (2015) Efecto de la variabilidad genética en la producción de larvas de *Prochilodus magdalenae* usadas en programas de repoblamiento en el río, 25(July 2016), 187–192.
- Van Oosterhout C; Hutchinson WF; Wills DPM; Shipley P (2004) MICROCHECKER: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes*, September, v. 4, n. 3, p. 535-53.
- Vari RP & Castro RMC (2007) New species of *Astyanax* (Ostariophysi: Characiformes: Characidae) from the Upper Rio Paraná System, Brazil. *Copeia* 2007(1):150-162.
- Vieira F & Pompeu PS (2001) Peixamento, uma alternativa eficiente? *Ciência Hoje*, 30: 28-33. Técnico, R., Doutorando, D. E. De, Sanduíche, B., Nelson, R. J., & Wood, C. C. (2005). *Genética Populacional de Peixes Migratórios*.
- Wang J (2002) An Estimator for Pairwise Relatedness Using Molecular Markers, 1215(March), 1203–1215.
- Wang J (2016) Individual identification from genetic marker data: Developments and accuracy comparisons of methods. *Molecular Ecology Resources*, 16(1), 163–175. <http://doi.org/10.1111/1755-0998.12452>
- Wang J, & Santure AW (2009) Parentage and sibship inference from multilocus genotype data under polygamy. *Genetics*, 181(4), 1579–1594. <http://doi.org/10.1534/genetics.108.100214>
- Wei Q, Ke F, Zhang J et al. (1997) Biology, fisheries, and conservation of sturgeons and paddlefish in China. *Environmental Biology Fishes*, 48, 241–255.
- Weir BS, Cockerham CC (1984) Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution*, 38, 1358-1370.
- Wilson AJ, & Ferguson MM (2002) Molecular pedigree analysis in natural populations of fishes: approaches, applications, and practical considerations. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 59(10), 1696–1707. <http://doi.org/10.1139/f02-127>
- Wolf C, Burgener M, Hübner P, & Lüthy J (2000). PCR-RFLP analysis of mitochondrial DNA: differentiation of fish species. *LWT-Food Science and Technology*, 33(2), 144-150.

- Woodworth LM, Montgomery ME, Briscoe DA, Frankham R, (2002) Rapid genetic deterioration in captivity: Causes and conservation implications. *Conservation Genetics*, 3, 277–288.
- Wright S (1978) *Evolution and Genetics of Populations: Variability within and among Natural Populations*. University of Chicago Press, Chicago, p. 465.
- Zaganini RL, Hashimoto DT, Henrique L, & Pereira G (2012). Isolation and characterization of microsatellite loci in the Neotropical fish *Astyanax altiparanae* (Teleostei : Characiformes) and cross-species amplification, 91, 24–27.
- Zaganini, Rosângela Lopes. Análise da estrutura genética de *Astyanax altiparanae* (Pisces: Caracidae) na bacia do Alto rio Paraná. 2013, f. 92. Tese de doutorado em Ciências Biológicas A/C Zoologia – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (Unesp), Botucatu.
- Zeisset I, Beebee TJC (2012) Donor population size rather than local adaptation can be a key determinant of amphibian translocation success. *Animal Conservation*, p.1–8. [http://dx. doi.org/10.1111/acv.12003](http://dx.doi.org/10.1111/acv.12003)
- Zhang F, & Tan D (2010) Genetic diversity in population of largemouth bronze gudgeon (*Coreius guichenoti* Sauvage et Dabry) from Yangtze River determined by microsatellite DNA analysis. *Genes & Genetic Systems*, 85(5), 351–7. <http://doi.org/10.1266/ggs.85.351>

7 APÊNDICES

Apêndice 1. Diversidade alélica dos sete *loci* microssatélites aplicados em *Astyanax lacustris*.

<i>Locus</i>		Estoque 2015 (Rp 2015)	Estoque 2016 (Rp 2016)
Asty 04	<i>N</i>	180	27
	<i>A</i>	36,00	14,00
	<i>A_R</i>	18,23	13,74
	<i>H_O</i>	0,893	0,846
	<i>H_E</i>	0,924	0,898
	<i>P-value</i>	0,086	0,715
	<i>Fis</i>	0,034	0,059
	NE-1P	0,271	0,381
	NE-2P	0,157	0,235
Asty 12	<i>A</i>	12,00	9,00
	<i>A_R</i>	6,87	8,76
	<i>H_O</i>	0,572	0,615
	<i>H_E</i>	0,571	0,608
	<i>P-value</i>	0,268	0,648
	<i>Fis</i>	-0,001	-0,011
	NE-1P	0,808	0,779
	NE-2P	0,628	0,590
Asty 15	<i>A</i>	57,00	29,00
	<i>A_R</i>	26,94	27,13
	<i>H_O</i>	0,804	0,629
	<i>H_E</i>	0,962	0,962
	<i>P-value</i>	0,000*	0,000*
	<i>Fis</i>	0,165*	0,350*
	NE-1P	0,150	0,198
Asty 16	NE-2P	0,082	0,111
	<i>A</i>	29,00	13,00
	<i>A_R</i>	17,02	13,00
	<i>H_O</i>	0,483	0,333
	<i>H_E</i>	0,898	0,877
	<i>P-value</i>	0,000*	0,000*
	<i>Fis</i>	0,463*	0,625*
	NE-1P	0,337	0,426
Asty 23	NE-2P	0,203	0,269
	<i>A</i>	20,00	10,00
	<i>A_R</i>	10,86	9,82
	<i>H_O</i>	0,664	0,615
	<i>H_E</i>	0,827	0,749
	<i>P-value</i>	0,000*	0,021
	<i>Fis</i>	0,197*	0,182*
NE-1P	0,506	0,644	
NE-2P	0,336	0,461	

Asty 26	<i>A</i>	43,00	23,00
	<i>A_R</i>	21,87	21,98
	<i>H_O</i>	0,854	0,961
	<i>H_E</i>	0,945	0,941
	<i>P-value</i>	0,003*	0,989
	<i>F_{is}</i>	0,096	-0,021
	NE-1P	0,204	0,263
	NE-2P	0,114	0,152
	Asty 27	<i>A</i>	30,00
<i>A_R</i>		16,19	15,39
<i>H_O</i>		0,852	0,666
<i>H_E</i>		0,914	0,909
<i>P-value</i>		0,000*	0,008
<i>F_{is}</i>		0,068*	0,270*
NE-1P		0,348	0,474
NE-2P		0,210	0,308
Média		<i>A</i>	32,429
	<i>A_R</i>	16,85	15,69
	<i>H_O</i>	0,732	0,666
	<i>H_E</i>	0,863	0,849
	<i>F_{is}</i>	0,146	0,207
	NE-1P	3,96 x 10 ⁻⁴	2,01 x 10 ⁻³
	NE-2P	1,32 x 10 ⁻⁵	8,9 x 10 ⁻⁵

A – número de alelos por *locus*; *H_O* – heterozigosidade observada; *H_E* - heterozigosidade esperada; EHW – teste do equilíbrio de Hardy-Weinberg (*P-value* < 0,05; correção de Bonferroni *P* < 0,007); Negrito - *locus* com desvio do EHW, *F_{is}* – índice de fixação; * - *F_{is}* com valores significativo; ** valores significativos após correção de Bonferroni. NE-1P – média de valores de não exclusão para primeiro pai candidato, NE-2P média de não exclusão para segundo pai candidato.

Apêndice 2. Diversidade alélica dos sete *loci* microssatélites aplicados em populações de *Astyanax lacustris*.

<i>Locus</i>	RR 2015	ER 2015	RP 2015	EP 2015	RR 2016	RP 2016	RR 2017
Asty 04							
<i>N</i>	64	97	65	62	20	118	80
<i>A</i>	21	36	26	21	16	27	28
<i>Ar</i>	12,37	4,50	12,76	12,33	11,91	12,24	12,38
<i>Ho</i>	0,843	0,815	0,830	0,883	0,950	0,810	0,782
<i>He</i>	0,916	0,939	0,917	0,915	0,864	0,913	0,909
<i>P-value</i>	0,054	0,008	0,066	0,235	0,339	0,022	0,011
<i>Fis</i>	0,079	0,133	0,094	0,035	-0,102	0,113	0,140*
Asty 12							
<i>N</i>	64	97	65	62	20	118	80
<i>A</i>	10	10	12	9	9	12	13
<i>Ar</i>	5,97	5,68	6,75	6,40	7,09	5,95	6,67
<i>Ho</i>	0,526	0,602	0,593	0,622	0,550	0,552	0,623
<i>He</i>	0,538	0,587	0,664	0,676	0,662	0,595	0,624
<i>P-value</i>	0,273	0,470	0,045	0,143	0,394	0,004*	0,045
<i>Fis</i>	0,023	-0,025	0,108	0,080	0,173	0,072*	0,001
Asty 15							
<i>N</i>	64	97	65	62	20	118	80
<i>A</i>	37	46	45	38	16	45	47
<i>Ar</i>	15,22	17,48	18,06	17,14	16,00	16,76	18,12
<i>Ho</i>	0,770	0,691	0,830	0,830	0,769	0,651	0,702
<i>He</i>	0,925	0,956	0,963	0,952	0,963	0,950	0,964
<i>P-value</i>	0,003*	0,001*	0,001*	0,000*	0,001*	0,000*	0,001*
<i>Fis</i>	0,168	0,278*	0,138	0,129*	0,207*	0,315*	0,273*

Apêndice 2. Continuação.

<i>Locus</i>	RR 2015	ER 2015	RP 2015	EP 2015	RR 2016	RP 2016	RR 2017
Asty 16							
<i>N</i>	64	97	65	62	20	118	80
<i>A</i>	21	23	20	23	7	21	18
<i>Ar</i>	11,43	12,93	11,96	12,71	6,28	11,72	11,60
<i>Ho</i>	0,576	0,364	0,614	0,327	0,333	0,293	0,241
<i>He</i>	0,902	0,916	0,910	0,915	0,692	0,886	0,902
<i>P-value</i>	0,000*	0,000*	0,000*	0,000*	0,002*	0,000*	0,000*
<i>Fis</i>	0,363*	0,603*	0,3276*	0,644*	0,525*	0,670*	0,734*
Asty 23							
<i>N</i>	64	97	65	62	20	118	80
<i>A</i>	16	18	15	11	9	17	17
<i>Ar</i>	9,58	9,58	9,16	7,47	8,05	8,86	9,16
<i>Ho</i>	0,825	0,718	0,774	0,766	0,650	0,743	0,618
<i>He</i>	0,864	0,843	0,849	0,805	0,861	0,843	0,815
<i>P-value</i>	0,019	0,000*	0,063	0,830	0,003*	0,250	0,000*
<i>Fis</i>	0,045*	0,148*	0,089	0,048	0,250*	0,119	0,243*
Asty 26							
<i>N</i>	64	97	65	62	20	118	80
<i>A</i>	30	33	29	27	15	31	34
<i>Ar</i>	15,70	14,44	15,55	14,52	12,59	14,79	15,66
<i>Ho</i>	0,838	0,828	0,873	0,790	0,833	0,857	0,835
<i>He</i>	0,951	0,940	0,949	0,939	0,904	0,940	0,950
<i>P-value</i>	0,013	0,000*	0,047	0,018	0,025	0,036	0,000*
<i>Fis</i>	0,119	0,120*	0,081	0,159	0,081	0,089	0,121*

Apêndice 2. Continuação.

<i>Locus</i>	RR 2015	ER 2015	RP 2015	EP 2015	RR 2016	RP 2016	RR 2017
Asty 27							
<i>N</i>	64	97	65	62	20	118	80
<i>A</i>	26	33	23	22	13	26	38
<i>Ar</i>	13,36	14,74	13,09	12,48	10,97	11,95	15,45
<i>Ho</i>	0,887	0,892	0,883	0,867	0,900	0,895	0,875
<i>He</i>	0,926	0,938	0,917	0,922	0,880	0,909	0,935
<i>P-value</i>	0,395	0,046	0,347	0,036	0,483	0,043	0,029
<i>Fis</i>	0,043	0,048	0,037	0,059	-0,022	0,015	0,065
Média							
<i>A</i>	23,00	28,43	24,28	21,57	12,14	25,57	27,85
<i>Ar</i>	11,95	11,34	12,48	11,86	10,41	11,75	12,72
<i>Ho</i>	0,752	0,701	0,771	0,726	0,712	0,686	0,668
<i>He</i>	0,860	0,874	0,881	0,875	0,832	0,862	0,871
<i>P-value</i>	-	-	-	-	-	-	-
<i>Fis</i>	0,120	0,187	0,125	0,165	0,159	0,199	0,225

A – número de alelos por *locus*; *Ho* – heterozigosidade observada; H_E heterozigosidade esperada; EHW – teste do equilíbrio de Hardy-Weinberg ($P\text{-value} < 0,05$; correção de Bonferroni $P < 0,007$); Negrito - *locus* com desvio do EHW, *Fis* – índice de fixação; * - *Fis* com valores significativo; ** valores significativos após correção de Bonferroni.

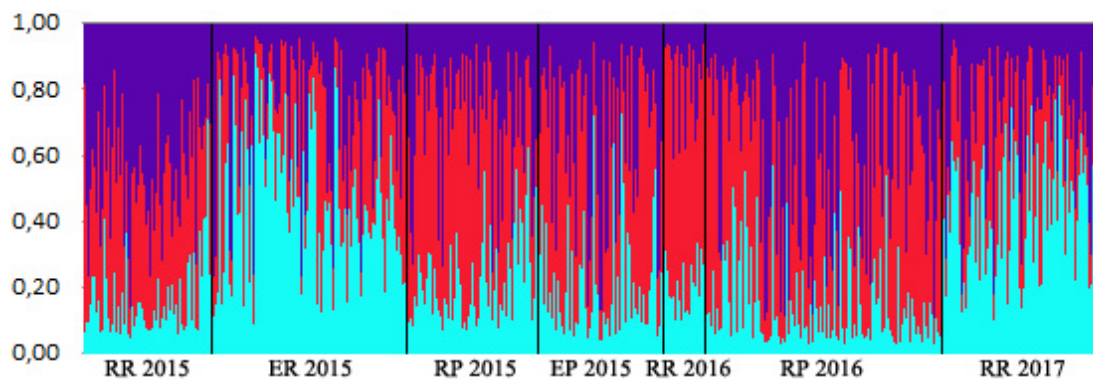
Apêndice 3. Valores de F_{st} entre pares de populações de *Astyanax lacustris*.

	RR 2015	ER 2015	RP 2015	EP 2015	RR 2016	PR 2016	RR 2017
RR 2015	-						
ER 2015	*0,009	-					
RP 2015	0,000	*0,011	-				
EP 2015	0,004	0,006	0,006	-			
RR 2016	0,013	*0,023	0,015	0,008	-		
RP 2016	0,002	*0,006	0,002	0,001	0,013	-	
RR 2017	0,005	0,002	*0,009	0,000	0,013	0,002	

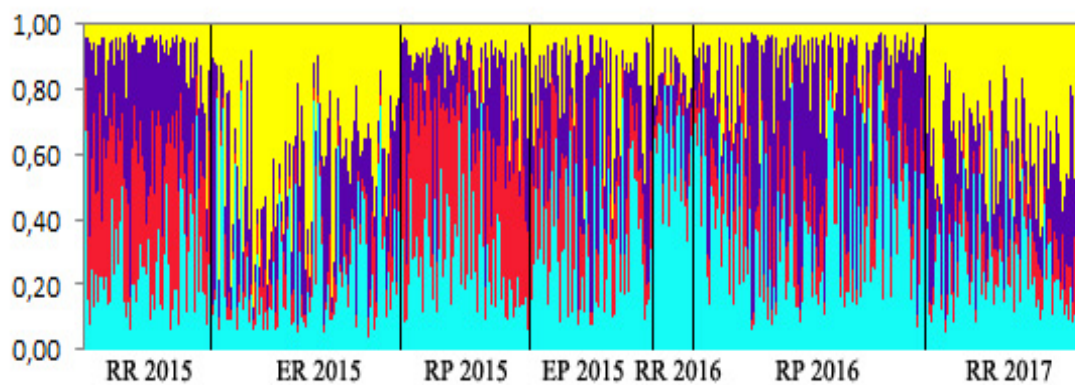
Em negrito, os valores significativos ($P < 0,05$), em negrito e com *, significativo para $P < 0,001$, 1023 permutações.

Apêndice 4. Estrutura *bar plot* das populações de *Astyanax lacustris*, estimada pelo programa STRUCTURE utilizando $K = 3$; $K = 4$ e $K = 5$. Cada cor indica um grupo com base em semelhanças genotípicas. As legendas das populações estão indicadas na tabela 1.

$K = 3$



$K = 4$



K = 5

