

LETÍCIA RAFAELA DE MORAIS

**DIVERSIDADE GENÉTICA INTRA- E INTERPOPULACIONAL DA ESPÉCIE
Myloplus tiete UTILIZANDO MARCADORES MOLECULARES**

Relatório de Pós-doutorado realizado na
Universidade Estadual Paulista (UNESP),
Faculdade de Ciências, Programa de Pós-
Graduação: Biociências Bauru-SP

Supervisor(a): Prof^o Dr. Ricardo Utsunomia

Agência de fomento: CNPq

Nº do Processo: 153630/2024-8

Bauru- SP

2025

DIVERSIDADE GENÉTICA INTRA- E INTERPOPULACIONAL DA ESPÉCIE *Myloplus tiete* UTILIZANDO MARCADORES MOLECULARES

Letícia Rafaela de Moraes

IDENTIFICAÇÃO

Período do estágio: de 01/06/2024 a 30/05/2025

Bolsista CNPq: 01/06/2024 a 30/05/2025

Instituição: Universidade Estadual Paulista, Campus Bauru

Supervisor: Prof. Dr. Ricardo Utsunomia (UNESP Bauru)

RESUMO

Os peixes Neotropicais de água doce representam uma grande diversidade na fauna continental, com mais de 6.200 espécies identificadas e distribuídas em uma área aquática. No entanto, o Brasil, apesar de sua rica biodiversidade, enfrenta desafios de conservação devido à vulnerabilidade dos ambientes aquáticos e às ameaças como poluição e destruição de habitats. Essas ações antrópicas não apenas causam a perda de habitat, mas também reduzem o número de espécies, aumentando o risco de extinção. Entre essas espécies, destaca-se o *Myloplus tiete*, endêmico do Brasil e encontrado nas bacias dos rios Paraná e Paraguai, atualmente classificado como "Em Perigo" no Plano de Ação Nacional para a Conservação das Espécies da Fauna Aquática Ameaçadas de Extinção. Sua sobrevivência está ameaçada pela estocasticidade demográfica, decorrente de populações pequenas e fragmentadas, o que aumenta a endogamia e causa perda de variabilidade genética. Devido à falta de informações sobre a espécie *M. tiete*, o projeto teve como objetivo desenvolver e aplicar marcadores moleculares para analisar a diversidade genética das populações dessa espécie. Inicialmente, foi utilizado um conjunto de marcadores microssatélites, que foram empregados posteriormente para investigar a variabilidade genética dentro e entre as populações de *M. tiete*. Em seguida, foi realizado o sequenciamento parcial da região do D-loop mitocondrial para estimar os fluxos genéticos pretéritos, com o objetivo de compreender a possível história biogeográfica da espécie.

PALAVRAS-CHAVE: Genética de populações; marcadores moleculares; *Myloplus tiete*

ABSTRACT

Neotropical freshwater fishes constitute a highly diverse component of continental fauna, with over 6,200 species identified and distributed across extensive aquatic systems. Despite Brazil's remarkable biodiversity, the country faces major conservation challenges, primarily due to the vulnerability of its aquatic environments and the increasing impacts of anthropogenic threats, such as pollution and habitat destruction. These pressures not only lead to habitat loss but also contribute to the decline in species richness, thereby elevating risks of extinction. Among the affected species is *Myloplus tiete*, a Brazilian endemic occurring in the Paraná and Paraguay river basins, currently listed as "Endangered" under the National Action Plan for the Conservation of Threatened Aquatic Fauna Species. The survival of *M. tiete* is jeopardized by demographic stochasticity associated with small and fragmented populations, which promotes inbreeding and results in a reduction of genetic diversity. Given the limited available information on *M. tiete*, this project aimed to develop and apply molecular markers to assess the genetic diversity of its populations. Initially, a panel of microsatellite markers was utilized to investigate genetic variability within and among populations. Subsequently, partial sequencing of the mitochondrial D-loop region was performed to estimate historical gene flow, with the goal of elucidating the species' potential biogeographic history.

KEYWORDS: Population Genetics; molecular marker; *Myloplus tiete*

1. INTRODUÇÃO

Os peixes Neotropicais, especificamente no ambiente de água doce, representam a fauna continental de vertebrados mais diversificada da Terra, com mais de 6.200 espécies nomeadas e distribuídas em uma área aquática que constituem aproximadamente 0,5% da área total da superfície terrestre (ALBERT *et al.*, 2020).

Essa diversidade da ictiofauna é surpreendentemente alta, não somente em termos do número de espécies, mas principalmente quando avaliada em comparação com a densidade específica (VARI; MALABARBA, 1998; WILEY; JOHNSON, 2010).

O Brasil abriga grande parte dessa diversidade, porém, apesar do seu alto endemismo de espécies, destaca-se também pela vulnerabilidade dos ambientes em que elas se encontram (POLAZ; RIBEIRO, 2017; BICHUETTE; GALLÃO, 2021). Nesse sentido, a ictiofauna tem se tornado cada vez mais ameaçada decorrente de ações antrópicas, como exemplos, a poluição do ambiente, introdução de espécies exóticas, destruição e modificações de habitats. Essas interferências resultam não só na perda do habitat, em termos geográficos, como também na redução do número de indivíduos de uma ou mais espécies, podendo levá-las a extinção (FRANKHAM, 2003; ASHIKAGA *et al.*, 2015).

Dentre essas espécies, podemos citar o *Myloplus tiete*, endêmico do Brasil e distribuído nas bacias dos rios Paraná e Paraguai (JÉGU, 2003; OTA *et al.*, 2018). Atualmente, o *M. tiete* é considerado ameaçado de extinção, sendo enquadrado na categoria “Em Perigo”, de acordo com a Portaria MMA nº 148, de 7 de junho de 2022. Portanto, foi incluído e listado como espécie-alvo do Plano de Ação Nacional para a Conservação das Espécies da Fauna Aquática Ameaçadas de Extinção do Ecossistema Mogi/Pardo/Sapucaí-Mirim/Grande (SHIBATTA *et al.*, 2002).

Pesquisas envolvendo genética de populações de organismos aquáticos, especialmente os peixes, têm sido uma abordagem muito utilizada para analisar padrões de deslocamento e interações populacionais (TRINGALI; BERT *et al.*, 1998; LOWE; ALLENDORF, 2010). Essas pesquisas se baseiam atualmente em três pilares principais: técnicas eficazes para acessar segmentos informativos do DNA, métodos estatísticos para analisar esses dados, e a disponibilidade de programas e pacotes de *softwares* específicos para essa finalidade (TAGGART *et al.*, 1995; EXCOFFIER; HECKEL, 2006).

Entre as técnicas para acessar o polimorfismo do DNA estão os marcadores moleculares, que tratam questões biológicas de maneira eficiente e auxiliam em pesquisas mais

amplas sobre biologia evolutiva, populacional e de conservação (MEDEIROS, 2006; REID *et al.*, 2016).

Entre esses marcadores, aqueles baseados no DNA mitocondrial (DNAm_t) destacam-se como ferramentas essenciais para a análise genética de espécies e populações (CUNHA; SOLÉ-CAVA, 2012), tendo sido amplamente utilizados em estudos evolutivos e populacionais em várias espécies de peixes, resultando na criação de numerosos *primers* universais para diferentes regiões do DNAm_t (CHIESA *et al.*, 2013; RABONE *et al.*, 2015; CHAN *et al.*, 2016).

O DNAm_t apresenta diversas vantagens como marcador genético, destacando-se pela facilidade de isolamento e manipulação, pelo alto número de cópias por célula e pela taxa de mutação relativamente rápida. Além disso, sua riqueza em informações genealógicas torna-o especialmente útil em estudos filogeográficos (GALTIER *et al.*, 2009; CUNHA; SOLÉ-CAVA, 2012).

No entanto, seu padrão de herança uniparental, restrito à linhagem materna, pode introduzir vieses na interpretação da estrutura populacional, especialmente em espécies nas quais os padrões de dispersão diferem entre ambos os sexos (DALY-ENGEL *et al.*, 2012).

Além das sequências mitocondriais, marcadores nucleares também têm se mostrado fundamentais para estudos populacionais e de conservação. Entre estes, destacam-se os microssatélites (ou *Short Tandem Repeats*- STR) devido à sua elevada variabilidade e ampla aplicabilidade (ABDUL-MUNEER, 2014).

Compostos por sequências curtas de 1 a 6 nucleotídeos repetidos em tandem, os microssatélites estão distribuídos de forma abundante e aleatória no genoma. Suas principais características incluem alto conteúdo polimórfico, herança codominante e fácil amplificação por meio da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) (TAUTZ, 1989; SCHLÖTTERER, 2000; SELKOE; TOONEN, 2006), possibilitando acessar e distinguir variações genéticas tanto dentro quanto entre populações (DEWOODY *et al.*, 1995; CHISTIakov *et al.*, 2006).

Esses marcadores são amplamente utilizados para investigar a estrutura populacional, fluxo gênico e padrões de migração em espécies de peixes Neotropicals. Além disso, estudos como estes são fundamentais por permitirem entender como as populações se adaptam a diferentes ambientes e como podem ser afetadas por eventos históricos, como a fragmentação de habitats e a introdução de espécies exóticas (ZANE *et al.*, 2020; BIELIKOVA *et al.*, 2021).

Considerando que *Myloplus tietê* está classificado como ameaçado de extinção e que há carência de informações sobre sua diversidade genética, este projeto teve como objetivo investigar a estruturação populacional e a diversidade genética da espécie na bacia do Alto

Paraná. As amostragens foram realizadas em dois locais distintos: (i) reservatório da Usina Hidrelétrica Engenheiro Souza Dias, no rio

Paraná, entre as cidades de Castilho (SP) e Três Lagoas (MS); e (ii) rio Grande, na cidade de Frutal (MG).

Para isso, foram utilizados marcadores microssatélites visando a análise genética contemporânea, juntamente com a região controle do DNA mitocondrial para inferir os fluxos genéticos históricos.

A partir desses dados, espera-se propor um modelo populacional específico que auxilie no planejamento, manejo e conservação de *M. tiete*, proporcionando um panorama inicial capaz de fundamentar o desenvolvimento de estratégias eficazes para a conservação dessa espécie.

2. OBJETIVOS

O objetivo geral deste projeto consiste em desenvolver e utilizar marcadores moleculares para avaliação genética de populações de *Myloplus tiete* e posteriormente utilizá-los para caracterizar sua diversidade genética intra- e interpopulacional, uma espécie endêmica em perigo de extinção.

2.1 Objetivos específicos

- ✓ Utilizar marcadores microssatélites para a análise da estrutura genética contemporânea e sequências de DNA mitocondrial para inferir fluxos gênicos históricos, com o objetivo de elucidar a história biogeográfica e a dinâmica evolutiva da espécie *M. tiete*;
- ✓ Testar a hipótese da existência de populações distintas de *M. tiete* entre as regiões alvo das amostragens;
- ✓ Propor um modelo populacional e compreender sua história evolutiva.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Após a coleta das amostras, as análises moleculares e estatísticas foram realizadas no Laboratório de Genômica e Conservação de Peixes (LAGENPE), da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP) campus Bauru, SP.

3.1. Coleta dos indivíduos

Foram coletados 30 indivíduos de *M. tiete*, através de pesca manual com auxílio de vara e anzol ou tarrafa. Pequenos fragmentos de nadadeiras foram retirados e acondicionados em tubos de 1.5mL com etanol 100%.

As coletas foram realizadas em dois pontos distintos da bacia do Alto Paraná: reservatório da Usina Hidrelétrica “Engenheiro Souza Dias”, rio Paraná, entre as cidades de Castilho/SP e Três Lagoas/MS; ii) rio Grande, na cidade de Frutal/MG. O projeto foi realizado de acordo com as normas federais para coleta e transporte de animais silvestres (Autorização SISBIO No. 86655-1), bem como os princípios éticos na experimentação animal (Protocolo CEUA – FEIS/UNESP 01/2023).

3.2 Extração de DNA

A extração de DNA foi realizada a partir de fragmentos de nadadeiras dos indivíduos com o kit EasyPure Genomic DNA kit (Transgen). Posteriormente, a integridade das amostras foi avaliada em gel de agarose e a concentração de DNA quantificada em Nanodrop (Invitrogen).

3.3 Análises populacionais por marcadores microsatélites

3.3.1 Seleção de iniciadores

Novos iniciadores específicos para a espécie foram selecionados, seguindo os seguintes parâmetros: (i) temperatura de anelamento entre 50°C e 60°C, (ii) tamanho do amplicons entre 120 à 300 pb, (iii) conteúdo GC entre 40 e 70% e (iv) tamanho dos primers entre 18 e 23 pares de bases (TIBIHIKA *et al.*, 2019). Após isso os iniciadores filtrados ainda foram submetidos à análise de estabilidade físico-química com auxílio da ferramenta DNA OligoAnalyzer (OWCZARZY *et al.*, 2008) para seleção das sequências mais adequadas.

3.3.2 Padronização das reações de PCR e testes de polimorfismo

Os STRs desenvolvidos foram submetidos a reação em cadeia da polimerase (PCR) utilizando material genético de cinco indivíduos aleatórios em gradiente de temperatura de anelamento (54 a 60°C) a fim de identificar a temperatura ideal para os experimentos. Os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose e posteriormente genotipados.

3.4 Análises populacionais por DNA mitocondrial

3.4.1 Amplificação e sequenciamento

A amplificação da região *d-loop* foi realizada utilizando os iniciadores AgiProf (5'TTTTAACTCCCACCCCTTAACTCC3') e AgiPher (5'GGTCCGTCTTAACATCTTCAGTG3'), previamente utilizados por Nogueira *et al.*, (2020). Após a reação de PCR, os *amplicons* foram visualizados em gel de 1,0 % e em seguida, corrido em eletroforese horizontal, utilizando o marcador de peso molecular Low DNA Mass Ladder Invitrogen.

Fatores como pureza (260nm/280nm) e concentração (em ng/μL) do material extraído, foram verificados por densidade óptica através de espectrofotometria no equipamento NanoDrop™ One Microvolume (Thermo Scientific™).

Por fim os produtos foram sequenciados com o kit *BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Ready Reaction* (Applied Biosystems), no equipamento ABI 3130.

3.4.2 Análises de dados mitocondriais (D-loop)

As sequências de DNA obtidas foram analisadas no software Geneious Prime, e alinhadas utilizando o algoritmo MUSCLE. Após o alinhamento, as sequências foram importadas para o ambiente R com o pacote ape (*Analysis of Phylogenetics and Evolution* (PARADIS; CLAUDE; STRIMMER, 2004), utilizando a função read.dna() no formato FASTA. A qualidade e o comprimento das sequências foram verificados manualmente para garantir a consistência dos dados.

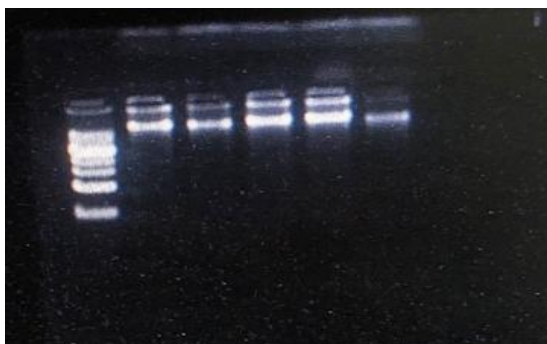
Para caracterizar a diversidade genética, os haplótipos foram identificados com a função `haplotype()` do pacote *pegas* (*Population and Evolutionary Genetics Analysis System*; PARADIS, 2010), que também foi utilizado para calcular a diversidade haplotípica (H_d) e a diversidade nucleotídica (π), por meio das funções `hap.div()` e `nuc.div()`, respectivamente.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Marcadores microssatélites

Até o momento, foram realizadas as extrações e quantificações de 20 amostras de cada região, utilizando todos os diferentes tecidos (**Figura 1**).

Figura 1. Amostras avaliadas em eletroforese em gel de agarose 1%.



A partir disso, foi possível observar nos resultados, que as amostras extraídas a partir do fígado, apresentaram uma concentração maior de DNA em comparação as amostras extraídas do músculo e nadadeira, como pode-se perceber nos resultados da quantificação das amostras em Nanodrop® (**Tabela 1 e Tabela 2**)

Tabela 1. Amostras de nadadeira quantificadas da região de Ilha Solteira/SP. Ng/ μ L indica a concentração da amostra. A260/A280 avalia a pureza em relação a proteínas. A260/A230 indica a presença de contaminantes.

Quantificação de DNA, amostras - Ilha Solteira/SP			
Amostras	ng / μ L	A260/A280	A260/A230
16	4.8	1.19	0.41
18	3.1	3.79	-0.02
19	0.1	-0.36	-0.02

20	10.3	1.81	0.67
21	2.6	2.88	0.43
22	0.6	-27.16	-0.06
23	6.8	2.40	-72.94
24	1.3	3.94	-0.49
27	169.7	02.04	2.32
28	167.5	02.03	2.42
29	32.9	1.93	-2.73
30	5.8	1.55	01.04
31	72.6	1.97	2.82
32	185.9	02.03	2.35
33	63.3	1.97	2.56
34	46.0	1.95	2.33
35	207.6	1.94	1.96
36	43.6	1.90	2.27
39	170.8	1.95	2.18
40	277	2	2.13

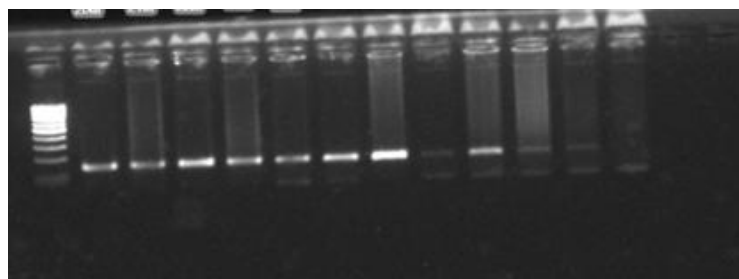
Tabela 2. Amostras de fígado e músculo quantificadas da região de Frutal/MG. A sigla “F” após o número indica que a amostra foi extraída a partir do fígado do indivíduo e a sigla “M” indica que foi extraída a partir do músculo. Ng/μL indica a concentração da amostra. A260/A280 avalia a pureza em relação a proteínas. A260/A230 indica a presença de contaminantes.

Quantificação de DNA, amostras - Frutal/MG			
Amostras	Ng / ul	A260/A280	A260/A230
10 F	1.124	1.44	0.85
10 M	34.4	1.61	0.72
11 M	106.8	1.85	1.20
Amostras	Ng / ul	A260/A280	A260/A230

11 F	1.231.8	1.99	1.71
13 F	1.885.3	1.84	1.32
13 M	69.2	1.79	1.13
20 M	97.9	1.82	1.20
20 F	669.2	1.91	1.83
21 M	262.2	1.88	1.38
21 F	140.2	1.77	0.86
22 F	658.3	2.00	02.06
22 M	195.2	1.26	0.75
24 F	749.3	1.91	1.41
24 M	14.2	1.66	0.42
25 M	175.9	1.86	1.33
25 F	957.6	1.99	1.82
30 F	83.4	1.85	01.07
30 M	12.0	1.36	0.32
32 F	309.3	1.53	0.99
32 M	22.6	1.47	0.46

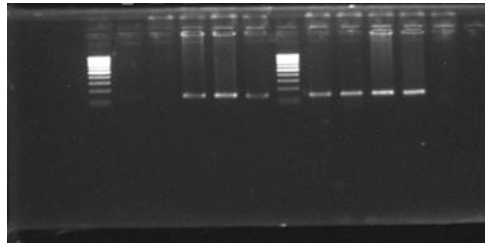
Referente à transferibilidade para o *M. tiete* dos primers disponíveis para a espécie *M. asterias*, foi possível realizá-la por meio da PCR, de forma a permitir o uso em estudos genéticos relacionados à conservação da espécie (**Figura 3**).

Figura 3. Eletroforese em gel de agarose 2%, demonstrando a amplificação da transferibilidade para o *M. tiete* dos primers que estavam disponíveis para a espécie *M. asterias*.



A partir da realização dos testes relativos ao processo de amplificação dos microssatélites, foram determinadas as melhores concentrações de primer, DNA genômico, temperatura de anelamento e demais reagentes (**Figura 4**). Para dar continuidade ao projeto, foi realizada a aquisição da cauda M13, que posteriormente foi incorporada à reação de amplificação por PCR

Figura 4. Testes de amplificação dos microssatélites



4.2. DNA Mitochondrial (Região D-loop)

A análise mitocondrial foi conduzida a partir da sequência da região controle (D-loop) do DNAm em indivíduos de *Myloplus tiete* provenientes das mesmas regiões mencionadas anteriormente.

Foram obtidas 26 sequências da população da região de Ilha Solteira (SP), analisadas por meio do software Geneious. Dentre 622 pares de base, foram detectadas 33 mutações. Os valores de diversidade foram expressivos, com diversidade haplotípica (Hd) de 0,975 e diversidade nucleotídica (π) de 0,01068, indicando ampla variabilidade genética intra-populacional.

Esses dados sugerem uma história evolutiva com altos níveis de recombinação e/ou fluxo gênico pretérito, sendo essenciais para a compreensão da estrutura genética. Além disso, destacam a importância da manutenção de populações geneticamente diversas como forma de aumentar a resiliência frente a pressões ambientais.

Os dados obtidos e as análises propostas permitiram uma compreensão inicial da diversidade genética e estrutura populacional da espécie ameaçada *Myloplus tiete*. Foi possível identificar a importância da conectividade genética entre populações para a manutenção do equilíbrio dos ecossistemas aquáticos onde a espécie ocorre.

A possível existência de populações geneticamente distintas reforça a necessidade de estratégias de conservação específicas, como a criação de Unidades de Manejo ou Unidades Evolutivamente Significativas.

Além disso, o uso de marcadores moleculares mostrou-se fundamental para compreender a adaptação local e orientar ações de manejo sustentáveis, especialmente diante das pressões ambientais e mudanças causadas por atividades humanas.

Estes resultados fornecem uma base sólida para futuras iniciativas de conservação e manejo da espécie, mesmo que este projeto tenha sido encerrado.

5. Conclusão

O presente projeto teve como objetivo caracterizar a diversidade genética intra- e interpopulacional da espécie *Myloplus tiete* utilizando marcadores microssatélites e mitocondriais. Foram realizados avanços significativos nas etapas laboratoriais, com a padronização dos protocolos de extração, amplificação e sequenciamento do DNA. Os dados moleculares foram obtidos com sucesso, possibilitando a futura aplicação de análises estatísticas que poderão ser utilizadas para inferir sobre a estrutura genética das populações estudadas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDUL-MUNEER, P. M. (2014). Application of microsatellite markers in conservation genetics and fisheries management: recent advances in population structure analysis and conservation strategies. *Genetics research international*, 2014(1), 691-759.
- ALBERT, J. S.; TAGLIACOLLO, V. A.; DAGOSTA, F. (2020). Diversification of Neotropical freshwater fishes. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, (51), 27-53.
- ALLENDORF, F. W., LUIKART, G. H., & AITKEN, S. N. (2012). *Conservation and the genetics of populations*. John Wiley & Sons.
- ASHIKAGA, F. Y., ORSI, M. L., OLIVEIRA, C., SENHORINI, J. A., & FORESTI, F. (2015). The endangered species *Brycon orbignyanus*: genetic analysis and definition of priority areas for conservation. *Environmental Biology of Fishes*, 98, 1845-1855.
- BIELIKOVA, O., TARASJUK, S., MRUK, A., ZALOILO, O., & DIDENKO, A. (2021). Microsatellite-based analysis of genetic diversity and population structure of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) Cultured in Ukraine. *Genetics of Aquatic Organisms*, 5(1), 29-39.
- BICHUETTE, M. E.; GALLÃO, J. E. (2021). Under the surface: what we know about the threats to subterranean fishes in Brazil. *Neotropical Ichthyology*, (19), e210089.
- BOUCKAERT, R., HELED, J., KÜHNERT, D., VAUGHAN, T., WU, C. H., XIE, D., ... & DRUMMOND, A. J. (2014). BEAST 2: a software platform for Bayesian evolutionary analysis. *PLoS computational biology*, 10(4), e1003537.
- BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. **Portaria nº 148, de 7 de junho de 2022**. Reconhece as espécies da fauna brasileira ameaçadas de extinção. *Diário Oficial da União: seção 1*, Brasília, DF, 8 jun. 2022. Disponível em: <https://in.gov.br/en/web/dou/-/portaria-mma-n-148-de-7-de-junho-de-2022-406272733>. Acesso em: 02 abr. 2025.
- CHAN, J., LI, W., HU, X., LIU, Y., & XU, Q. (2016). Genetic diversity and population structure analysis of Qinghai-Tibetan plateau schizothoracine fish (*Gymnocypris dobula*) based on mtDNA D-loop sequences. *Biochemical Systematics and Ecology*, 69, 152-160.
- CHIESA, S.; FILONZI, L.; VAGHI, M.; PAPA, R.; MARZANO, F. N. (2013) Molecular barcoding of an atypical cyprinid population assessed by cytochrome B gene sequencing. *Zoological Science* 30(5):408–13

- CHISTIakov, D. A., HELLEMANS, B., & VOLCKAERT, F. A. (2006). Microsatellites and their genomic distribution, evolution, function and applications: a review with special reference to fish genetics. *Aquaculture*, 255(1-4), 1-29.
- CUÉLLAR-PINZÓN, J., PRESA, P., HAWKINS, S. J., & PITA, A. (2016). Genetic markers in marine fisheries: Types, tasks and trends. *Fisheries Research*, 173, 194-205.
- CUNHA, H.; SOLÉ-CAVA, A. M. (2012) **Análise Filogeográfica. In: Matioli SR, Fernandes FMC (ed) Biologia Molecular e Evolução**, 2nd edn. Holos editora, Ribeirão Preto, 197-216 pp.
- DALY-ENGEL TS, SERAPHIN KD, HOLLAND KN, COFFEY JP, NANCE HA, TOONEN RJ AND BOWEN BW (2012a) Global Phylogeography with Mixed-Marker Analysis Reveals Male-Mediated Dispersal in the Endangered Scalloped Hammerhead Shark (*Sphyrna lewini*). *PLoS ONE* 7(1), e29986.
- DEWOODY, J. A., HONEYCUTT, R. L., SKOW, L. C. (1995). Microsatellite markers in white-tailed deer.
- DIVYA, P. R., JOSE, D. M., CHRISTO, M., RAVI, C., & SARKAR, U. K. (2024). Novel Efficient Genome-Wide STR Panels for the Conservation of the Endemic Catfishes of Western Ghats: Critically Endangered *Hemibagrus punctatus* Jerdon (1849) and Vulnerable *Horabagrus brachysoma* (Günther, 1864). *Biochemical Genetics*, 1-18.
- EXCOFFIER, L., HECKEL, G. (2006). Computer programs for population genetics data analysis: a survival guide. *Nature Reviews Genetics*, 7(10), 745-758.
- FRANKHAM, R. (2003). Genetics and conservation biology. *Comptes Rendus. Biologies*, 326(S1), 22-29.
- FRANKHAM, R., BRISCOE, D. A., & BALLOU, J. D. (2002). *Introduction to conservation genetics*. Cambridge university press.
- GALTIER N, NABHOLZ B, GLEMIN S AND HURST G (2009) Mitochondrial DNA as a marker of molecular diversity: a reappraisal. *Molecular Ecology* 18:4541–4550.
- JÉGU, M. Subfamily Serrasalminae. Reis RE, Kullander SO, Ferraris-Junior CJ. Check List of the Freshwater Fishes of South and Central America. Porto Alegre: EdIPUCRS, p. 182-196, 2003.
- KALINOWSKI, S. T. (2006). hw-quickcheck: an easy-to-use computer program for checking genotypes for agreement with Hardy–Weinberg expectations. *Molecular Ecology Notes*, 6(4), 974-979.
- KALINOWSKI, S. T., TAPER, M. L., & MARSHALL, T. C. (2007). Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. *Molecular ecology*, 16(5), 1099-1106.

- KEENAN, K., MCGINNITY, P., CROSS, T. F., CROZIER, W. W., & PRODÖHL, P. A. (2013). diveRsity: An R package for the estimation and exploration of population genetics parameters and their associated errors. *Methods in ecology and evolution*, 4(8), 782-788.
- LOWE, W. H., & ALLENDORF, F. W. (2010). What can genetics tell us about population connectivity?. *Molecular ecology*, 19(15), 3038-3051.
- MEDEIROS, C. D. F. L., CARDOSO, M. A., & FERREIRA, P. C. G. (2006). Uso de microsatélites em estudos de biologia da conservação. *Floresta e Ambiente*, 13(2), 25-36.
- MEMIS, D.; KOHLMANN, K. (2006). Genetic characterization of wild common carp (*Cyprinus carpio* L.) from Turkey. *Aquaculture*, 258(1-4), 257-262.
- NAITO, T., NAKAYAMA, K., TAKESHIMA, H., HASHIGUCHI, Y., AKITA, T., YAMASAKI, Y. Y., ... & TAKAHASHI, H. (2023). The detailed population genetic structure of the rare endangered latid fish akame *Lates japonicus* with extremely low genetic diversity revealed from single-nucleotide polymorphisms. *Conservation Genetics*, 24(4), 523-535.
- NOGUEIRA, F., RÊGO, P. S. D., QUEIROZ, H., VENERE, P., VARELA, E. S., SAMPAIO, I., ... & ARARIPE, J. (2020). Genetic diversity and structuring in the arapaima (*Osteoglossiformes*, *Osteoglossidae*) population reveal differences between the Amazon and the Tocantins-Araguaia basins. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 92, e20180496.
- OTA, R. R., DEPRÁ, G. D. C., GRAÇA, W. J. D., & PAVANELLI, C. S. (2018). Peixes da planície de inundação do alto rio Paraná e áreas adjacentes: revised, annotated and updated. *Neotropical Ichthyology*, 16, e170094.
- OWCZARZY, R., TATAUROV, A. V., WU, Y., MANTHEY, J. A., MCQUISTEN, K. A., ALMABRAZI, H. G., ... & PEEK, A. S. (2008). IDT SciTools: a suite for analysis and design of nucleic acid oligomers. *Nucleic acids research*, 36(suppl_2), W163-W169.
- PARADIS, E. (2010). pegas: an R package for population genetics with an integrated–modular approach. *Bioinformatics*, 26(3), 419-420.
- PARADIS, E., CLAUDE, J., & STRIMMER, K. (2004). APE: analyses of phylogenetics and evolution in R language. *Bioinformatics*, 20(2), 289-290.
- POLAZ, C. N. M., & RIBEIRO, K. T. (2017). Conservação de peixes continentais e manejo de unidades de conservação. *Biodiversidade Brasileira*, 7(1), 1-3.
- RABONE M, LAVERY SD, LITTLE A, CLEMENTS KD (2015) Discordance between nuclear and mitochondrial DNA analyses of population structure in closely related triplefin fishes (*Forsterygion*

lapillum and *F. capito*, F. Tripterygiidae) supports speciation with gene flow. *Marine Biology* 162: 1611-1624.

RAYMOND, M.; ROUSSET, F. (1995). An exact test for population differentiation. *Evolution*, p. 1280-1283.

REID, N. M., PROESTOU, D. A., CLARK, B. W., WARREN, W. C., COLBOURNE, J. K., SHAW, J. R., ... & Whitehead, A. (2016). The genomic landscape of rapid repeated evolutionary adaptation to toxic pollution in wild fish. *Science*, 354(6317), 1305-1308.

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

SELJESTAD, G. W., QUINTELA, M., BEKKEVOLD, D., PAMPOULIE, C., FARRELL, E. D., KVAMME, C., ... & BERG, F. (2024). Genetic Stock Identification Reveals Mismatches Between Management Areas and Population Genetic Structure in a Migratory Pelagic Fish. *Evolutionary Applications*, 17(10), e70030.

SELKOE, K. A., & TOONEN, R. J. (2006). Microsatellites for ecologists: a practical guide to using and evaluating microsatellite markers. *Ecology letters*, 9(5), 615-629.

SHIBATTA, A.O., ORSI, M.L., BENNEMANN S.T., SILVA-SOUZA A.T. **Diversidade e distribuição de peixes na bacia do rio Tibagi.** In: Moacyr EM, Bianchini E, Shibatta OA, Pimenta JA. (Org.) A bacia do rio Tibagi. Londrina: M.E. Medri, 2002. p. 403-423.

TAGGART, J. B., VERSPOOR, E., GALVIN, P. T., MORÁN, P., & FERGUSON, A. (1995). A minisatellite DNA marker for discriminating between European and North American Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 52(11), 2305-2311.

TAUTZ, D. (1989). Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. *Nucleic acids research*, 17(16), 6463-6471.

TIBIHIKA, P. D., CURTO, M., DORNSTAUDER-SCHRAMMEL, E., WINTER, S., ALEMAYEHU, E., WAIDBACHER, H., & MEIMBERG, H. (2019). Application of microsatellite genotyping by sequencing (SSR-GBS) to measure genetic diversity of the East African *Oreochromis niloticus*. *Conservation Genetics*, 20, 357-372.

TRINGALI, M. D., & BERT, T. M. (1998). Risk to genetic effective population size should be an important consideration in fish stock-enhancement programs. *Bulletin of Marine Science*, 62(2), 641-659.

VAN OOSTERHOUT, C., HUTCHINSON, W. F., WILLS, D. P., & SHIPLEY, P. (2004). MICRO-CHECKER: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular ecology notes*, 4(3), 535-538.

- VARI, R. P., & MALABARBA, L. R. (1998). Neotropical ichthyology: an overview. *Phylogeny and classification of Neotropical fishes*, 1, 1-12.
- WILEY, E. O., & JOHNSON, G. D. (2010). A teleost classification based on monophyletic groups. *Origin and phylogenetic interrelationships of teleosts*.
- ZANE, L., BARGELLONI, L., & PATARNELLO, T. (2002). Strategies for microsatellite isolation: a review. *Molecular ecology*, 11(1), 1-16.

PARECER DO SUPERVISOR

A candidata desempenhou o seu trabalho de maneira regular, tendo concluído este período de pós-doutorado com cumprimento satisfatório das atividades previstas no plano de trabalho.

Ao longo do estágio, apresentou resumos em congressos da área, ministrou uma disciplina na pós-graduação e participou ativamente das reuniões de laboratório, contribuindo para as discussões técnicas e para o andamento das atividades do grupo.

Prof. Dr. Ricardo Utsunomia
Supervisor de Pós-Doutorado
UNESP - Bauru