

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU - IBB  
Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas (Genética)

**Genômica populacional no estudo da diversidade genética do gênero *Rhamdia*, com foco no complexo *Rhamdia quelen* de populações de cultivo e selvagens.**

Discente: Carolina de Oliveira Magalhães

Orientador: Prof. Dr. Fábio Porto-Foresti

# Sumário

|  |    |
|--|----|
| <b>AGRADECIMENTOS</b> .....  | 4  |
| <b>Resumo</b> .....  | 7  |
| <b>Abstract</b> .....  | 9  |
| <b>1. Introdução</b> .....   | 11 |
| <b>1.1 Ictiofauna Neotropical Continental</b> .....                                    | 11 |
| <b>1.2 Siluriformes</b> .....  | 14 |
| <b>1.3. Gênero <i>Rhamdia</i> e o complexo de espécies <i>Rhamdia quelen</i></b> ..... | 17 |
| <b>1.4. Marcadores Nucleares do tipo SNPs</b> .....                                    | 23 |
| <b>2. Objetivos</b> .....  | 25 |
| <b>4. Materiais e Métodos</b> .....  | 25 |
| <b>3.1 Coleta das amostras</b> .....   | 25 |
| <b>3.2 Extração e padronização do DNA</b> .....  | 27 |
| <b>3.3 Single nucleotide polymorphism – SNPs</b> .....                                 | 28 |
| <b>3.3.1 Construção da biblioteca de DNA</b> .....                                     | 28 |
| <b>3.3.2 Dupla digestão e purificação</b> .....  | 28 |
| <b>3.3.3 Ligação dos adaptadores e purificação</b> .....                               | 29 |
| <b>3.3.4 Indexação</b> .....   | 29 |
| <b>3.3.5 <i>Size selection</i> e sequenciamento</b> .....                              | 29 |
| <b>3.4 Bioinformática</b> .....  | 30 |
| <b>3.4.1 Controle de Qualidade</b> .....   | 30 |
| <b>3.4.2 Stacks</b> .....  | 30 |
| <b>3.4.3 Plink</b> .....   | 31 |
| <b>3.5 Análises de diversidade e estruturação genética</b> .....                       | 32 |
| <b>5. Resultados e Discussão</b> .....   | 33 |
| <b>Resumo</b> .....  | 35 |
| <b>INTRODUÇÃO</b> .....  | 36 |
| <b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....   | 38 |
| <b>Coleta de amostras e extração do DNA</b> .....                                      | 38 |
| <b>Construção e sequenciamento da biblioteca de SNPs</b> .....                         | 41 |
| <b>Processamento dos dados e genotipagem dos SNPs</b> .....                            | 41 |
| <b>Diversidade genética e estruturação populacional</b> .....                          | 42 |
| <b>RESULTADOS</b> .....  | 43 |
| <b>Processamento de dados do genoma e genotipagem</b> .....                            | 43 |

|   |           |
|---|-----------|
| <b>Diversidade e estrutura genética .....</b>                 | <b>44</b> |
| <b>DISCUSSÃO .....</b>  | <b>53</b> |
| <b>Grupos - <i>Rhamdias</i> selvagens.....</b>                | <b>54</b> |
| <b>Grupo - <i>Rhamdias</i> de cultivo .....</b>               | <b>56</b> |
| <b>O complexo <i>Rhamdia quelen</i> e a diversidade .....</b> | <b>58</b> |
| <b>CONCLUSÕES.....</b>  | <b>60</b> |
| <b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>                       | <b>61</b> |

## AGRADECIMENTOS

Eu gostaria de começar agradecendo à minha mãe e meu irmão, que sempre apoiaram e incentivaram toda a minha vida acadêmica. Sempre que eu achei que não fosse dar certo eles estavam lá por mim, dizendo para eu tentar mais um pouco, para ser forte e, se caso as coisas não saíssem como planejado, eu teria um lugar para voltar e me reconfortar. Seremos sempre nós!

Também agradeço ao meu avô, meus tios e primos por me incentivarem, em especial minha tia Anete que é inspiração acadêmica e pessoal para mim! Obrigada por sempre estarem torcendo por mim!

Agradeço ao prof. Fábio que acreditou no meu potencial, me mostrando sempre as melhores decisões e a todos os meus queridos do LAGENPE. Vocês foram minha segunda família em Bauru durante quase 5 anos e não tenho como mensurar o aprendizado que tive com vocês. Aos antigos e aos novos membros, muito obrigada! Sem vocês eu não teria me tornado quem sou e minha vida seria muito mais chata e sem histórias maravilhosas pra contar.

Agradeço aos ensinamentos e à paciência do Diego, que sempre tirou todas as minhas milhões de dúvidas com as bibliotecas de SNPs. À Josiane, Vanessa e Néstor por me ajudarem a entender melhor as *Rhamdias* e a escolher a melhor metodologia. Às meninas de Botucatu por cederem seu tempo para me ensinarem e também por compartilharem momentos muito divertidos juntas.

Gostaria de agradecer aos meus companheiros do Laboratório Mixto de Biotecnologia Acuática, de Rosario (Argentina). À Sofí, Jacki, Vicky, Flor, Kerly, Rosu, Marti, Feli, Nacho, Ema, Ana e todos... gracias, chicos!! Rosario fue mucho mejor com vos!

Meu agradecimento especial à professora Vanina, que me acolheu no laboratório e acreditou no meu potencial. Você é uma inspiração de pesquisadora e mulher para mim. Gracias, Vani!!

À minha amiga Yas que se tornou mais que uma companheira de laboratório. Você é um dos pontos de luz na minha vida amikaa, muito obrigada por segurar a minha mão e me apoiar sempre, você sempre será minha mochilinha!! À Babi que, em pouco tempo, se tornou minha irmãzinha de cafés e filosofias. Muito obrigada amiga, seu apoio e conforto foram essenciais na reta final dessa caminhada. Que bom ter vocês na minha vida!!

Às minhas eternas amigas da BIO XLVI: Xu, Kats e Sova, obrigada por tanto meninas! Estamos sempre juntas, mesmo com mais de 8000km de distância kkkkkkkk!!

Ao Vi, que sempre esteve comigo durante grande parte do meu doutorado. Obrigada nin, por ser meu apoio tantas e tantas vezes, sem você seria muito mais difícil!

Agradeço ao CNPq e a CAPES por financiarem essa pesquisa.

É difícil nomear cada um que me ajudou nesse caminho, mas eu serei sempre grata por ter amadurecido e aprendido com tanta troca que tive durante esses anos de doutorado!!

“No meio do caminho tinha uma pedra”,  
Mas a ousada esperança  
de quem marcha cordilheiras  
triturando todas as pedras  
da primeira à derradeira  
de quem banha a vida toda  
no unguento da coragem  
e da luta cotidiana  
faz do sumo beberagem (...).”

Coiceição Evaristo

## Resumo

O gênero *Rhamdia* é composto por bagres neotropicais de ampla distribuição. No sul do Brasil e norte da Argentina eles são encontrados em rios e também produzidos em sistemas semi-intensivos para comercialização, devido à boa qualidade da carne. Estudos descritos na literatura constataram que a taxonomia desse gênero é controversa, sendo as espécies, alvo de constantes realocações. Há hibridação e introgressão, o que caracteriza um complexo de espécies e isso dificulta os estudos de delimitação e filogeografia do gênero. Considerando a importância comercial e ecológica dessas espécies na América do Sul e a escassez de informação genética, o presente estudo visa caracterizar a estrutura genética populacional e identificar padrões de diversidade genética de três espécies do gênero *Rhamdia* (complexo *Rhamdia quelen*, *Rhamdia voulezi* e *Rhamdia branneri*) em grupos amostrais provenientes de rios e importantes fazendas de peixes do estado de Santa Catarina, Paraná, Rio Grande do Sul, São Paulo e norte da Argentina, utilizando marcadores moleculares do tipo SNPs. Após dupla digestão (*ddRADseq*), sequenciamento Illumina e filtragens, foram obtidos 1734 loci, distribuídos em 141 indivíduos. Detectou-se baixa diversidade genética nos grupos; para todos os grupos, sendo os indivíduos de cultivo os que possuem menores índices. Os valores de heterozigosidade observada ( $H_o$ ) e heterozigosidade esperada ( $H_e$ ) foram semelhantes, sendo  $H_e$  maior que  $H_o$ , exceto em um cultivo. Os valores de  $F_{is}$  foram positivos e significativos em duas pisciculturas, indicando possível endogamia dentro desses grupos. A análise AMOVA indicou que a maior diferenciação genética está entre os indivíduos e não entre os grupos, o que também foi corroborado pela análise de componentes principais. O DAPC mostrou-se coerente com a divisão em 5 grupos, com dois deles mais distantes e o restante formando um aglomerado, inclusive sem a diferenciação dos clusters das espécies. Assim conclui-se que o complexo *Rhamdia quelen* e as outras espécies aqui estudadas possuem uma certa distância genética, porém são muito relacionados entre

si. A baixa diversidade genética e os indícios de endogamia mostram que, tanto os grupos de cultivo quanto os selvagens, estão sujeitos às ações antrópicas que podem modificar a composição genética da população. Corientes, São Paulo e comercial Toledo se diferenciaram dos outros grupos, apesar de possuírem índices de diversidade e endogamia muito parecidos. Essa diferenciação confirma sua distância genética, porém a baixa diversidade e os indícios de endogamia evidenciam a alta taxa de cruzamento entre os indivíduos daquele lugar. Para a piscicultura isso não é necessariamente ruim, porém quando temos a introdução desses indivíduos na natureza é possível que haja contaminação genética dos estoques locais. Dessa maneira, reforçamos a importância de mais estudos de delimitação de espécies e diversidade do complexo *Rhamdia quelen* e espécies relacionadas, uma vez que são ecologicamente importantes da América do Sul.

## Abstract

The genus *Rhamdia* is composed of neotropical catfish with a wide distribution. In southern Brazil and northern Argentina, they are found in rivers and also produced in semi-intensive systems for commercialization, due to the good quality of the meat. Studies described in the literature found that the taxonomy of this genus is controversial, with the species being the target of constant reallocations. There is hybridization and introgression, which characterizes a complex of species and this makes it difficult to study the delimitation and phylogeography of the genus. Considering the commercial and ecological importance of these species in South America and the scarcity of genetic information, the present study aims to characterize the population genetic structure and identify patterns of genetic diversity of three species of the genus *Rhamdia* (complex *Rhamdia quelen*, *Rhamdia voulezi* and *Rhamdia branneri*) in sample groups from rivers and important fish farms in the states of Santa Catarina, Paraná, Rio Grande do Sul, São Paulo and northern Argentina, using SNPs-type molecular markers. After double digestion (*ddRADseq*), Illumina sequencing and filtering, 1734 loci were obtained, distributed in 141 individuals. Low genetic diversity was detected in the groups; for all groups, with cultivated individuals having the lowest indices. The values of observed heterozygosity ( $H_o$ ) and expected heterozygosity ( $H_e$ ) were similar, with  $H_e$  greater than  $H_o$ , except in one culture.  $F_{is}$  values were positive and significant in two fish farms, indicating possible inbreeding within these groups. The AMOVA analysis indicated that the greatest genetic differentiation is between individuals and not between groups, which was also corroborated by the principal component analysis. The DAPC was consistent with the division into 5 groups, with two of them more distant and the rest forming a cluster, even without differentiating the clusters of the species. Thus, it is concluded that the *Rhamdia quelen* complex and the other species studied here have a certain genetic distance, but are closely related to each other. The low genetic diversity and the evidence of

endogamy show that both the cultivated groups and the wild ones are subject to anthropic actions that can modify the genetic composition of the population. Corientes, São Paulo and comercial Toledo differed from the other groups, despite having very similar diversity and endogamy indexes. This differentiation confirms their genetic distance, but the low diversity and the evidence of inbreeding show the high rate of crossing between individuals in that place. For fish farming this is not necessarily bad, but when we introduce these individuals into nature it is possible that there is genetic contamination of local stocks. In this way, we reinforce the importance of further studies of species delimitation and diversity of the *Rhamdia quelen* complex and related species, since they are ecologically important in South America

# 1. Introdução

## 1.1 Ictiofauna Neotropical Continental

A região Neotropical compreende a América Central (incluindo a parte sul do México e a península da Baja California), sul da Flórida, Caribe e a América do Sul e possui espécies que se destacam pela ampla variedade de formas, cores e tamanhos, assim como pelos diversificados padrões ecológicos, biológicos, comportamentais e biogeográficos (Carvalho-Costa et al., 2011).

Este ambiente é um dos mais diversos do mundo, abrigando aproximadamente 4225 espécies de peixes continentais (Tonella et al., 2022). A alta biodiversidade desse ambiente se deve principalmente pela história hidrogeológica, devido às variações pluviométricas locais, evolução paleontológica, mudanças climáticas (Ríos et al., 2019; 2020; Abreu et al., 2020) e pode refletir tanto em altas taxas de produtividade e diversidade fisiológica como também no isolamento geográfico das espécies (Cooke et al., 2012; Morrone, 2014). A região neotropical tem alguns dos maiores números de famílias de pertencentes às ordens de Characiformes (aprox. 1289 espécies), Siluriformes (aprox. 1384 espécies), Cichliformes (aprox. 354 espécies), Cyprinodontiformes (aprox. 245 espécies) e Gymnotiformes (aprox. 135 espécies) (Tonella et al., 2022).

As principais bacias hidrográficas dessa região estão localizadas na América do Sul, incluindo a Bacia Amazônica, que abrange as regiões hidrográficas colombiana e brasileira, a bacia do alto rio Paraná, a bacia do Paraguai-Paraná, a bacia do rio São Francisco e a bacia do rio Uruguai (Carolsfel, 2003).

A bacia hidrográfica da Amazônia ocupa aproximadamente 39% da massa terrestre da América do Sul. Cerca de 70% da bacia está concentrada no Brasil, mas cobre quase todo o continente, desde a Cordilheira dos Andes, a oeste, até o Oceano Atlântico, a leste (Diaz-Sarmiento,

2003) e é um *hotspot* de biodiversidade, contendo 2406 espécies de peixes nativas (Jézéquel et al., 2020).

A Bacia do Alto Rio Paraná é formada pela junção dos rios Grande e Parnaíba na região centro-sul do Brasil. Compreende 10.5% da área total do Brasil e flui pela região que possui a maior densidade populacional do país, sujeita à construção de barragens, poluição agrícola, industrial e urbana. Existem grandes migradores, como *Piaractus mesopotamicus* e *Pseudoplatystoma corruscans*, e uma grande variedade de espécies migratórias de curta distância e espécies sedentárias, como *Astyanax lacustris* e *Serrasalmus* spp. (Agostinho, 2003).

O rio São Francisco cobre 7,4% do Brasil e representa um grande número de reservatórios, representando a segunda maior fonte de energia hidrelétrica do país (Dantas, 2013). É rico em planícies de inundação e lagoas marginais que são usadas por espécies de peixes como habitat para alimentação, reprodução e refúgio. Estes incluem alguns Characiformes (*Brycon lundii*, *S. brasiliensis*, *Megaleporinus elongatus*, *Prochilodus affinis* e *Prochilodus marggravii*) e Siluriformes (*Conorhynchos conirostris* e *P. corruscans*) (Sato, 2003).

A Bacia Paraná-Paraguai cobre a maior parte da região sudeste do Brasil e outros países como Paraguai, leste da Bolívia e norte da Argentina. Juntamente com o rio Uruguai, cobre a maior parte da América do Sul central. A bacia hidrográfica ocupa 2.8 milhões de km<sup>2</sup> e é considerada a segunda maior bacia brasileira. Um dos maiores e mais importantes pântanos do mundo é o Pantanal, localizado na bacia do Alto Paraguai. O ciclo hidrológico complexo do Pantanal cria pressões seletivas sobre as características adaptativas e diversificadas das espécies de peixes. A maioria dos peixes no rio Paraguai-Paraná é economicamente importante e migratória, como *Salminus brasiliensis*, *P. mesopotamicus*, *Brycon orbignyanus* e peixe-gato grande como *P. corruscans*, *Pseudoplatystoma fasciatum* e *Paulicea luetkeni* (Resende, 2003).

O sistema da bacia do rio Uruguai está localizado nas latitudes temperadas próximas ao litoral sul do Brasil, com altitudes que chegam a 1800m. Percorre a fronteira entre os estados de Santa Catarina e Rio Grande do Sul do Brasil até o rio Paraná, onde forma o estuário do rio da Prata, na Argentina. Como resultado de seu perfil inclinado e abundância de corredeiras, o rio Uruguai é difícil de navegar em comparação com outros rios. Com água mais rápida, há um número considerável de barragens hidrelétricas na bacia que podem afetar a reprodução de espécies migratórias e seus ovos e larvas à deriva (Zaniboni Filho, 2003).

A falta de dados oficiais pode aumentar a subnotificação de casos de ameaça antropogênica ao meio ambiente, mesmo com efeitos visíveis nos ecossistemas de água continental. Esses efeitos estão relacionados à sobrepesca, construção de barragens para geração de energia hidrelétrica, contaminação dos rios pela mineração, poluição industrial, agrícola e desmatamento (Barletta et al., 2010; Mastrochirico-Filho, 2016). No Brasil, segundo o último levantamento do Ministério do Meio Ambiente, portaria no. 148 (2022), o grupo dos peixes continentais é o que possui o maior número de espécies classificadas como ameaçadas: 291 espécies.

Devido a esses fatores, é necessário e urgente aumentar a quantidade de informações taxonômicas e sistemáticas existentes sobre peixes na América do Sul além de estudos de natureza biológica, ecológica e sistêmica. Sem essas informações para cada bioma e bacia desse continente, não há a possibilidade de gerenciamento integrado (rio-estuário-região costeira) e as ações mitigadoras, quando implementadas, poderão ser frequentemente realizadas sem dados ou análises científicas sólidas (Barletta et.al, 2010).

A aquicultura é uma atividade que indiretamente minimiza as pressões de pesca e exploração sobre os estoques selvagens ameaçados e, portanto, precisa ser realizada de maneira sustentável, com o menor impacto possível sobre as populações naturais (Arbeláez-Rojas, 2002). Projeções da

FAO mostram que até 2030 as exportações de peixe na América Latina aumentarão em 29%, de 3,9 milhões de toneladas em 2016 para 5,1 milhões de toneladas. No que diz respeito à aquicultura continental, o Brasil não reporta dados oficiais às instituições internacionais desde 2014, mas é considerado um país emergente exportador que ganha importância, em parte graças a melhores sistemas de distribuição e o aumento da produção (FAO, 2020).

Apesar das espécies exóticas influenciarem o desenvolvimento da aquicultura na América do Sul, devido ao seu fácil cultivo, presença de tecnologias e técnicas de manejo bem estabelecidas, a produção de espécies nativas vem se tornando cada vez mais importante no cenário da aquicultura brasileira (Siqueira, 2016). O aproveitamento das potencialidades desses peixes brasileiros gira em torno da grande diversidade de espécies e da facilidade de adaptação desses animais aos meios de cultivo.

Somente na década de 90 começaram a ser implantados os primeiros empreendimentos de grande porte dedicados à engorda de peixes nativos, porém hoje há maior difusão de tecnologia, cultivos experimentais e comerciais e um esforço maior por parte de produtores individuais e de instituições de pesquisa para o fortalecimento do cultivo desses peixes (Kubitza, 2015). Em 2019 a produção nacional de peixes nativos foi de 287.930t, representando aproximadamente 40% do total de peixes cultivados no país, com a produção sendo liderada principalmente pelos estados do Norte (151.418t) (Peixe BR, 2020).

## 1.2 Siluriformes

Os Siluriformes compõem uma ordem altamente diversificada de espécies de peixes com distribuição mundial. Eles habitam principalmente águas continentais, mas também regiões costeiras e ilhas próximas (Gisbert et al., 2022). Os peixes-gato, bagres ou cascudos, como são conhecidos, são

principalmente distribuídos na América do Sul, África e Ásia (Armbruster et al., 2011). A maioria dos bagres tem corpo subcilíndrico com ventre e cabeça dorsoventral achatados, além de espinhos pontiagudos nas nadadeiras dorsal e peitoral. Possui uma pele sem escamas coberta por muco protetor, exceto nas famílias Callichthyidae e Loricariidae, cuja pele é coberta por placas dérmicas ósseas (Teugels et al., 1996). Os bagres neotropicais constituem um grupo polifilético que inclui mais da metade dos Siluriformes (de Pinna, 1998; Sullivan et al., 2006; Ríos et al., 2017).

As estatísticas nacionais de produção aquícola do Brasil (FAO 2020) mostraram que o país é um dos principais produtores de bagre das américas (13.950 t). A produção brasileira de bagres (7.61% de toda produção nacional) depende muito espécies como *Pseudoplatystoma* spp. (Pimelodidae) e seus híbridos interespecíficos e intergenéricos (aprox. 11.000 t), porém é notável o crescente interesse por outras espécies nativas, como o complexo *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimard, 1824) (Heptapteridae) (aprox. 6t) (FAO 2020).

O complexo *R. quelen* (localmente denominado “jundiá” em português ou “bagre negro”, em espanhol) (Figura 1) compõe um conjunto de espécies de siluriformes, exclusivo da região cis-andina Neotropical (Ribolli et al., 2021). Os jundiás possuem grande aceitação no mercado consumidor, especialmente por sua carne agradável ao paladar e ausência de espinhos intramusculares (Marchioro e Baldisserotto, 1999; Baldisserotto et al., 2010). Por isso tem grande relevância comercial como recurso para a pesca artesanal e na aquicultura em toda a América do Sul, especialmente na Argentina, sul do Brasil e Uruguai (Vaz et al., 2010).



Figura 1: Indivíduos de *R. quelen*. Foto: Panorama da Aquicultura, No. 69.

Com a expansão do mercado consumidor para peixes nativos e devido à importância da espécie no contexto atual, há uma crescente demanda por estudos com nutrição (Tronco et al., 2018; Piedras et al., 2018; Dalcin et al., 2018; Parra et al., 2018), reprodução (Ferreira et al., 2018), comportamento (Bitencourt et al., 2018) e fisiologia (Menezes et al., 2015), além de muitos estudos com alevinos (Rocha et al., 2018).

Dentre as áreas de distribuição do complexo *R. quelen*, a bacia do rio Paraná e bacia Paraná/Paraguai é de particular interesse para a conservação, uma vez que há grandes fazendas de produção de peixes com programas de repovoamento sem suporte ou monitoramento genético adequado (Agostinho et al., 2005), pesca predatória, poluição e construção de barragens que alteram a dinâmica biológica dos rios (Carolsfeld et al., 2003; Do Prado et al., 2018).

Assim como a bacia do rio Paraná, a bacia do rio Iguaçu também tem grande importância ecológica e econômica, principalmente para o estado do Paraná, pela ocorrência de 70% das espécies endêmicas de peixes no estado e pela exploração de reservatórios de hidrelétricas (Yamamoto et al., 2018). Essa intensa degradação ambiental tem ameaçado a diversidade da ictiofauna local (Nardelli et al., 2016), incluindo espécies nativas do gênero *Rhamdia* como *R. voulezi* e *R. branneri*.

Existem muitos fatores que dificultam o estudo da biodiversidade ictiológica da região neotropical, como questões taxonômicas problemáticas (Lévêque, 2008) relacionadas, muitas vezes, com espécies crípticas (Bickford, 2007). Além disso, poucas instituições [ Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO) e Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) ] fornecem estatísticas de dados de pesca que afetam, em última análise, o manejo dessas espécies.

### 1.3. Gênero *Rhamdia* e o complexo de espécies *Rhamdia quelen*

As espécies do gênero *Rhamdia* não são migradoras e seu hábitat compreende lagos e poços fundos dos rios, preferencialmente ambientes de águas calmas com fundo de areia e lama, junto às margens e vegetação. Os adultos são considerados omnívoros e ficam abrigados entre pedras e troncos apodrecidos, de onde saem à noite à procura de alimento (Guedes, 1980; Baldisserotto, 2004). Devido à tolerância a baixas temperaturas as espécies podem estar presentes em diversos sistemas de cultivo (Schenone et al., 2011; Valladão, 2018).

O gênero *Rhamdia* é emblemático e possui uma complexidade relacionada ao cenário taxonômico intrínseco que abrange as diversas espécies (Albert et al., 2020; Ríos et al., 2020; Ribolli et al., 2021). Na primeira revisão sistemática proposta por Silfvergrip (1996), mais de 100 espécies foram sinônimas, 46 das quais com *R. quelen* (Reis et al., 2003; Ríos et al., 2020). As análises do mtDNA identificaram *Rhamdia laticauda* e *Rhamdia guatemalensis* como espécies encontradas na América Central, sugerindo que *R. quelen* é um grupo irmão amplamente difundido na América do Sul (Perdices et al., 2002). Dois outros sinônimos de *R. quelen* (*Rhamdia branneri* e *Rhamdia voulezi*, figura 2) recuperados como espécies válidas através de estudos morfológicos e moleculares (Garavello e Shibatta, 2016; Ribolli et al., 2017). A partir disso, novas espécies foram descritas (DoNascimento et al., 2004; Bichuette e Trajano, 2005; Angrizani e Malabarba, 2018). Recentemente

além de Koerber e Reis (2020) sugerirem uma nova localidade-tipo em um afluente da Baía de Guanabara, estado do Rio de Janeiro, para substituir um espécime-tipo ausente de *R. quelen*.



Figura 2: A: *Rhamdia branneri* / B: *Rhamdia voulezi*, Rio Iguazu.

Vários autores tentaram elucidar algumas das questões taxonômicas na região neotropical. Ríos et al. (2017) propuseram a sistemática de *Rhamdia*, delimitando espécies e propondo padrões de diferenciação genética em diferentes níveis geográficos da região cis-andina (bacias cis-andinas em escala macrogeográfica, bacias neotropicais, em escala mesogeográfica - bacia do Prata, bacia de Patos-Merín e lagoas costeiras que drenam o oceano Atlântico – e três lagoas costeiras mais importantes para a pesca artesanal no Uruguai, representando a escala microgeográfica). As análises filogenéticas foram feitas a partir de sequências do citocromo b (cyt-b) e marcadores microssatélites. Dezesesseis grupos foram encontradas em *Rhamdia* e divididas em dois clados (cis e trans andinos), cada um composto por oito linhagens. As espécies de *Rhamdia* cis-andinas provavelmente divergiram devido a eventos de vicariação que ocorreram entre e dentro das bacias desde o final do período mioceno-pleistoceno.

Em outro estudo complementar de Ríos e colaboradores (2019), os pesquisadores permaneceram investigando o padrão de diversidade genética e isolamento reprodutivo entre linhagens mitocondriais de *R. quelen*, mas dessa vez, focando apenas na bacia do Prata, bacia de Patos-Merín e lagoas costeiras que drenam o oceano Atlântico, mesmo em ambientes em que há simpatria. Para isso, os pesquisadores utilizaram novamente o gene *cyt-b* e descreveram um conjunto específico de 10 *locus* microssatélites, a fim de analisar o padrão de diversidade genética e investigar o isolamento reprodutivo entre linhagens mitocondriais, como um passo para definir unidades moleculares (MOTUs). O estudo também comparou, secundariamente, populações ribeirinhas e de lagoas. Considerando que a região estudada é habitada por várias linhagens mitocondriais altamente divergentes, os pesquisadores encontraram evidências de hibridação e introgressão em pelo menos duas dessas linhagens mitocondriais, a estrutura populacional recente do complexo de espécies segue o padrão de distribuição geográfica, sendo delimitadas sete unidades de manejo, três habitando o rio e quatro associadas às diferentes lagoas costeiras. As populações das lagoas, diferentemente das ribeirinhas, teriam divergido em um cenário de fluxo gênico nulo ou restrito, possivelmente relacionada a eventos de gargalo. Os autores chamam atenção para o possível impacto da aquicultura nas populações selvagens, que devido a fugas e/ou potenciais programas de repovoamento, podem influenciar na capacidade de adaptação genética de espécies locais, além de deixarem claro que o entendimento da estrutura genética populacional deve ser considerado para a legislação de conservação, gestão de pesca e regulamentação da aquicultura.

Devido a esses e outros estudos anteriores que sugeriram haver diferenças demográficas entre lagoas costeiras e ambientes ribeirinhos, bem como populações divergentes que poderiam ser isoladas reprodutivamente Ríos e colaboradores (2020) ainda investigaram o padrão de diversidade genética de *R. quelen* na mesma localidade andina, mas com uma abordagem genômica populacional, utilizando 2b-RAD. Dois grandes agrupamentos genômicos distribuídos

latitudinalmente nas bacias norte e sul foram identificados, juntamente com assinaturas consistentes de seleção divergente entre eles. A estrutura da população baseada em todo o conjunto de loci e nos *locus* presumíveis neutro versus adaptativos mostrou profunda divergência genômica entre os dois principais grupos. Os SNPs mais consistentes sob seleção divergente revelaram alguns genes candidatos interessantes para estudos funcionais adicionais. Além disso, foram encontrados sinais de adaptação a um ambiente de lagoa, mediado pela seleção purificadora, explicada por gradientes de temperatura, que podem afetar a variação adaptativa em regiões genômicas específicas, além do possível comportamento de *homing*, que apesar de nunca descrito para *Rhamdia*, deve ser considerado.

Sacaranto et al. (2018) realizaram outro estudo a fim de identificar as unidades taxonômicas operacionais moleculares (MOTUs) do jundiá, através de peixes cultivados e comercializados por piscicultura em possíveis fugas no ambiente natural no sul do Brasil. Os pesquisadores analisaram 48 indivíduos de seis pisciculturas e 48 de três rios do estado de SC (Uruguai, Benedito Novo e Itapocu), usando a subunidade I do citocromo oxidase mitocondrial (COI). Quatro MOTUs foram identificados demonstrando que a presença de peixes cultivados nos rios Uruguai e Benedito Novo fornece evidências de contaminação genética em populações nativas. Esses resultados mostram a necessidade de regular as atividades de aquicultura e caracterizar as espécies e linhagens comerciais de bagre prateado cultivadas no sul do Brasil.

Uso e colaboradores (2019) também estudaram essas inconsistências taxonômicas de *Rhamdia sp.* e para isso analisaram a localização física de sequências repetitivas de DNA nos cromossomos, além da utilização da técnica de *barcode* para identificação molecular dos indivíduos. Foram analisadas populações de *R. quelen* de duas bacias hidrográficas do Brasil, Paraguai e Paraná, utilizando a técnica de *barcode* de DNA e diferentes marcadores cromossômicos, incluindo o U2 snDNA, que nunca tinha sido analisado para nenhuma espécie de *Rhamdia*. A análise da sequência

genética do gene mitocondrial COI revelou uma diferenciação significativa entre as populações dos rios Miranda e Quexada, com distâncias genéticas compatíveis com as encontradas entre as diferentes espécies em peixes neotropicais. Os resultados revelaram através dos marcadores nucleares uma evolução cromossômica conservadora na espécie e uma distribuição diferencial de alguns marcadores, como 5S rDNA e o U2 snDNA nos diferentes grupos amostrais. Os autores afirmam ainda que a falta de hipóteses filogenéticas para relações entre as espécies de *Rhamdia* limita a capacidade de avaliar modelos alternativos para a diversificação.

No Brasil a técnica do DNA *barcode* é amplamente utilizada para identificar MOTUs em peixes de água doce. Ribolli e colaboradores (2017) validaram o uso de DNA *barcode* e as análises baseadas em COI do GMYC (General Yule Coalescente) em 19 amostras da bacia do rio Iguaçu. Nas duas metodologias, três MOTUs foram identificadas com base no limiar ótimo estimado (OT = 0,77). A distância média inter-MOTU (NJ, K2P) entre *R. branneri* e *R. voulezi* foi de 1,4% e distância intra-MOTU de 0% em ambas as espécies. As duas espécies identificadas como *R. branneri* e *R. voulezi* apresentaram correspondência com identificações taxonômicas e morfológicas. Com relação a *R. quelen*, a distância intra-MOTU média foi superior a OT (2,7%), indicando que esta espécie pode ser formada por diferentes MOTUs. Os autores sugerem que estudos moleculares e taxonômicos sejam empregados simultaneamente em *R. quelen*, para evitar a contaminação de espécies silvestres por hibridizações.

Ribolli e colaboradores (2021) usaram sequências de espécies cis-andinas e mesoamericanas de *Rhamdia* para reconstruir e estimar tempos de divergência entre linhagens, correlacionando os resultados com eventos geológicos conhecidos. Métodos de delimitação de espécies baseados em abordagens de distância (DNA *barcode* e BIN) e coalescência (GMYC) identificaram nove linhagens bem suportadas da região cis-andina, a partir de sequências disponíveis no conjunto de dados BOLD. Os autores sugerem que processo de diversificação das linhagens cis-andinas *Rhamdia* tenha

começado no Eoceno e representou a cisão entre os clados cis-andinos e mesoamericanos. O clado cis-andino apresentou dois grupos principais: clado Noroeste (MOTUs das bacias do Amazonas, Essequibo, Paraguai e Itapecuru) e clado sudeste (bacias do escudo brasileiro oriental (Paraná, Uruguai Iguaçu e São Francisco) mais as bacias costeiras orientais). Os autores então concluíram que a diversificação das linhagens cis-andinas de *Rhamdia* resulta de eventos de vicariância e geodispersão, que desempenharam um papel fundamental no atual intrincado padrão de distribuição das linhagens de *Rhamdia*. Devido à ausência de avaliações taxonômicas, Ribolli et al. (2021) sugerem considerar *R. quelen* da região cis-andina como um complexo de espécies *R. quelen*.

Apesar de tantos estudos tentarem explicar a história filogenética desse gênero na América do Sul, poucos utilizam abordagem molecular sem distorcer a visão de relações ecológicas ao nível de espécie (Bermingham e Martin, 1998; Bermingham et al., 1997; Breden et al., 1999; Martin e Bermingham, 1998; Reeves e Bermingham, 2006; Sivasundar et al., 2001; Perdices et al., 2002).

No Brasil ainda que haja estudos relacionados à obtenção de marcadores moleculares polimórficos, não há estudos genéticos populacionais com abordagem genômica suficientes, que incluam uma região ampla de distribuição da espécie. Isso se soma à escassez de estudos acerca da identificação e delimitação do gênero *Rhamdia*, principalmente entre as espécies que sofrem hibridação. Portanto, é necessária uma abordagem genômica e populacional acerca dessa espécie nativa, afim de tentar elucidar algumas dúvidas relacionadas a esse gênero. Aplicando ainda esses estudos na produção podemos melhorar os sistemas de cultivo e manejo, além de evitar a contaminação genética dos estoques selvagens.

#### 1.4. Marcadores Nucleares do tipo SNPs

Os SNPs são polimorfismos estáveis e usualmente bi-alélicos (Mullikin et al., 2000), encontrados em regiões codificantes e não codificadoras (Bruneaux et al., 2013; Stölting et al., 2013), homoganeamente distribuídos ao longo do genoma em alta densidades (Ching et al. 2002; Du et al., 2012). São considerados os marcadores moleculares mais aptos à genotipagem de automação e capazes de revelar polimorfismos ocultos não detectados em outros marcadores moleculares (Liu e Cordes, 2004).

A alta adaptação de SNPs em análises do genoma em grande escala, comparados aos marcadores microssatélites, que possuem nível de automação limitado e processos de genotipagem trabalhosos, faz com que a escolha de marcadores SNPs seja uma opção viável e inovadora em estudos genômicos direcionados para a aquicultura (Liu, 2011).

Nos peixes, os SNPs são encontrados aproximadamente a cada 100 pb (Vera et al., 2013), o que os torna ideais para genômica comparativa (Bouza et al., 2012, Cheng et al., 2021; Ciezarek et al., 2022), genômica evolutiva (Du et al., 2012; Layton et al., 2021), mapeamento fino de genes associados a características produtivas (Sánchez et al., 2009; Rajesh et al., 2018; Mastrochirico et al., 2020), triagem genômica em populações para conservação e manejo (Albaina et al., 2013; Glaubitz et al., 2003; Kuhner et al., 2000; Vilas et al., 2015) e hibridização e impacto de invasões biológicas (Bers et al., 2010).

O sequenciamento massivo de DNA (o chamado sequenciamento de próxima geração) é uma ferramenta que está ajudando a resolver as inter-relações de táxons problemáticos (Smith et al., 2014; Ochoa, et al. 2020) e elucidar questões populacionais de espécies. Dentre os métodos de genotipagem dos SNPs está o *Rad-Seq*, que promove a redução do genoma com pelo menos uma enzima de restrição e o sequenciamento de uma das extremidades dos fragmentos gerados,

utilizando o sistema de sequenciamento Illumina (Miller, 2008). Os fragmentos de um indivíduo são ligados a um adaptador modificado contendo uma sequência de identificação exclusiva (“*barcodes*”) (Identificador Molecular, ou MID). Desta forma os fragmentos de vários indivíduos podem ser analisados em conjunto e sequenciados em uma única vez. Portanto, *RAD-seq* fornece uma plataforma flexível e barata para a descoberta simultânea de dezenas de milhares de marcadores genéticos em diversos organismos (Etter et al., 2012).

Dentro da estratégia RADseq existem variações da técnica original, como ocorre com a abordagem de dupla restrição enzimática *Double digest RADseq* – ddRADseq (Peterson et al., 2012). Esta abordagem, em relação a técnica original, não necessita de fragmentação mecânica porque utiliza duas enzimas de restrição, possui uma alta capacidade de multiplexação, apresenta um custo reduzido (como há uma combinação de muitos indivíduos no pool [index + barcode], o valor por amostra diminui consideravelmente) e requer pouco DNA genômico para a construção da biblioteca (Peterson et al., 2012). Estudos com espécies de peixes já foram realizados utilizando a metodologia do ddRADseq e estes incluem as espécies *Amphilophus spp* (Recknagel et al., 2013), *Oreochromis niloticus* (Palaikostas et al., 2015), *Perca fluviatilis* (Pukk et al., 2016), *Rhodeus ocellatus e Rhodeus ocellatus kurumeus* (Takahashi et al., 2020); *Paralichthys dentatus* (Hoey et al., 2022) entre tantos outros.

A análise da tecnologia RADseq/ddRADseq permite estudar milhares de marcadores SNPs, porém há poucas referências encontradas com relação à descrição de SNPs para espécies de peixes nativos de cultivo, como o jundiá; os trabalhos se resumem para espécies como o tambaqui, *Colossoma macropomum* (da Silva Nunes et al., 2017) e pacu, *Piaractus mesopotamicus* (Mastrochirico-Filho et al., 2016).

## 2. Objetivos

Nesse estudo utilizamos marcadores SNPs, obtidos através da dupla digestão enzimática, para comparar a variabilidade genética de indivíduos de *Rhamdia* em pisciculturas e rios do sul do Brasil e norte da Argentina. O objetivo foi caracterizar os padrões de estrutura e diversidade genética entre os grupos e encontrar relação entre os grupos e as possíveis espécies. Para realizar esse objetivo listamos os seguintes objetivos específicos:

1. Desenvolver e identificar marcadores SNPs presentes nos indivíduos selvagens e de cultivo, através de NGS e dupla digestão enzimática;
2. Analisar a diversidade e a relação entre os grupos, para testar a hipótese de proximidade entre eles;
3. Verificar a presença de possível estruturação genética entre os grupos.

## 4. Materiais e Métodos

### 3.1 Coleta das amostras

As amostras foram coletadas em locais de cultivo que são reconhecidos como importantes produtores de pescado da região Sul do Brasil e norte da Argentina, comercializando tanto espécies exóticas, quanto nativas. Além das espécies vindas de pisciculturas, também foram coletados indivíduos selvagens, provenientes de localidades distintas da mesma região. Para este estudo foram obtidos exemplares de *R. quelen*, *R. branneri* e *R. voulezi*, e observações adicionais como sexo, comprimento e maturidade reprodutiva também foram coletadas.

Os locais de coleta foram (tabela 1 e imagem 1):

| Localidades      | Região   | Espécie / natureza            | Simbologia |
|------------------|--|-------------------------------|------------|
| Pisc. Gaspar     | Gaspar - Santa Catarina                              | <i>R. quelen</i> / cultivo    | GQ         |
| Pisc. UFSM       | Santa Maria – Rio Grande do Sul                      | <i>R. quelen</i> / cultivo    | UFQ        |
| Comer. Toledo    | Toledo - Paraná                                      | <i>R. quelen</i> / cultivo    | CTQ        |
| Pisc. EPAGRI     | Caçador – Santa Catarina                             | <i>R. quelen</i> / cultivo    | EPQ        |
| Pisc. Ilhota     | Ilhota – Santa Catarina                              | <i>R. quelen</i> / cultivo    | ILQ        |
| Pisc. Panamá     | Paulo Lopes - Santa Catarina                         | <i>R. quelen</i> / cultivo    | PQ         |
| Bacia do Leste   | Rio Pirai, Rio Itapocú, Rio Benedito Novo            | <i>R. quelen</i> / selvagem   | BLQ        |
| Pisc. Casilda    | Casilda, Santa Fé - Argentina                        | <i>R. quelen</i> / cultivo    | PQARG      |
| P. Toledo        | Toledo, Paraná                                       | <i>R. voulezi</i> / cultivo   | PTV        |
| Lagoa do Peri    | Florianópolis – Santa Catarina                       | <i>R. quelen</i> / selvagem   | LPQ        |
| Alto Rio Uruguai | Vários pontos ao longo do rio e pequenos tributários | <i>R. quelen</i> / selvagem   | RUQ        |
| Casilda          | Casilda, Santa Fé - Argentina                        | <i>R. quelen</i> / selvagem   | SQCARG     |
| Corrientes       | Rio Riachuelo – Corrientes, Argentina                | <i>R. quelen</i> / selvagem   | SQARG      |
| São Paulo        | Rio Sapucaí-Mirim, São Paulo                         | <i>R. quelen</i> / selvagem   | SMQ        |
| Rio Iguazu       | Paraná   | <i>R. voulezi</i> / selvagem  | IV         |
| Rio Iguazu       | Paraná   | <i>R. branneri</i> / selvagem | IB         |

**Tabela 1:** Pontos de coleta, espécie e natureza dos indivíduos coletados e simbologia usada.



**Imagem 1:** Pontos de coleta, em destaque Bacia Paraná, Paraguai-Uruguaí.

As 175 amostras foram acondicionadas em solução de etanol a 95%, em criotubos mantidos em caixas de 100 unidades e preservados em freezers com temperatura abaixo de  $-4^{\circ}\text{C}$ . Estas amostras receberam códigos de identificação individual e número de lote registrados no banco de dados informatizado da coleção do Laboratório de Genômica e Conservação de Peixes (LAGENPE), Departamento de Ciências Biológicas de Bauru – UNESP.

### 3.2 Extração e padronização do DNA

A partir de tecido de nadadeira foram feitas as extrações e purificação do DNA genômico. A extração de DNA foi baseada no protocolo do kit comercial “PureLink Genomic DNA Purification Kit” (Thermo Scientific), com algumas modificações. A concentração e qualidade do DNA obtido foram determinadas através do fluorômetro *Qubit 2.0* (Invitrogen-Life Technologies) e por meio de eletroforese em gel de agarose 1%. A concentração de DNA de 151 indivíduos foi padronizada para aproximadamente 20 ng/microlitro e as amostras que não estavam nessa concentração ou foram concentradas ou diluídas em água MiliQ, totalizando 34 microlitros.

As amostras de DNA obtidas foram mantidas no LAGENPE, formando um banco de tecidos e de extração, para posterior processamento das análises genético-moleculares.

### 3.3 Single nucleotide polymorphism – SNPs

#### 3.3.1 Construção da biblioteca de DNA

Para a construção da biblioteca genômica foram utilizados no mínimo quatro indivíduos de cada localidade, totalizando 156 amostras de *R. quelen*, *R. voulezi* e *R. branneri* (1.04gb). Ela foi realizada utilizando o protocolo de sequenciamento/genotipagem de SNPs (ddRAD-seq, *double digest Restriction Associated DNA sequencing*), descrito por Peterson et al. (2012) e adaptado por Campos et al. (2017), onde são utilizadas duas enzimas de restrição. Sendo assim, o protocolo foi dividido em quatro tópicos principais: dupla digestão enzimática e purificação, ligação dos adaptadores, indexação, *pool* das amostras e *size selection*.

#### 3.3.2 Dupla digestão e purificação

Para a reação de dupla digestão, foram utilizados 34 µL de DNA total, 1.0 µL de enzima EcoRI de corte frequente (20U/µL), 1.0 µL da enzima MspI de corte raro (10U/µL) e 4.0 µL de tampão CutSmart (BioLabs), para otimização da reação. A solução de volume final 40 µL foi incubada durante 3 horas à temperatura de 37°C, em banho-maria. Em seguida, a reação foi digerida e purificada através do kit ProNex® Size-Selective Purification System (figura 4 A), com *beads* magnéticas. O material foi então quantificado com o Qubit™ dsDNA BR Assay Kit, para análise do padrão de concentração/µL.

### 3.3.3 Ligação dos adaptadores e purificação

A ligação dos dois adaptadores hibridizados (P1 e P2) (2.0 µL) foi feita especificamente para o conjunto de enzimas de dupla digestão, juntamente com 0.5 µL de T4 ligase, 4.0 µL de T4 ligase Buffer. As amostras foram incubadas a uma temperatura de 23°C por 30 minutos, 65°C por 10 minutos e 63°C por 28 segundos, sendo então a temperatura diminuída de 2°C a cada 90 segundos, até alcançar 23°C. O produto da incubação foi purificado novamente com o kit ProNex® Size-Selective Purification System e quantificado através do *Qubit*, para controle da concentração de DNA.

### 3.3.4 Indexação

A indexação foi feita através da inserção da sequência de complemento Nextera® Index Primers (Illumina, San Diego EUA) i5 e i7 (Nextera DNA CD Indexes – 96 indexes, 96 amostras) em cada amostra. Para a reação, utilizou-se 12.5 µL de Go Taq® Master Mixes (Promega), 2.5 µL de cada index i5 e i7 (em cada amostra uma combinação diferente, dependendo da concentração) e 7.5 µL de produto purificado. A PCR foi feita com 16 ciclos: 72°C durante 3 minutos, 95°C por 30 segundos e 95°C por 10 segundos, 55°C por 30 segundos (anelamento dos indexes), 72°C por 30 segundos e 72°C por 5 minutos. Em seguida, os fragmentos foram purificados com o kit ProNex® Size-Selective Purification System, quantificados através do *Qubit* e normalizados a 30 ng/µL.

### 3.3.5 *Size selection* e sequenciamento

O *pool* foi composto de 20 µL de cada amostra purificada e indexada, totalizando 3120 µL. Após nova purificação, o *pool* foi aplicado em gel de agarose 1% e, ao fim da eletroforese (50min), foi selecionado um tamanho de 250bp a 500bp. O gel foi cortado e purificado através do kit Wizard®

SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega), seguindo instruções do fabricante. Após a purificação, a biblioteca foi quantificada através da PCR em tempo real (qPCR), para verificar a porcentagem de indivíduos que estão indexados e quantificada novamente através do *Qubit*.

O sequenciamento Illumina HiSeq PE150 *single-end* foi realizado no EUA e incluiu um controle de qualidade Phyx com cobertura individual de aproximadamente 80 vezes, gerando um total de 2350000 pb por indivíduo e um total de 33GB de dados finais.

### 3.4 Bioinformática

As análises de bioinformática foram feitas utilizando o servidor “Zungaro” (servidor ssh), que está localizado na UNESP, campus de Botucatu, no Laboratório de Biologia e Genética de Peixes (LBGP).

#### 3.4.1 Controle de Qualidade

O controle de qualidade inicial das *reads* foi realizado através do programa FastQC ([www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/](http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/)), que verifica ruídos e problemas de sequenciamento, através do relatório QC fornecido pelo sequenciador. O software mostra um gráfico com visão geral da faixa de valores de qualidade em todas as bases em cada posição no arquivo FastQ, aquelas sequências que possuíam um *score* acima de 20 foram selecionadas.

#### 3.4.2 Stacks

O Stacks (Catchen et al., 2011) é um software de uso em C++ e scripts Perl, que incorpora um modelo estatístico de probabilidade máxima para identificar polimorfismos e distingui-los de erros

de sequenciamento. Desse modo, o programa emprega um catálogo para registrar todos os loci encontrados em uma população e compara os indivíduos a esse catálogo, para determinar quais alelos de haplótipos estão presentes em cada locus em cada indivíduo, produzindo estatísticas genômicas. A criação do catálogo pode se dar através da abordagem “*denovo*” (quando a espécie não possui um genoma referência) ou baseada em um genoma de referência. Até o momento, não há um genoma de referência descrito para *Rhamdia*, portanto nesse estudo, foi utilizada a abordagem “*denovo*”.

Primeiramente o módulo *ustacks* foi usado para mesclar RAD-tags em loci putativos para cada indivíduo. Para este módulo, permitimos até quatro incompatibilidades entre tags RAD (-M 4) e uma profundidade mínima de três leituras idênticas para construir um locus (-m 3). *Ustacks* foi executado usando o tipo de modelo limitado. Em seguida, foi criado um catálogo de loci por meio do módulo *cstacks* utilizando todas as amostras (n = 153) e permitindo quatro desencontros (-n 4) entre elas. O módulo *sstacks* foi usado para construir conjuntos de loci putativos, através do *ustacks* e *cstacks*. Finalizada essa etapa, foi utilizado o módulo *tsv2bam*, que transpôs os dados orientando-os por locus, ao invés de amostras. O *gstacks* foi empregado para identificar SNPs dentro da população para cada locus, para que cada indivíduo fosse genotipado em cada SNP identificado. E por fim, o módulo *populations* foi finalmente usado para obter o conjunto de dados SNP inicial, genotipando em não menos que 75% dos indivíduos, em pelo menos dezesseis populações (-r 0.75, -p 16). Além disso, foi empregado o sinalizador *-write\_single\_snp* para não obter mais de um SNP por locus.

### 3.4.3 Plink

O software PLINK 1.9 (cog-genomics.org) foi utilizado para aplicar os filtros de controle de qualidade, excluindo SNPs/indivíduos que não passaram nos seguintes critérios: *geno* 0.1 (filtra todas

as variantes com *missing call rates* que excedem o valor de 0.1), mind 0.1 (faz o mesmo para indivíduos) e MAF (*Minimum Allele Frequency* do alelo menos frequente, > 0,01). Também foram criados *outputs* para análises de *clusters* genéticos, no pacote R.

### 3.5 Análises de diversidade e estruturação genética

Para cada localidade, foram calculados: o número médio de alelos por locus ( $N_a$ ), a Heterozigosidade esperada (HE), Heterozigosidade observada (HO) e o desvio do Equilíbrio de Hardy-Weinberg, através dos softwares GENEPOP (Rousset, 2008), em R e ARLEQUIN v3.5.2.2 (Excofier et al., 2010). As análises da estrutura da população foram realizadas usando os conjuntos de dados SNPs total e, com a finalidade de analisar a diferenciação genética entre as populações, foram calculados os valores de  $F_{ST}$  pairwise, o AMOVA (análise de variância molecular) e o coeficiente de endogamia (Fis), também pelo programa ARLEQUIN.

A análise dos agrupamentos e a representação gráfica da estrutura genética foram realizadas pela Análise Discriminante de Componentes Principais (DAPC) (Jombart e Ahmed, 2011), através do pacote estatístico R. Gráficos de dispersão foram realizados utilizando o pacote ADEGENET (Jombart e Ahmed, 2011) para conjuntos de dados total.

O número de componentes principais retidos foi de 30 e o número de clusters genéticos utilizando os critérios de informação bayesiana (*Bayesian Information Criterion* - BIC) foram 16 e 20 funções discriminantes foram retidas para os conjuntos de dados total.

O software STRUCTURE v.2.3 (Pritchard et al., 2000) foi empregado para agrupar indivíduos em populações, com base no conjunto de dados total. Os números dos clusters (K) foram avaliados de 1 ao número de localidades (16). Dez execuções independentes para cada K foram implementadas

com um período de burn-in de 50.000 iterações, seguido por 100.000 réplicas de Monte Carlo Markov Chains (MCMC). Um modelo de mistura e frequências alélicas correlacionadas foram assumidos. O valor K mais provável foi determinado usando os critérios de probabilidade e Delta k ( $\Delta K$ ) (Evanno et al., 2005) e calculado usando o STRUCTURE HARVESTER (Earl et al., 2012).

## 5. Resultados e Discussão

Os resultados e a discussão estão descritos e discutidos a seguir em um capítulo em formato de artigo. As referências bibliográficas encontram-se ao final da tese, bem como o material complementar elaborado.

Capítulo

**Genômica populacional no estudo da diversidade e estruturação  
genética de espécies do gênero *Rhamdia*, com ênfase no complexo  
*Rhamdia quelen* de cultivo e selvagem**

## Resumo

No sul do Brasil e norte da Argentina o gênero *Rhamdia* é encontrado em rios e também produzido em sistemas semi-intensivos para comercialização, devido à boa qualidade da carne. Estudos anteriores constataram que a taxonomia do gênero é controversa, sendo as espécies, alvo de constantes realocações. Há hibridação e introgressão antrópica, o que caracteriza um complexo de espécies, dificultando os estudos de delimitação e filogeografia. Considerando a importância comercial e ecológica de *Rhamdia* na América do Sul e a escassez de informação genética, o presente estudo visa caracterizar a estrutura genética populacional e identificar padrões de diversidade genética de três espécies de *Rhamdia* (complexo *Rhamdia quelen*, *Rhamdia voulezi* e *Rhamdia branneri*). Amostras foram obtidas de ambiente natural (rios, riachos e lagoa) e de pisciculturas do estado de Santa Catarina, Paraná, Rio Grande do Sul, São Paulo e norte da Argentina. Foram utilizados marcadores moleculares do tipo SNPs e, após dupla digestão (ddRADseq), sequenciamento Illumina e filtragens, foram obtidos 1734 loci que estavam distribuídos em 141 indivíduos. A partir das análises detectou-se baixa diversidade genética em todos os grupos, sendo os indivíduos de cultivo os que possuem menores índices. Os valores de endogamia ( $F_{is}$ ) foram positivos e significativos em duas pisciculturas, indicando possível endogamia dentro desses grupos. A análise molecular da variância (AMOVA) indicou que a maior diferenciação genética está entre os indivíduos e não entre os grupos, o que também foi corroborado pela análise de componentes principais, que se mostrou coerente com a divisão em 5 grupos. Assim conclui-se que, apesar das populações apresentarem  $F_{st}$  elevado, elas possuem baixa diversidade genética e indícios de endogamia. Assim conclui-se que o complexo *Rhamdia quelen* e as outras espécies aqui estudadas possuem uma certa distância genética, porém são muito relacionados entre si. Dessa maneira, reforçamos a importância de mais estudos de

delimitação de espécies e diversidade do complexo *Rhamdia quelen* e espécies relacionadas, uma vez que são ecologicamente importantes da América do Sul.

## INTRODUÇÃO

A região neotropical tem alguns dos maiores números de famílias de peixes e há uma alta proporção de famílias endêmicas pertencentes à ordem dos siluriformes (aprox. 1300 espécies) (Mastrochirico Filho, 2018). A alta biodiversidade desse ambiente (Casatti et al., 2001; Suárez, 2008) se deve principalmente pela história hidrogeológica, evolução paleontológica, mudanças climáticas (Abreu et al., 2011; Piorsk, 2011; Ríos et al., 2019, 2020) e pode refletir tanto em altas taxas de produtividade e diversidade fisiológica como também no isolamento geográfico das espécies (Ormerod, 2003).

O gênero *Rhamdia* está amplamente distribuído pela América do Sul, desde os Andes até o norte da Argentina (Perdices et al., 2002) e é um importante recurso explorado em toda a sua distribuição geográfica (Vaz et al., 2010; Ittzés et al., 2015; Menezes et al., 2015; Scaranto et al., 2018, Ríos et al., 2019). Em trabalho realizado com marcadores COI, Ribolli et al. 2021 indicaram que *R. quelen* se trata na verdade de um complexo de espécies denominadas *R. quelen*, que ocorre apenas na região cis-andina. Apesar da importância comercial e ecológica, sua história de vida permanece desconhecida, uma vez que o status taxonômico desse grupo permanece confuso e complexo (Valadão et al., 2018; Ríos et al., 2019; Ribolli et al., 2021), já que os indivíduos dessas espécies possuem semelhança morfológica muito grande.

O termo “espécie críptica” é usado para táxons morfológicamente indistinguíveis para os quais há evidências (genéticas, ecológicas, comportamentais, biológicas etc.) de que pertencem a

diferentes linhagens evolutivas (Mayr, 1970; Bickford et al., 2007). Grupos de tais táxons são comumente referidos como “complexos de espécies crípticas”. Espécies crípticas podem ter divergido recentemente e ainda não terem se tornado morfologicamente distintas, ou são distantemente relacionadas, mas mantiveram sua morfologia ancestral ou convergiram morfologicamente (Fišer et al., 2018; Struck et al., 2018; De Luca et al., 2021). A detecção da estruturação genética e delimitação das crípticas que compõem o gênero *Rhamdia* representa um desafio uma vez que ainda não são conhecidos os processos históricos adaptativos que levaram à diferenciação das espécies que compõem o gênero.

Na primeira revisão sistemática proposta por Silfvergrip (1996), mais de 100 espécies foram sinônimas, 46 das quais com *R. quelen* (Reis et al., 2003; Ríos et al., 2020). Dois sinônimos de *R. quelen* (*Rhamdia branneri* e *Rhamdia voulezi*) foram recuperados como espécies válidas através de estudos morfológicos e moleculares (Garavello e Shibatta, 2016; Ribolli et al., 2017). A partir disso, novas espécies foram descritas (DoNascimento et al., 2004; Bichuette e Trajano, 2005; Angrizani e Malabarba, 2018). Koerber e Reis (2020) indicaram uma nova localidade-tipo em um afluente da Baía de Guanabara, estado do Rio de Janeiro, para substituir um espécime-tipo ausente de *R. quelen*. Apesar disso, uma revisão taxonômica do gênero *Rhamdia* é imediatamente necessária para explicar os problemas de delimitação das espécies, que dificultam sua identificação correta (Koerber e Reis, 2020).

A.1)



A.2)



Figura 1: A.1) *Rhamdia quelen*. Foto: Panorama da Aquicultura, No. 69. A.2) *Rhamdia branneri* / B: *Rhamdia voulezi*, Rio Iguaçu. Foto: MZUEL.

Nesse estudo, utilizamos o sequenciamento de DNA associado a sítios de restrição, com dupla digestão (ddRAD-seq) para sub amostrar regiões homólogas putativas do genoma de indivíduos do complexo *R. quelen*, *R. voulezi* e *R. branneri*, de pisciculturas e rios da região sul do Brasil e norte da Argentina. O RAD-seq é uma técnica particularmente relevante para estudos focados em espécies para as quais não há recursos genômicos disponíveis, pois permite descobrir milhares de SNPs de todo o genoma enquanto os genotipa em centenas de indivíduos (Dave et al., 2011; Díaz-Arce et al, 2019).

O objetivo do estudo foi comparar os padrões de diversidade e estrutura genética em indivíduos de cultivo e selvagens, no sul da América do Sul e encontrar relação entre seus índices de diversidade e estruturação genética dentro/entre grupos.

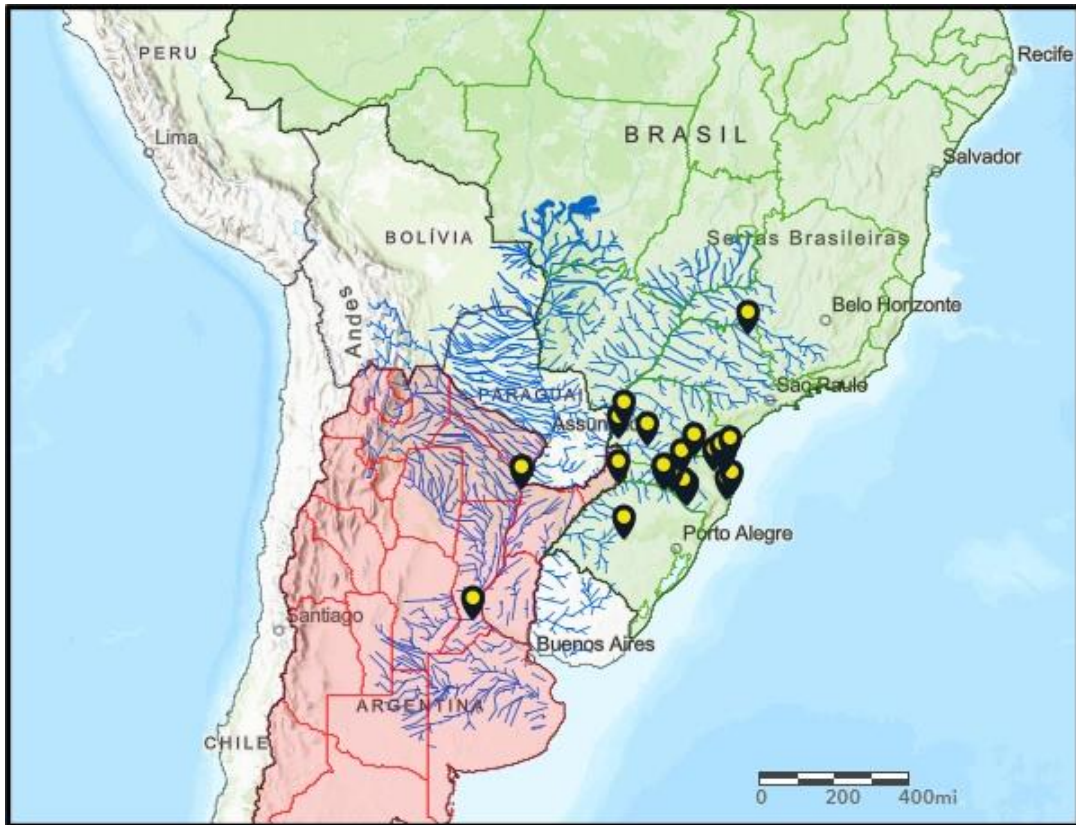
## MATERIAIS E MÉTODOS

### Coleta de amostras e extração do DNA

Um total de 156 indivíduos (141 indivíduos *R. quelen*/ 9 indivíduos *R. branneri*/ 6 indivíduos *R. voulezi*) foram analisados para marcadores SNPs. As análises genômicas foram realizadas com indivíduos provenientes de 8 pisciculturas e 8 rios, tanto do Brasil quanto Argentina (Tabela 1 e Imagem 2):

| Localidades      | Região   | Espécie / natureza            | Simbologia |
|------------------|--|-------------------------------|------------|
| Pisc. Gaspar     | Gaspar - Santa Catarina                              | <i>R. quelen</i> / cultivo    | GQ         |
| Pisc. UFSM       | Santa Maria – Rio Grande do Sul                      | <i>R. quelen</i> / cultivo    | UFQ        |
| Comer. Toledo    | Toledo - Paraná                                      | <i>R. quelen</i> / cultivo    | CTQ        |
| Pisc. EPAGRI     | Caçador – Santa Catarina                             | <i>R. quelen</i> / cultivo    | EPQ        |
| Pisc. Ilhota     | Ilhota – Santa Catarina                              | <i>R. quelen</i> / cultivo    | ILQ        |
| Pisc. Panamá     | Paulo Lopes - Santa Catarina                         | <i>R. quelen</i> / cultivo    | PQ         |
| Bacia do Leste   | Rio Pirai, Rio Itapocú, Rio Benedito Novo            | <i>R. quelen</i> / selvagem   | BLQ        |
| Pisc. Casilda    | Casilda, Santa Fé - Argentina                        | <i>R. quelen</i> / cultivo    | PQARG      |
| P. Toledo        | Toledo, Paraná                                       | <i>R. voulezi</i> / cultivo   | PTV        |
| Lagoa do Peri    | Florianópolis – Santa Catarina                       | <i>R. quelen</i> / selvagem   | LPQ        |
| Alto Rio Uruguai | Vários pontos ao longo do rio e pequenos tributários | <i>R. quelen</i> / selvagem   | RUQ        |
| Casilda          | Casilda, Santa Fé - Argentina                        | <i>R. quelen</i> / selvagem   | SQCARG     |
| Corrientes       | Rio Riachuelo – Corrientes, Argentina                | <i>R. quelen</i> / selvagem   | SQARG      |
| São Paulo        | Rio Sapucaí-Mirim, São Paulo                         | <i>R. quelen</i> / selvagem   | SMQ        |
| Rio Iguaçu       | Paraná   | <i>R. voulezi</i> / selvagem  | IV         |
| Rio Iguaçu       | Paraná   | <i>R. branneri</i> / selvagem | IB         |

**Tabela 1:** Pontos de coleta, espécie e natureza dos indivíduos coletados e simbologia usada.



**Imagem 2:** Pontos de coleta, em destaque Bacia Paraná, Paraguai-Uruguai.

O tecido de nadadeira foi acondicionado em solução de etanol a 95%, em criotubos preservados em freezers com temperatura abaixo de  $-4^{\circ}\text{C}$ . Estas amostras receberam códigos de identificação individual e número de lote registrados no banco de dados informatizado da coleção do Laboratório de Genética de Peixes (LAGENPE), Departamento de Ciências Biológicas de Bauru – UNESP. A extração de DNA foi baseada no protocolo do kit comercial “PureLink Genomic DNA Purification Kit” (Thermo Scientific), com algumas modificações. A concentração e qualidade do DNA obtido foram determinadas através do fluorômetro *Qubit 2.0* (Invitrogen-Life Technologies) e por meio de eletroforese em gel de agarose 1%. A concentração de DNA dos 151 indivíduos foi padronizada para aproximadamente 20 ng/microlitro e as amostras que não estavam nessa concentração ou foram concentradas ou diluídas em água MiliQ, totalizando 34 microlitros.

## Construção e sequenciamento da biblioteca de SNPs

Após as etapas de quantificação do DNA, cada amostra foi padronizada para uma concentração final de 200ng/ul. Para caracterizar os marcadores moleculares SNPs, foi realizada a construção das bibliotecas ddRADseq (double digest Restriction Associated DNA sequencing), utilizando o protocolo descrito em Campos et al. (2017), seguindo as diretrizes originais de Peterson et al. (2012), onde foram duas enzimas de restrição (EcoRI e MspI). A purificação de todas as etapas foi efetuada com beads do kit ProNex® Size-Selective Purification System e a indexação das amostras foi feita através da inserção da sequência de complemento Nextera® Index Primers (Illumina) i5 e i7. Afim de selecionar o tamanho dos fragmentos de interesse, foi feito o size selection do pool de amostras selecionando um tamanho de 300pb a 500pb, que foi purificado. A biblioteca foi quantificada em PCR em tempo real (qPCR), sendo realizado o sequenciamento Illumina HiSeq PE150 *single-end*, onde foi incluído um controle de qualidade Phyx com cobertura individual de aproximadamente 80 vezes, gerando 2350000 pb por indivíduo e um total de 33GB de dados finais.

## Processamento dos dados e genotipagem dos SNPs

Os dados brutos foram demultiplexados e o controle de qualidade inicial das *reads* foi realizado através do programa FastQC ([www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/](http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/)). Somente aquelas sequências que possuíam um *score* acima de 20 foram selecionadas.

As leituras de sequenciamento filtradas foram processadas e genotipadas usando as pipelines de construção de loci STACKS v.1.46, sem um genoma de referência. O primeiro módulo, *ustacks*, foi usado para mesclar RAD-tags em loci putativos para cada indivíduo. Para este módulo, permitimos até quatro incompatibilidades entre tags RAD (-M 4) e uma profundidade mínima de três leituras idênticas para construir um locus (-m 3). Em seguida, foi criado um catálogo de loci por meio

do módulo *cstacks* utilizando todas as amostras ( $n = 156$ ) permitindo quatro *mismatches* ( $-n 4$ ) entre elas. Finalizada essa etapa, foi utilizado o módulo *tsv2bam*, que transpôs os dados orientando-os por locus, ao invés de amostras. Depois, o *gstacks* foi empregado para identificar SNPs dentro da população para cada locus, para que cada indivíduo fosse genotipado em cada SNP identificado. E por fim, o módulo *populations* foi finalmente usado para obter o conjunto de dados SNP inicial, genotipando em não menos que 75% dos indivíduos, em pelo menos dezesseis populações ( $-r 0.75$ ,  $-p 16$ ). Além disso, foi empregado o sinalizador *-write\_single\_snp* para não obter mais de um SNP por locus.

O software PLINK 1.9 ([cog-genomics.org](http://cog-genomics.org)) foi utilizado para aplicar os filtros de controle de qualidade, excluindo SNPs/indivíduos que não passaram nos seguintes critérios: *geno 0.1* (filtra todas as variantes com *missing call rates* que excedem o valor de 0.1), *mind 0.1* (faz o mesmo para indivíduos) e MAF (*Minimum Allele Frequency* do alelo menos frequente,  $> 0.01$ ).

## Diversidade genética e estruturação populacional

Para cada localidade foram calculados no R, através do pacote *Genepop* (Rousset, 2008), o número médio de alelos por locus ( $N_a$ ), Heterozigosidade esperada ( $H_e$ ) e a Heterozigosidade observada ( $H_o$ ), além do Desvio do Equilíbrio de Hardy Weinberg. Para analisar a diferenciação genética entre as populações foram calculados os valores de  $F_{ST}$  pairwise e o AMOVA (análise de variância molecular), além do coeficiente de endogamia ( $F_{IS}$ ), que foram estimados usando o programa ARLEQUIN v3.5.2.2 (Excofier et al., 2010). A análise dos agrupamentos e a representação gráfica da estrutura genética foram realizadas pela Análise Discriminante de Componentes Principais (DAPC) (Jombart e Ahmed, 2011), através do pacote estatístico R. Gráficos de dispersão foram realizados utilizando o pacote ADEGENET (Jombart e Ahmed, 2011) para conjuntos de dados total. O

número de componentes principais retidos foi de 30 e o número de clusters genéticos utilizando os critérios de informação bayesiana (Bayesian Information Criterion - BIC) foram 16 e 20 funções discriminantes foram retidas para os conjuntos de dados total.

A análise bayesiana da estrutura da população foi realizada no STRUCTURE v. 2.3, para agrupar indivíduos em populações com base no conjunto de dados total. Os números dos clusters (K) foram avaliados de 1 ao número de localidades (16) K = 1 a K = 16. Dez execuções independentes para cada K foram implementadas com um período de *burn-in* de 50.000 iterações, seguido por 100.000 réplicas de *Monte Carlo Markov Chains* (MCMC). Um modelo de mistura e frequências alélicas correlacionadas foram assumidos. O valor K mais provável foi determinado usando os critérios de probabilidade e Delta k ( $\Delta K$ ) (Evanno et al., 2005) e calculado usando o Structure Harvester (Earl et al., 2012).

## RESULTADOS

### Processamento de dados do genoma e genotipagem

Um total de 290.589.519 leituras brutas foram recuperadas da plataforma de sequenciamento, representando uma média de 1.862.753 leituras por indivíduo. Depois de aplicar os filtros iniciais de qualidade e trimagem das sequências, foram obtidas 220.044.390 leituras.

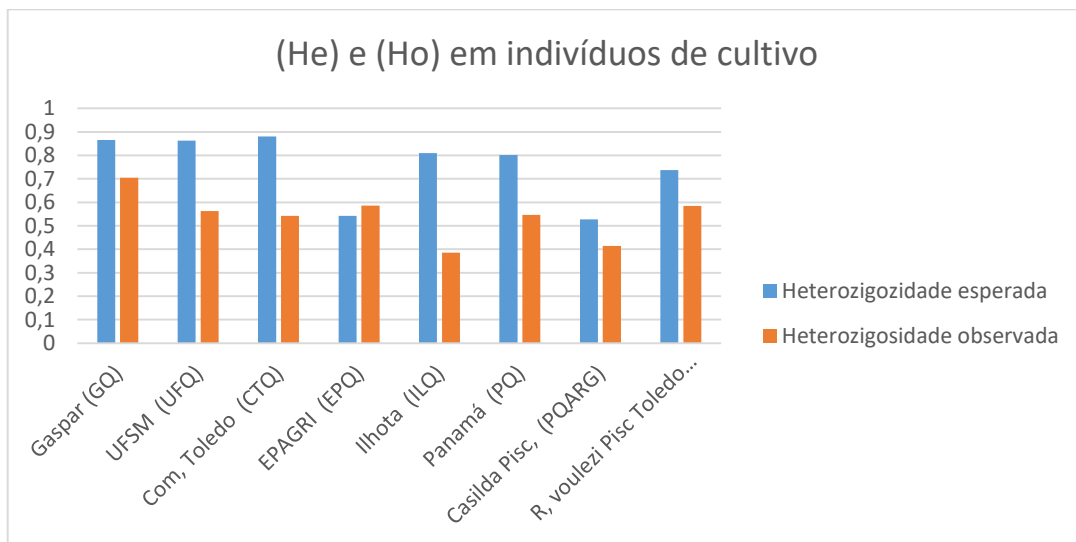
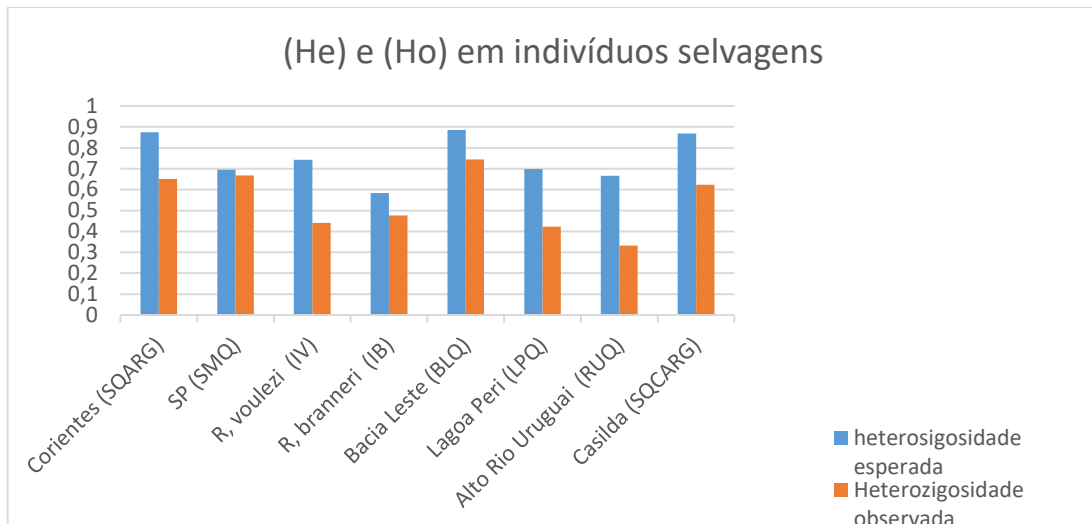
Através do Stacks foi construído um catálogo de 468.803 loci, por meio do módulo *cstacks* e, após a execução do módulo *populations*, foram recuperados 3314 loci. Após as filtrações pelo Plink, através dos filtros GENO, MIND e MAF, foram retidos 141 indivíduos e 1734 loci.

## Diversidade e estrutura genética

A diversidade genética apresentou média de 0.753 (He) em todas as populações. (Na) variou de 0 (*R. quelen*, Piscicultura Ilhota - ILQ) a 1.34 (*R. quelen*, Piscicultura Comercial Toledo - CTQ) (tabela 3), enquanto (He) variou de 0.527 (*R. quelen*, Piscicultura Casilda, Argentina - PQARG) a 0.885 (*R. quelen*, Bacia do Leste - BLQ). (He) de *R. voulezi* (IV) foi de 0.743 e de *R. branneri* (IB) foi de 0.584. A média (He) de cultivo foi 0.748 e a média (He) selvagens foi 0.751 (Tabela 1 e Gráfico 1). A média dos valores dos valores de Fis foi de 0.08994 com valores não significativos próximos a zero em todas as populações, exceto para as populações 4 (CT) e 8 (BLQ), que mostravam valores de Fis altos e significativos (tabela 2):

| Localidades            | Espécie / natureza            | N  | Nf | Na   | MAF   | Ho    | He    | Fis              | N. sítios polimórficos |
|------------------------|-------------------------------|----|----|------|-------|-------|-------|------------------|------------------------|
| Pisc. Gaspar (GQ)      | <i>R. quelen</i> / cultivo    | 6  | 6  | 1.13 | 0.275 | 0.704 | 0.866 | -0.05781         | 5                      |
| Pisc. UFSM (UFQ)       | <i>R. quelen</i> / cultivo    | 9  | 7  | 1.16 | 0.275 | 0.563 | 0.862 | 0.39841          | 5                      |
| Comer. Toledo (CTQ)    | <i>R. quelen</i> / cultivo    | 6  | 6  | 1.34 | 0.256 | 0.542 | 0.881 | <b>0.08470*</b>  | 39                     |
| Pisc. EPAGRI (EPQ)     | <i>R. quelen</i> / cultivo    | 10 | 10 | 1.12 | 0.287 | 0.586 | 0.542 | -0.24292         | 13                     |
| Pisc. Ilhota (ILQ)     | <i>R. quelen</i> / cultivo    | 10 | 10 | 0    | 0.287 | 0.385 | 0.809 | 0.04956          | 7                      |
| Pisc. Panamá (PQ)      | <i>R. quelen</i> / cultivo    | 16 | 16 | 1.17 | 0.285 | 0.547 | 0.801 | -0.08334         | 25                     |
| Pisc. Casilda (PQARG)  | <i>R. quelen</i> / cultivo    | 8  | 8  | 1.17 | 0.304 | 0.414 | 0.527 | 0.03422          | 19                     |
| P. Toledo (PTV)        | <i>R. voulezi</i> / cultivo   | 9  | 8  | 1.16 | 0.212 | 0.585 | 0.737 | -0.04064         | 6                      |
| Bacia do Leste (BLQ)   | <i>R. quelen</i> / selvagem   | 7  | 6  | 1.14 | 0.274 | 0.744 | 0.885 | <b>0.061105*</b> | 20                     |
| Lagoa do Peri (LPQ)    | <i>R. quelen</i> / selvagem   | 9  | 9  | 1.23 | 0.312 | 0.423 | 0.698 | 0.18341          | 14                     |
| Alto Rio Uruguai (RUQ) | <i>R. quelen</i> / selvagem   | 8  | 8  | 1.21 | 0.258 | 0.332 | 0.666 | 0.18934          | 26                     |
| Casilda (SQCARG)       | <i>R. quelen</i> / selvagem   | 11 | 11 | 1.19 | 0.356 | 0.623 | 0.869 | -0.06790         | 10                     |
| Corrientes (SQARG)     | <i>R. quelen</i> / selvagem   | 17 | 17 | 1.3  | 0.475 | 0.651 | 0.875 | 0.05004          | 89                     |
| São Paulo (SMQ)        | <i>R. quelen</i> / selvagem   | 4  | 4  | 1.07 | 0.243 | 0.668 | 0.695 | 0.02136          | 0                      |
| Rio Iguaçu (IV)        | <i>R. voulezi</i> / selvagem  | 6  | 6  | 1.2  | 0.358 | 0.441 | 0.743 | 0.08897          | 4                      |
| R. Iguaçu (IB)         | <i>R. branneri</i> / selvagem | 6  | 9  | 1.2  | 0.232 | 0.476 | 0.584 | 0.02813          | 4                      |

**Tabela 2:** N = número de amostras; Nf = número de amostras pós-filtragens; MAF = menor frequência alélica ( $MAF \geq 0,01$ ); Ho = heterozigosidade observada; He = heterozigosidade esperada; Fis = índice de endogamia, em negrito,  $Fis p < 0,05$ ; Ne, tamanho efetivo da população.



**Figura 3:** Representação gráfica da a) Heterosigoidade esperada (He) e observada (Ho) em selvagens; b) Heterosigoidade esperada e observada, em *Rhamdias* de cultivo.

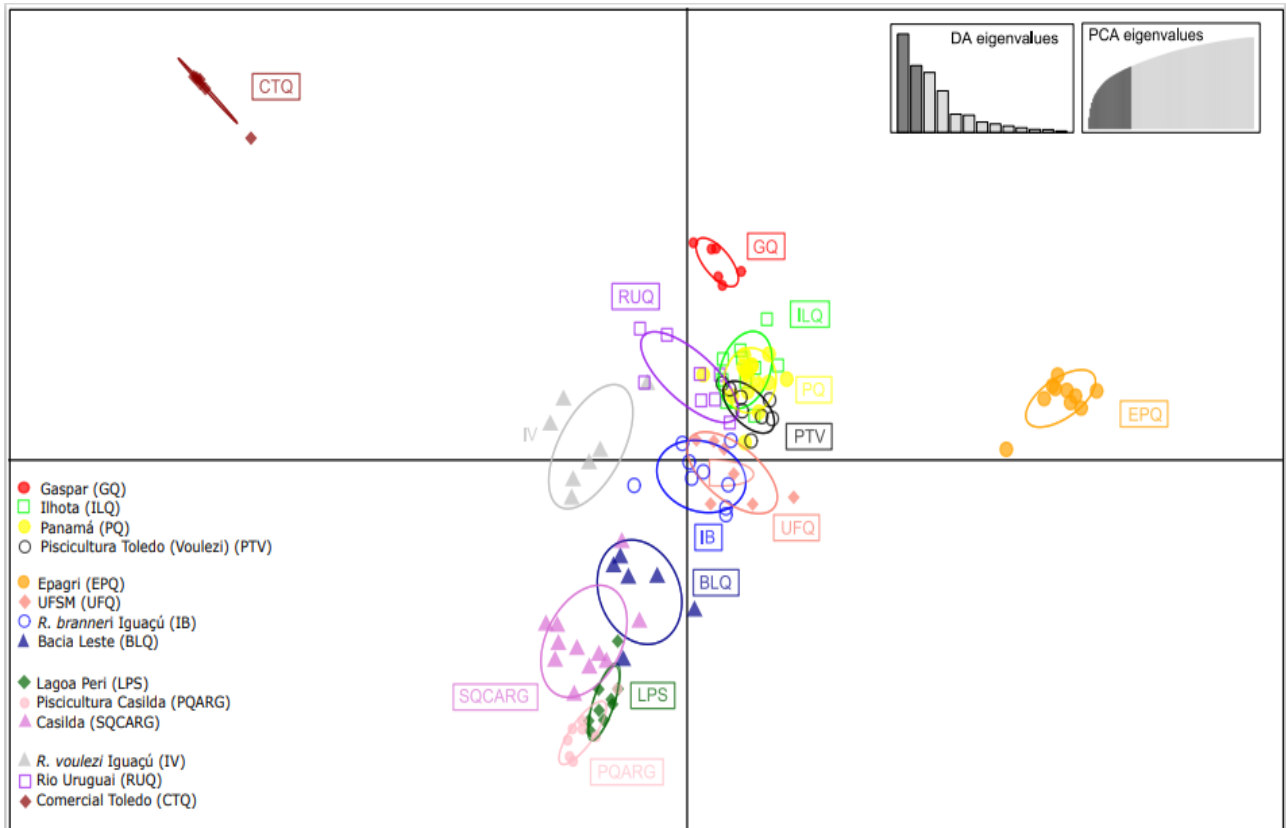
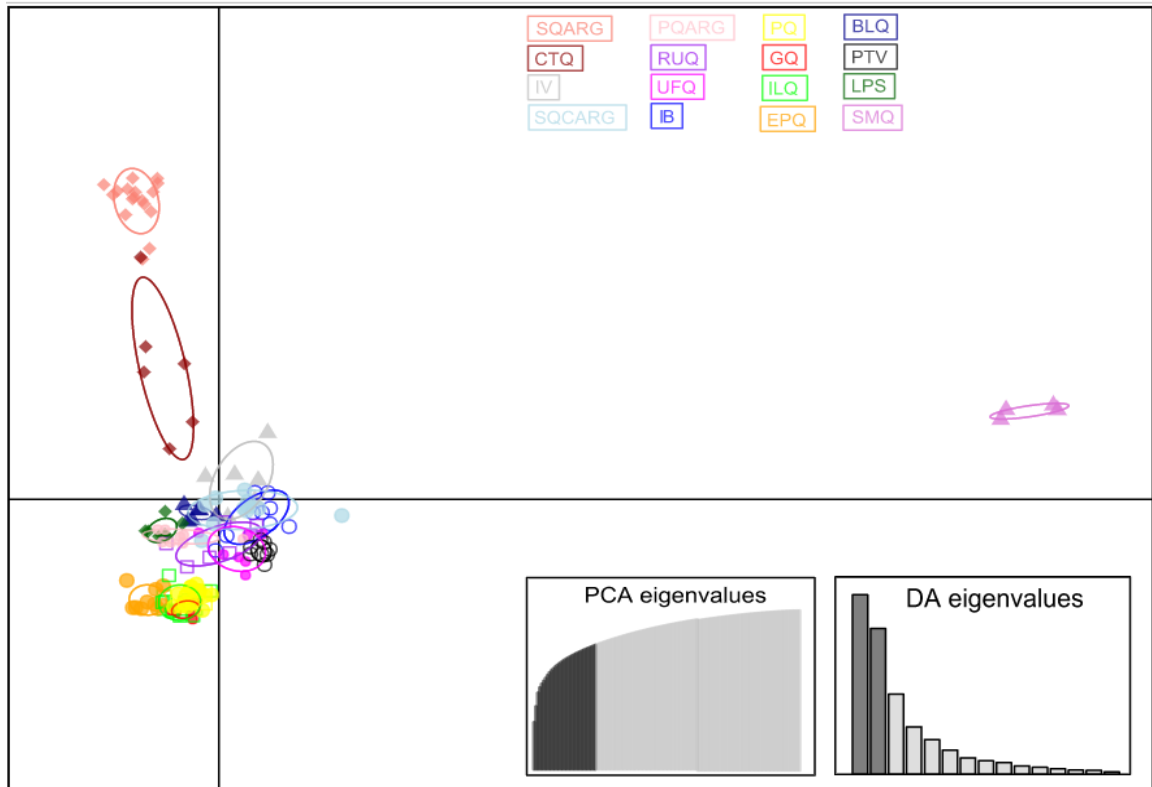
A porcentagem de variação entre os grupos (AMOVA) foi de aproximadamente 25%, sendo a diferença entre indivíduos a mais pronunciada (54%) (Tabela 3):

| Fonte de variação                      | Soma dos quadrados | Componentes de variância | Porcentagem de variação |
|--|--------------------|--------------------------|-------------------------|
| Entre grupos                           | 6500.135           | 26.89257                 | <b>24.84</b>            |
| Entre populações dentro de grupos      | 4077.183           | 17.27443                 | 15.96                   |
| Entre indivíduos dentro das populações | 8940.949           | 5.76412                  | 5.32                    |
| Entre indivíduos                       | 8398.500           | 58.32292                 | 53.88                   |
| Total                                  | 27916.767          | 108.25404                |                         |

**Tabela 3:** Análise da variância molecular (AMOVA) entre / dentro das populações de *Rhamdia*. Em negrito: diferenciação entre os grupos.

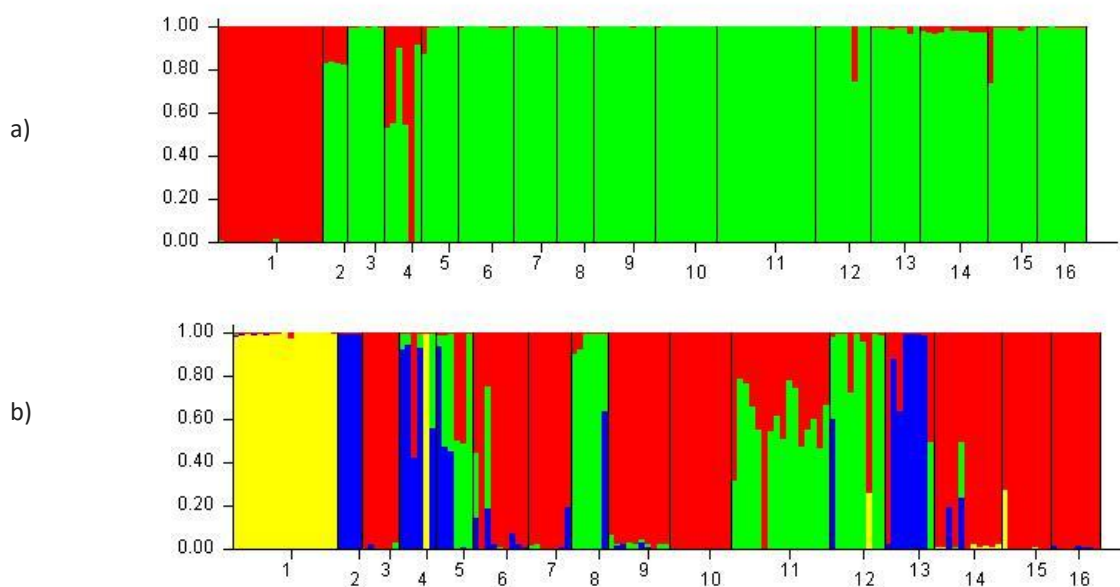
Os resultados DAPC baseados no conjunto total de loci mostraram uma diferenciação entre 5 grupos: um composto por indivíduos selvagens da Argentina (SQARG), um grupo contendo indivíduos selvagens de São Paulo (SMQ), outro grupo contendo indivíduos de piscicultura do Paraná (CTQ), um grupo grande contendo várias localidades tanto selvagens, quanto de piscicultura – incluindo *R. voulezi* e *R. branneri* - (IV, IB, SQCARG, PQARG, RUQ, UFQ, BLQ, PTV, LPS) e um último grupo, ainda que próximo ao grupo anterior, contendo indivíduos só de piscicultura (PQ, GQ, ILQ, EPQ) (Figura 5).

Para vermos melhor a separação entre as populações dentro dos grupos, tiramos os pontos extremos do mapa (SCARG e SMQ) e fizemos novamente um gráfico DAPC. Esse diagrama nos mostrou uma separação maior entre indivíduos *R. quelen* de CTQ e EPG. Podemos notar que os indivíduos da Argentina (SQCARG, PQARG) se agrupam perto dos indivíduos da Bacia do Leste (BLQ) e Lagoa do Peri (LPQ) e que os indivíduos de Gaspar (GQ), Ilhota (ILQ), Panamá (PQ), UFSM (UFQ) e *R. voulezi* de Toledo (PV) se encontram mais próximos à indivíduos da EPAGRI (EPQ). Já *R. voulezi* (IV) se separou um pouco, porém continua perto de *R. branneri* (IB) e indivíduos de *R. quelen* do Alto Rio Uruguai.

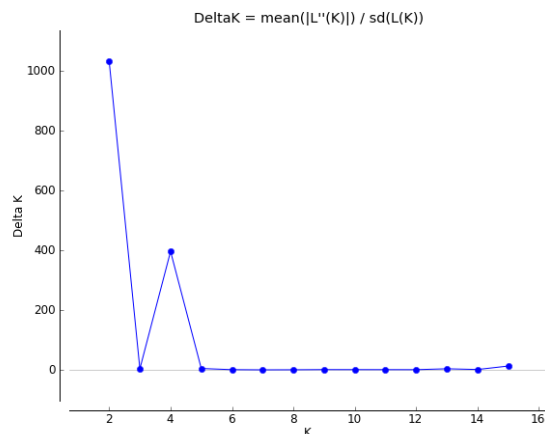


**Figura 4:** Gráfico de dispersão DAPC (Análise Discriminante de Componentes Principais) de indivíduos do complexo *Rhamdia quelen*, *Rhamdia voulezi* e *Rhamdia branneri* no Sul do Brasil e Norte da Argentina com base no número total de 1734 loci. Os indivíduos são agrupados por localidade e as cores referem-se às diferentes localidades, entre selvagens e pisciculturas: SQARG (*R. quelen*/selvagem, Corientes, Argentina), SMQ (*R. quelen*/selvagem, São Paulo), SQCARG (*R. quelen*/selvagem, Casilda, Argentina), BLQ (*R. quelen*/selvagem, Bacia do Leste, Santa Catarina), LPS (*R. quelen*/selvagem, Lagoa do Peri, Santa Catarina), RUQ (*R. quelen*/selvagem, Alto Rio Uruguai, Santa Catarina), IV (*R. voulezi*/selvagem, Santa Catarina), IB (*R. branneri*/selvagem, Santa Catarina), CTQ (*R. quelen*/piscicultura, C. Toledo, Paraná), PQARG (*R. quelen*/piscicultura, Casilda, Argentina), UFQ (*R. quelen*/piscicultura, Rio Grande do Sul), PQ (*R. quelen*/piscicultura, Panamá, Santa Catarina), GQ (*R. quelen*/piscicultura, Gaspar, Santa Catarina), ILQ (*R. quelen*/piscicultura, Ilhota, Santa Catarina), EPQ (*R. quelen*/piscicultura, Epagri, Santa Catarina), PTV (*R. voulezi*/piscicultura, C. Toledo, Paraná).

As análises a partir do Structure mostraram os melhores resultados de agrupamento para  $K = 2$  (figura 3), suportado pelos critérios Delta K ( $\Delta K$ ) e  $\ln(PX|K)$  (Arquivo Suplementar). Além disso, mostramos a segunda melhor opção  $\Delta K$  para fins de comparação:  $k = 4$ , para o mesmo conjunto de dados.



c)



**Figura 5:** Estrutura populacional estimada (a)  $K = 2$ ; (b)  $K = 4$ , em Structure, de *R. quelen*, *R. voulezi* e *R. branneri* no Sul do Brasil e Norte da Argentina. Cada barra vertical colorida representa a fração estimada de adesão de um indivíduo nos principais aglomerados populacionais. (c) Gráfico do valor delta K que determina o número ideal de grupos presentes na análise. POP1: SQARG (*R. quelen*/selvagem, Corientes, Argentina), POP2: SMQ (*R. quelen*/selvagem, São Paulo), POP3: GQ (*R. quelen*/piscicultura, Gaspar, Santa Catarina), POP4: UFQ (*R. quelen*/piscicultura, Rio Grande do Sul), POP5: IV (*R. voulezi*/selvagem, Santa Catarina), POP6: IB (*R. branneri*/selvagem, Santa Catarina), POP7: CTQ (*R. quelen*/piscicultura, C. Toledo, Paraná), POP8: BLQ (*R. quelen*/selvagem, Bacia do Leste, Santa Catarina), POP9: EPQ (*R. quelen*/piscicultura, Epagri, Santa Catarina), POP10: ILQ (*R. quelen*/piscicultura, Ilhota, Santa Catarina), POP11: PQ (*R. quelen*/piscicultura, Panamá, Santa Catarina), POP12: LPS (*R. quelen*/selvagem, Lagoa do Peri, Santa Catarina), POP13: RUQ (*R. quelen*/selvagem, Alto Rio Uruguai, Santa Catarina), POP14: SQCARG (*R. quelen*/selvagem, Casilda, Argentina), POP15: PQARG (*R. quelen*/piscicultura, Casilda, Argentina), POP16: PTV (*R. voulezi*/piscicultura, C. Toledo, Paraná).

Os histogramas de estrutura para  $K = 2$  foram parcialmente concordantes com o padrão encontrado por DAPC, uma vez que o grupo 1 (SQARG) se difere dos outros grupos, que por sua vez formam um único aglomerado com leves sinais de mistura. Porém quando vemos a estrutura para  $k = 4$ , notamos uma maior semelhança com a análise de discriminantes, uma vez que há diferenciação do grupo 1, grupo 2 (SMQ), grupo 4 (CTQ) e grupo com restante das localidades. Se analisarmos o melhor valor de  $k = 5$  (como indicado pelo DAPC),

Quando analisados os cinco grupos, os resultados de diferenciação genética *pairwise* (Fst) foram significativos para a maioria das comparações testadas (exceto entre ILQ x LPS) e as análises mostraram alta diferenciação entre os grupos, sendo a maior diferenciação entre SMQ x UFQ, com Fst = 0.619 (P < 0.05) e a menor entre BLQ x PQ, com Fst = 0.046 (P < 0.05).

A maior diferenciação genética *pairwise* entre *R. quelen* e *R. voulezi* selvagens se deu entre IV x SQARG, com Fst = 0.51508 (P < 0.05). Já a menor diferenciação se deu entre IV x BLQ, com Fst = 0.06149 (P < 0.05). A maior diferenciação entre *R. branneri* e *R. quelen* selvagens se deu entre IB x SMQ, com Fst = 0.58961 (P < 0.05) e a menor se deu entre IB x RUQ, Fst = 0.15952 (P < 0.05). A maior diferenciação genética *pairwise* entre pisciculturas se deu entre CTQ x EPQ, com Fst = 0.37724 (P < 0.05) e a menor diferenciação genética entre GQ x PQ, com Fst = 0.04828 (P < 0.05) (Tabela 3).

|               | SQARG | SMQ   | GQ    | CTQ   | UFQ   | BLQ   | EPQ   | ILQ   | PQ    | LPQ   | RUQ   | SQCARG | PQARG | PTV   | IV    | IB    |
|---------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|--------|-------|-------|-------|-------|
| <b>SQARG</b>  | 0,000 |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |        |       |       |       |       |
| <b>SMQ</b>    | 0,543 | 0,000 |       |       |       |       |       |       |       |       |       |        |       |       |       |       |
| <b>GQ</b>     | 0,520 | 0,515 | 0,000 |       |       |       |       |       |       |       |       |        |       |       |       |       |
| <b>CTQ</b>    | 0,558 | 0,550 | 0,147 | 0,000 |       |       |       |       |       |       |       |        |       |       |       |       |
| <b>UFQ</b>    | 0,574 | 0,619 | 0,122 | 0,185 | 0,000 |       |       |       |       |       |       |        |       |       |       |       |
| <b>BLQ</b>    | 0,501 | 0,484 | 0,066 | 0,135 | 0,125 | 0,000 |       |       |       |       |       |        |       |       |       |       |
| <b>EPQ</b>    | 0,381 | 0,327 | 0,277 | 0,338 | 0,377 | 0,278 | 0,000 |       |       |       |       |        |       |       |       |       |
| <b>ILQ</b>    | 0,489 | 0,409 | 0,201 | 0,257 | 0,302 | 0,211 | 0,186 | 0,000 |       |       |       |        |       |       |       |       |
| <b>PQ</b>     | 0,510 | 0,455 | 0,048 | 0,125 | 0,111 | 0,046 | 0,253 | 0,133 | 0,000 |       |       |        |       |       |       |       |
| <b>LPQ</b>    | 0,485 | 0,459 | 0,247 | 0,313 | 0,342 | 0,272 | 0,236 | 0,067 | 0,202 | 0,000 |       |        |       |       |       |       |
| <b>RUQ</b>    | 0,533 | 0,561 | 0,298 | 0,364 | 0,375 | 0,313 | 0,315 | 0,143 | 0,246 | 0,078 | 0,000 |        |       |       |       |       |
| <b>SQCARG</b> | 0,490 | 0,306 | 0,232 | 0,251 | 0,320 | 0,214 | 0,214 | 0,167 | 0,174 | 0,252 | 0,321 | 0,000  |       |       |       |       |
| <b>PQARG</b>  | 0,525 | 0,511 | 0,112 | 0,200 | 0,168 | 0,109 | 0,298 | 0,207 | 0,091 | 0,272 | 0,300 | 0,246  | 0,000 |       |       |       |
| <b>PTV</b>    | 0,535 | 0,570 | 0,174 | 0,258 | 0,222 | 0,163 | 0,334 | 0,284 | 0,146 | 0,321 | 0,355 | 0,316  | 0,131 | 0,000 |       |       |
| <b>IV</b>     | 0,515 | 0,505 | 0,073 | 0,138 | 0,102 | 0,061 | 0,271 | 0,204 | 0,058 | 0,259 | 0,316 | 0,207  | 0,127 | 0,177 | 0,000 |       |
| <b>IB</b>     | 0,572 | 0,590 | 0,221 | 0,286 | 0,259 | 0,228 | 0,370 | 0,195 | 0,187 | 0,177 | 0,160 | 0,340  | 0,239 | 0,294 | 0,225 | 0,000 |

**Tabela 4:** Índice de fixação (Fst) pairwise entre os diferentes grupos. Valores todos significativos  $P < 0.05$ . Precisa colocar legenda dos códigos na legenda da tabela. SQARG (*R. quelen*/selvagem, Corientes, Argentina), SMQ (*R. quelen*/selvagem, São Paulo), GQ (*R. quelen*/piscicultura, Gaspar, Santa Catarina), CTQ (*R. quelen*/piscicultura, C. Toledo, Paraná), UFQ (*R. quelen*/piscicultura, Rio Grande do Sul), BLQ (*R. quelen*/selvagem, Bacia do Leste, Santa Catarina), EPQ (*R. quelen*/piscicultura, Epagri, Santa Catarina), ILQ (*R. quelen*/piscicultura, Ilhota, Santa Catarina), PQ (*R. quelen*/piscicultura, Panamá, Santa Catarina), LPQ (*R. quelen*/selvagem, Lagoa do Peri, Santa Catarina), RUQ (*R. quelen*/selvagem, Alto Rio Uruguai, Santa Catarina), SQCARG (*R. quelen*/selvagem, Casilda, Argentina), PQARG (*R. quelen*/piscicultura, Casilda, Argentina), PTV (*R. voulezi*/piscicultura, C. Toledo, Paraná), IV (*R. voulezi*/selvagem, Santa Catarina), IB (*R. branneri*/selvagem, Santa Catarina).

## DISCUSSÃO

Neste estudo, foi analisada pela primeira vez a diversidade genética populacional de *Rhamdias* do sul do Brasil e norte da Argentina, provenientes de pisciculturas e selvagens, através do método ddRAD. Isso nos permitiu obter 1734 SNPs totais em 141 indivíduos selvagens e de piscicultura, representados pelo complexo de espécies *R. quelen*, *R. voulezi* e *R. branneri*.

Em um cenário onde essas espécies apresentam muitas semelhanças na forma corporal, no padrão de cores e no uso do habitat (Ribolli, 2017), além da produção indiscriminada de cruzamentos interespecíficos no cultivo, e da contaminação genética de estoques silvestres, são necessários cada vez mais estudos caracterizando a diversidade e estruturação dos grupos genéticos, além da identificação e delimitação das espécies crípticas que compõem o complexo de espécies.

Ribolli et al. (2017) identificaram, através de análise de DNA *barcode*, *R. branneri* e *R. voulezi* como duas MOTUs distintas, com indivíduos da mesma localidade que usamos neste estudo, corroborando com a reavaliação morfológica de Gravello e Shibatta (2016). *R. branneri* e *R. voulezi* são consideradas endêmicas do rio Iguaçu, porém, de acordo com Ríos et al. (2020) e Ribolli et al. (2021), é possível que a área de distribuição dessas espécies seja ampliada, uma vez que eventos de geodispersão e variância podem ter contribuído para a caracterização da diversidade e estruturação dos indivíduos ao longo dos anos. Porém, quando analisamos a diferenciação genética, as análises de discriminante e o STRUCTURE, com muitos marcadores nucleares SNPs, podemos notar que a diferenciação genética entre *R. voulezi* e *R. branneri* e indivíduos do complexo *R. quelen* de outras localidades selvagens, não é tão alta.

Portanto, a partir deste e de outros estudos que evidenciam a complexidade do gênero, é prudente considerar a possibilidade de revisão do complexo *R. quelen*, incluindo *R. voulezi* e *R. branneri*.

## Grupos - *Rhamdias* selvagens

Nesse estudo foi possível caracterizar, abrangendo grande parte do genoma, a diversidade e estrutura genética de três espécies (ainda são espécies) do gênero *Rhamdia*: complexo *R. quelen*, *R. voulezi* e *R. branneri*.

De maneira geral, os índices de heterozigosidade esperada foram maiores que os índices de heterozigosidade observada em todos os grupos selvagens, indicando deficiência de heterozigotos. A deficiência de heterozigotos é relativamente comum em populações de peixes e está associada a eventos de subdivisão populacional e endogamia (Taylor et al., 2015), e podem ser consequência da baixa inclusão de indivíduos provenientes de populações portadoras de diferentes frequências alélicas, conforme sugerido por Hartl (2020). Em estudos utilizando marcadores microssatélites os índices de heterozigosidade se mostraram semelhantes aos encontrados neste estudo, mesmo os microssatélites sendo de natureza multi-alélica (Ríos et al., 2017; Ríos et al., 2019).

Fis é o índice de desvio das proporções de Hardy-Weinberg dentro das subpopulações, onde valores positivos indicam uma deficiência de heterozigotos, e valores negativos indicam um excesso de heterozigotos em relação ao esperado EHW. Para os peixes da Bacia do Leste (BLQ), a endogamia foi corroborada com o alto valor significativo de Fis e baixo índice MAF, que indicam ocorrência de homogeneização e baixa variabilidade genética. Esse padrão também foi visto em todas as outras populações selvagem desse estudo.

No caso das *Rhamdias*, o fato de serem peixes não migradores pode explicar, em partes, os altos índices de heterozigosidade esperada, valor alto de Fis em BLQ e índices MAF mais baixos, uma vez que indivíduos não migradores são mais propensos aos efeitos do “gargalo-de-garrafa” e deriva genética (Hartl, 2020). A conexão entre a baixa dispersão de algumas espécies de peixes neotropicais

e baixa variabilidade genética já foi sugerida por vários autores (Zawadzki et al., 2005; Sofia et al., 2008; Philippsen et al., 2009; Ferreira et al., 2015; Rautenberg et al., 2022).

A baixa variabilidade pode ser explicada também pela ação antrópica, uma vez que algumas regiões coletadas incluem áreas densamente urbanizadas inclusive com barramentos, como é o caso do Rio Iguaçu (Paraná) e Rio Sapucaí-Mirim (São Paulo), rios sujeitos a várias formas de interferência antrópica em longos trechos. Os indivíduos caracterizados como *R. voulezi* e *R. branneri* (Ribolli et al. 2017) na região do Iguaçu, apresentaram índices de diversidade semelhantes aos encontrados para indivíduos do complexo *R. quelen* selvagens de outras regiões, indicando deficiência de heterozigotos. A interferência humana pode causar perdas irreversíveis na variação genética nativa, acúmulo de mutações levemente deletérias, depressão endogâmica e incapacidade das populações de responder às mudanças ambientais (Frankham, 2010; Templeton, 2011).

Embora não haja pesquisas comparativas utilizando *ddRad* em para o gênero *Rhamdia*, eventos de gargalos já foram descritos para espécies de bagres migradores resultantes da interferência humana: Coronel et al. (2004) relataram evidências de redução histórica em uma população de *P. reticulatum* (*P. fasciatum*) da Amazônia boliviana, Huergo et al. (2011) descreveram um evento de gargalo para *Brachyplatystoma capapretum* e Do Prado et al., (2018) descreveram em *P. corruscans* e *P. reticulatum*, devido à construção de barragens.

A ausência de fluxo gênico vivenciada por espécies não-migradoras é elucidada pelo alto valor do índice  $F_{st}$  *pairwise* encontrado nesse estudo, parâmetro utilizado para avaliar a diferenciação total entre grupos, que pode estar relacionado à redução da heterozigosidade em razão da deriva genética e do aumento do endocruzamento.

A maior diferenciação dentro do complexo *Rhamdia quelen* é entre SMQ x UFQ. De fato, a população de São Paulo (SMQ) é diferenciada dos outros grupos (assim como Corientes – SQARG)

quando analisamos o gráfico de componentes; esses peixes podem estar cruzando entre si, mantendo a diversidade, porém se diferenciando dos demais. Em São Paulo, a região onde os peixes foram coletados faz parte do complexo de rios tributários ao Rio Grande, onde há grande quantidade de PCHs e projetos de reintrodução de espécies. Quando feito de maneira correta, o repovoamento pode aumentar a densidade e automanutenção de populações naturais (Heggenes et al., 2006), portanto o repovoamento, nesse caso, pode ter ajudado esse grupo a diferenciar dos demais.

### Grupo - *Rhamdias* de cultivo

Em geral, os estoques cultivados têm a tendência de mostrar variabilidade genética reduzida ao longo das gerações devido à seleção artificial e um número reduzido de reprodutores na população base inicial (Li et al., 2017; Aguiar et al., 2018; Zhang et al., 2018), isso ocorre porque o cultivo busca selecionar alelos de interesse. Neste estudo, os valores de heterozigosidade esperada foram maiores que a heterozigosidade observada em todos os locais amostrados, e os valores de Fis não foram significativos, exceto para Comercial Toledo (CTQ), que mostrou um índice baixo de endogamia, mesmo com valores de MAF igualmente baixos e diferença relativamente grande entre  $H_o$  e  $H_e$ .

A população amostral CTQ que se diferenciou dos demais tanto nas análises de componentes principais, quanto de estruturação genética. Toledo está localizado no estado do Paraná, que ocupa o segundo lugar em produção de pescado no sul do país, tendo um modelo de produção definido no qual a prática do cruzamento entre indivíduos sem monitoramento genético correto é comum (Peixe BR, 2022). O índice de endogamia nesse local remete ao fato de muitas pisciculturas utilizarem indivíduos de outras fazendas para montar seu banco de reprodutores, muitas vezes sem o conhecimento genético e ecológico adequado, podendo levar à hibridização entre espécies, o que altera a dinâmica genética local (Steyer et al., 2018; Nobile et al., 2020). Essa

dinâmica pode ser evidenciada também pela baixa estruturação genética entre os indivíduos desse estudo e pelo gráfico DAPC, onde temos a diferenciação de um grupo genético, formado pelas pisciculturas EPAGRI (EPQ), Gaspar (GQ), Ilhota (ILQ) e Panamá (PQ), todas localizadas no estado de Santa Catarina.

Em estudo anterior Virmond et al., (2018) compararam a diversidade genética de *R. quelen* entre a piscicultura Gaspar e a piscicultura da EPAGRI, através de cinco marcadores microssatélites. Eles encontraram índices de endogamia (Fis) com valores negativos, evidenciando que não houve cruzamentos consanguíneos entre as subpopulações. O valor de divergência genética (Fst) foi baixo, indicando baixo nível de divergência genética nas populações e a análise AMOVA demonstrou que a maior variabilidade genética se encontra dentro das populações, sugerindo que o manejo reprodutivo adotado se mostrou adequado, uma vez que garantiu a manutenção da variabilidade genética das populações. Na realidade, a mistura de linhagens diferentes pode elevar a diversidade genética e não apenas o controle de cultivo. De fato, tal resultado foi diferente do encontrado no presente estudo; apesar dos indivíduos da EPAGRI apresentarem  $H_o$  ligeiramente menor ao  $H_e$ , mostrando que há um certo padrão uniforme de variabilidade, o MAF se mostrou baixo e o valor negativo de Fis não se mostrou significativo. A população de Gaspar também teve índice Fis negativo/não significativo, porém sua heterozigosidade esperada foi maior que a observada, indicando baixa variabilidade genética dentro da população. O mesmo padrão se nota nas pisciculturas que foram agrupadas no mesmo cluster da EPAGRI e Gaspar.

A similaridade genética entre esses grupos de cultivo da EPAGRI, pode ser justificada pela troca de indivíduos (linhagens) entre essas pisciculturas, porém, é importante avaliar como a diversidade genética pode ser mantida quando se considera a possibilidade de ocorrência de gargalos, devido à falta de variabilidade apresentada nas pisciculturas. Espécies de cultivo com baixa

diversidade genética, devido à potenciais eventos de deriva, podem ser potencialmente contaminadoras não só de outras pisciculturas, mas de ambientes selvagens (Vaini et al., 2014; Do Prado et al., 2017; Scaranto et al., 2018), uma vez que pode diminuir o poder adaptativo dos indivíduos locais ao longo dos anos. Além disso, o fato de se utilizar muitos marcadores SNPs para calcular os índices de diversidade tornam os dados muito mais confiáveis, uma vez que eles são capazes de revelar polimorfismos ocultos não detectados por outros marcadores (Liu e Cordes, 2004; Lemopoulos et al., 2019).

### O complexo *Rhamdia quelen* e a diversidade

O cruzamento natural entre indivíduos de espécies diferentes ocorre mais frequentemente em peixes e pode estar associado ao surgimento de novas linhagens evolutivas, especiação e fluxo gênico (Burke e Arnold, 2001; Abbot et al., 2013). Porém, a atividade humana, como introdução de espécies exóticas, alteração de habitat e contato com híbridos artificiais vindos do cultivo, têm alterado a dinâmica genética dos ambientes selvagens (Brennan et al., 2014; Hasselman et al., 2014; Hashimoto et al., 2014) e é considerada uma ameaça à biodiversidade genética e ecológica (Allendorf et al., 2010; Do Prado et al., 2017).

No complexo *Rhamdia* a delimitação das espécies é limitada devido à alta semelhança morfológica e possível hibridização entre elas. Esse é um dos motivos de Ribolli et al. (2021) sugerir que *R. quelen* se trata de um complexo de espécies, que necessita, urgentemente, de revisão taxonômica. As dificuldades associadas à identificação e separação de diferentes linhagens de uma espécie ou mesmo espécies diferentes morfológicamente semelhantes e utilizadas na aquicultura têm favorecido a produção e cultivo desses peixes como uma única espécie (Hashimoto et al., 2014).

Como o cultivo de *R. quelen* é feito deliberadamente sob o nome popular “jundiá”, a comercialização e produção de diferentes espécies linhagens genéticas, sem conhecimento ou caracterização genética inicial, pode ser um problema, pois resulta em cruzamentos interespecíficos, problemas com a reprodução da espécie e a contaminação dos estoques silvestres. Quando observamos o gráfico DAPC sem dois dos grupos extremos, notamos que há uma separação entre os clusters, porém tanto os indivíduos selvagens, quanto os de piscicultura ainda se mantêm muito próximos, sendo corroborado pelos índices de diversidade genética e pelo STRUCTURE. De acordo com Ríos et al., 2017 e Scaranto et al., 2018, indivíduos do complexo *R. quelen* podem estar hibridizando com *R. branneri* e *R. voulezi* não só na piscicultura, mas também na natureza, o que reforça a premissa de cruzamentos interespecíficos.

A ausência de radiação adaptativa nessas espécies, que provavelmente evoluíram em um período relativamente curto de tempo (Bermingham e Martin, 1998; Bussing, 1976, 2016; Perdices et al. 2002), aliado a eventos de vicariância e geodispersão, hibridização e à ausência de leis e regulamentações específicas para a produção do jundiá tornam o estudo do gênero *Rhamdia* muito desafiador. Aliado a isso, a soltura de híbridos na natureza tem se tornado frequente e, em alguns casos, com alta abundância de indivíduos soltos (Casimiro et al., 2018). Os registros de híbridos no ambiente natural concentram-se na região Sudeste, principalmente na bacia do alto rio Paraná e com membros da família Pimelodidae (do Prado et al., 2012; Vaini et al., 2014; Yabu et al., 2018).

Nossas análises genômicas populacionais caracterizaram a diversidade e estruturação genética do complexo *R. quelen*, *R. voulezi* e *R. branneri*, de populações selvagens e de cultivo, no sul do Brasil e norte da Argentina. Os resultados mostraram que os indivíduos possuem alta diversidade genética e estruturação semelhantes entre os cinco grupos genéticos encontrados. O resultado confirma nossa hipótese de semelhança genética entre os grupos e que troca de indivíduos entre

pisciculturas podem ter contribuído para caracterizar a baixa diversidade e índices de estruturação genética semelhantes entre os grupos.

## CONCLUSÕES

Assim conclui-se que o complexo *Rhamdia quelen* e as outras espécies aqui estudadas possuem uma certa distância genética, porém são muito relacionados entre si. Corientes, São Paulo e comercial Toledo se diferenciaram dos outros grupos, além de EPAGRI, Ilhota, Gaspar e Panamá, apesar de possuírem índices de diversidade e endogamia muito parecidos. Muitas vezes a piscicultura possui endogamia alta, mas produz peixes de qualidade, porém quando temos a introdução desses indivíduos na natureza é possível que haja contaminação genética dos estoques locais. Dessa maneira, reforçamos a importância dos estudos para entender e delimitar as espécies do gênero, além da revisão do modelo atual de aquicultura de espécies nativas.

O não monitoramento genético dos estoques, entre outras questões, aumenta o uso indiscriminado de indivíduos hibridizados e com baixa variabilidade genética no cultivo e isso se reflete nas populações selvagens, uma vez que a soltura de alevinos através de escape, ou programas de monitoramento também acabem sendo não monitorados.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABREU, J.M.S. et al. Paleogeographic influences on freshwater fish distributions in northeastern Brazil. *Journal of South American Earth Sciences*, v. 102, p. 102692, 2020.
- AGOSTINHO, A.A. et al. Migratory fishes of the Upper Paraná River. In: Carolsfeld J, Harvery B., Ross C., Baer A., editors. *Migratory Fishes of South America: Biology, Fisheries and Conservation Status*. IDRC and the World Bank, p. 19-98, 2003.
- AGUIAR, J.D.P. et al. Loss of genetic variability in the captive stocks of tambaqui, *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818), at breeding centres in Brazil, and their divergence from wild populations. *Aquaculture Research*, p. 1914-1925, 2018.
- ALBERT, J.S.; TAGLIACOLLO, V.A.; DAGOSTA, F. Diversification of Neotropical freshwater fishes. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, v. 51, p. 27-53, 2020.
- ARBELÁEZ-ROJAS, G.A. Body composition of tambaqui, *Colossoma macropomum*, and matrinxã, *Brycon cephalus*, when raised in intensive (igarape channel) and semi-intensive (pond) culture systems, v. 31, p.1059-1069, 2002.
- ARMBRUSTER, J.W. Global catfish biodiversity. In: *American Fisheries Society Symposium*. 2011. p. 15-37.
- BALDISSEROTTO B.; RADÜNZ NETO J. *Criação de Jundiá*. Santa Maria: Editora UFSM, 2004. 232p.
- BARLETTA, M. et al. Fish and aquatic habitat conservation in South America: a continental overview with emphasis on neotropical system. *Journal of fish biology*, v. 76, n. 9, p. 2118-2176, 2010.
- BERMINGHAM E.; MARTIN A.P. Comparative mtDNA phylogeography of neotropical freshwater fishes: testing shared history to infer the evolutionary landscape of lower Central America. *Molecular Ecology*, v.7, p.499-517, 1998.

- BERMINGHAM E.; MARTIN A.P. Comparative mtDNA phylogeography of neotropical freshwater fishes: testing shared history to infer the evolutionary landscape of lower Central America. *Molecular Ecology*, v.7, p.499-517, 1998.
- BERMINGHAM, E., et al. Fish biogeography and molecular clocks: perspectives from the Panamanian Isthmus. *Molecular systematics of fishes*, San Diego, p.113-128, 1997.
- BICKFORD, D. et al. Cryptic species as a window on diversity and conservation. *Trends in Ecology & Evolution*, v.22, p.148-155, 2007.
- BITTENCOURT, F. et al. The effects of L-lysine in the diet of silver catfish (*Rhamdia voulezi*) female broodstocks. *Latin american journal of aquatic research*, v. 46, n. 1, p. 176-186, 2018.
- BREDEN F.; PTACEK M.B.; RASHED M.; TAPHORN D.; FIGUEIREDO C.A. Molecular Phylogeny of the Live-Bearing Fish Genus *Poecilia* (Cyprinodontiformes: Poeciliidae), *Molecular Phylogenetics and Evolution*, v.12, p.95-104, 1999.
- BRENNAN, A.C. et al. Hybridization due to changing species distributions: adding problems or solutions to conservation of biodiversity during global change? *Evolutionary Ecology Research*, v. 16, n. 6, p. 475-491, 2015.
- BRUNEAUX, M. et al. Molecular evolutionary and population genomic analysis of the nine-spined stickleback using a modified restriction-site-associated DNA tag approach. *Molecular Ecology*, v.22, p.565-582, 2013.
- BURKE, J.M.; ARNOLD, M.L. Genetics and the fitness of hybrids. *Annual review of genetics*, v. 35, n. 1, p. 31-52, 2001.
- CAROLSFELD, J. et al. *Migratory fishes of South America*. World Fisheries Trust, Victoria, BC, 2003.
- CARVALHO, G.R.; PITCHER, T.J. *Molecular genetics in fisheries*. Springer Science & Business Media, 2012.

- CARVALHO-COSTA, L.F. et al. Molecular systematics of the neotropical shovelnose catfish genus *Pseudoplatystoma* Bleeker 1862 based on nuclear and mtDNA markers. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, v. 59, n. 1, p. 177-194, 2011.
- CATCHEN J.M.; AMORES A.; HOHENLOHE P.; CRESKO W.; POTLETHWAIT J.H. Stacks: building and genotyping Loci de novo from short-read sequences. *G3*, v.1, p.171–182, 2011.
- CHENG, S.H. et al. Genome-wide SNPs reveal complex fine scale population structure in the California market squid fishery (*Doryteuthis opalescens*). *Conservation Genetics*, v. 22, p. 97-110, 2021.
- CHING A.; CALDWELL K.S.; JUNG M.; DOLAN M.; SSMITH O.S.; TINGEY S.; MORGANTE M.; RAFALSKI A.J. SNP frequency, haplotype structure and linkage disequilibrium in elite maize inbred lines. *BMC Genomics*, v.3, 2002.
- CIEZAREK, A. et al. Whole genome resequencing data enables a targeted SNP panel for conservation and aquaculture of *Oreochromis* cichlid fishes. *Aquaculture*, v. 548, p. 737637, 2022.
- CIEZAREK, A. et al. Whole genome resequencing data enables a targeted SNP panel for conservation and aquaculture of *Oreochromis* cichlid fishes. *Aquaculture*, v. 548, p. 737637, 2022.
- COOKE, S.J.; PAUKERT, C.; HOGAN, Z. Endangered river fish: factors hindering conservation and restoration. *Endangered species research*, v. 17, n. 2, p. 179-191, 2012.
- DAGOSTA, F. CP; DE PINNA, M. The fishes of the Amazon: distribution and biogeographical patterns, with a comprehensive list of species. *Bulletin of the American Museum of Natural History*, v. 2019, n. 431, p. 1-163, 2019.
- DALCIN, M.O. Concentrado proteico de arroz na alimentação do jundiá (*Rhamdia quelen*). *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. v.1, p.306-314, 2018.

- DANTAS, H.L. et al. Genetic diversity of captive and wild threatened catfish *Pseudoplatystoma corruscans* in the São Francisco River. *Reviews in Fisheries Science*, v. 21, n. 3-4, p. 237-246, 2013.
- De LUCA, D., et al. Resolvendo complexos de espécies crípticas em protistas marinhos: redes de haplótipos filogenéticos atendem a conjuntos de dados globais de metabarcoding de DNA. *ISME J*, v.15 p.1931–1942, 2021.
- DE SORDI, M. V. Rearranjo fluvial como mecanismo de evolução do relevo em escarpas de margem passiva: Serra Geral Catarinense, Sul do Brasil. 2018.
- DÍAZ-ARCE, N.; RODRÍGUEZ-EZPELETA, N. Selecting RAD-Seq data analysis parameters for population genetics: the more the better? *Frontiers in genetics*, v. 10, p. 533, 2019.
- DIAZ-SARMIENTO, J.A.; ALVAREZ-LEÓN, Ricardo. Colombian Amazon. *South America of*, p. 303, 2003.
- DO PRADO, F.D. et al. Hybridization and genetic introgression patterns between two South American catfish along their sympatric distribution range. *Hydrobiologia*, v. 788, p. 319-343, 2017.
- DO PRADO, F.D. et al. Parallel evolution and adaptation to environmental factors in a marine flatfish: Implications for fisheries and aquaculture management of the turbot (*Scophthalmus maximus*). *Evolutionary Applications*, v. 11, n. 8, p. 1322-1341, 2018.
- DU Y.; JIANG H.; CHEN Y.; LI C.; ZHAO M.; WU J.; OIU Y.; LO O.; ZHANG X. Comprehensive evaluation of SNP identification with the restriction enzyme-based reduced representation library (RRL) method. *BMC Genomics*, v.13, n.77, 2012.
- EARL, Dent A.; VONHOLDT, Bridgett M. STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conservation genetics resources*, v. 4, p. 359-361, 2012.
- EVANNO, G.; REGNAUT, S.; GOUDET, J. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular ecology*, v. 14, n. 8, p. 2611-2620, 2005.

- EXCOFFIER, L.; SMOUSE, P.; QUATTRO, J. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: Application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics*, v.131, p.479–491, 1992.
- FAO. The State of World Fisheries and Aquaculture 2020. Sustainability in action, 2020.
- FERREIRA, D.G. et al. Genetic structure of a Neotropical sedentary fish revealed by AFLP, microsatellite and mtDNA markers: a case study. *Conservation Genetics*, v. 16, p. 151-166, 2015.
- FIŠER, C.; ROBINSON, C. T.; MALARD, F. Cryptic species as a window into the paradigm shift of the species concept. *Molecular Ecology*, v. 27, n. 3, p. 613-635, 2018.
- FRANKHAM, R. Challenges and opportunities of genetic approaches to biological conservation. *Biological conservation*, v. 143, n. 9, p. 1919-1927, 2010.
- GARAVELLO J.C.; SHIBATTA O. A. Reappraisal of *Rhamdia branneri* (Haseman, 1911) and *Rhamdia voulezi* (Haseman, 1911) (Siluriformes: Heptapteridae) from the rio Iguaçu with notes on their morphometry and karyotype. *Neotropical ichthyology*. V.14, n.1, 2016.
- GISBERT, E. et al. Development, nutrition, and rearing practices of relevant catfish species (Siluriformes) at early stages. *Reviews in Aquaculture*, v. 14, n. 1, p. 73-105, 2022.
- GISBERT, E. et al. Development, nutrition, and rearing practices of relevant catfish species (Siluriformes) at early stages. *Reviews in Aquaculture*, v. 14, n. 1, p. 73-105, 2022.
- GODINHO, A. L.; KYNARD, B.; GODINHO, H. P. Migration and spawning of female surubim (*Pseudoplatystoma corruscans*, Pimelodidae) in the São Francisco river, Brazil. *Environmental Biology of Fishes*, v. 80, p. 421-433, 2007.

- GUEDES, D.S. Contribuição ao estudo da sistemática e alimentação de jundiás (*Rhamdia spp*) na região central do Rio Grande do Sul (Pisces, Pimelodidae). Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - UFMS, Santa Maria, Rio Grande do Sul, p99, 1980.
- HARTL, D.L. A primer of population genetics and genomics. Oxford University Press, 2020.
- HASHIMOTO, D.T. et al. Aquaculture of Neotropical catfish hybrids: genetic strategies for conservation and management. *Carp and catfish: biology, behavior and conservation strategies*. Hauppauge, New York, Nova Science Publishers, p. 1-30, 2014.
- HASSELMAN, D. J. et al. Human disturbance causes the formation of a hybrid swarm between two naturally sympatric fish species. *Molecular ecology*, v. 23, n. 5, p. 1137-1152, 2014.
- HEGGENES, J.; RØED, K. H. Do dams increase genetic diversity in brown trout (*Salmo trutta*)? Microgeographic differentiation in a fragmented river. *Ecology of Freshwater Fish*, v. 15, n. 4, p. 366-375, 2006.
- HILSDORF, A.W.S. et al. Genetic Resources of Freshwater Neotropical Fishes. *Genetic Resources of Neotropical Fishes*, p. 119-210, 2017.
- HOEY, J.A.; ABLE, K.W.; PINSKY, M.L. Genetic decline and recovery of a demographically rebuilt fishery species. *Molecular ecology*, v. 31, n. 22, p. 5684-5698, 2022.
- HUERGO, G. M. et al. Molecular genetics as a tool for fisheries management in the Brazilian Amazon: Piraíba (*Brachyplatystoma filamentosum* and *Brachyplatystoma capapretum*) (Siluriformes: Pimelodidae) in white-water rivers. *Pan-American Journal of Aquatic Sciences*, v. 6, n. 4, p. 280-289, 2011.
- JÉZÉQUEL, C. et al. A database of freshwater fish species of the Amazon Basin. *Scientific data*, v. 7, n. 1, p. 96, 2020.

- JOSHI, R. et al. Development and validation of 58K SNP-array and high-density linkage map in Nile tilapia (*O. niloticus*). *Frontiers in genetics*, v. 9, p. 472, 2018.
- KUBITZA, F.; CAMPOS, J. L. Aquicultura no Brasil. Conquistas e Desafios. *Panorama da Aquicultura*, v. 25, n. 150, p. 11-13, 2015.
- LAYTON, K. K. S. et al. Genomic evidence of past and future climate-linked loss in a migratory Arctic fish. *Nature Climate Change*, v. 11, n. 2, p. 158-165, 2021.
- LEMOPOULOS, A. et al. Comparing RADseq and microsatellites for estimating genetic diversity and relatedness—Implications for brown trout conservation. *Ecology and Evolution*, v. 9, n. 4, p. 2106-2120, 2019.
- LÉVÊQUE, C. et al. Global diversity of fishes (Pisces) in freshwater. *Hydriobiologia*, v.595, n.1, p.545-567, 2008.
- LI, L. et al. Population genetic structure in wild and aquaculture populations of *Hemibarbus maculatus* inferred from microsatellites markers. *Aquaculture and Fisheries*, v. 2, n. 2, p. 78-83, 2017.
- LIU S.; ZHOU Z.; LU J.; SUN F.; WANG S. Generation of genome-scale gene-associated SNPs in catfish for the construction of a high-density SNP array. *BMC Genomics*, v.12, p.53, 2011.
- LIU, Z.J.; CORDES, J.F. DNA marker technologies and their applications in aquaculture genetics. *Aquaculture*, v. 238, n. 1-4, p. 1-37, 2004.
- LIU, Z.L.; CORDES, J.F. DNA marker technologies and their applications in aquaculture genetics. *Aquaculture*, v.238, p.1-37, 2004.
- MARCHIORO, M.I.; BALDISSEROTTO, B. Survival of fingerlings of the jundiá (*Rhamdia quelen* Quoy & Gaimard, 1824) to changes on water salinity. *Ciência Rural*, v. 29, p. 315-318, 1999.

- MARTIN A.P.; BERMINGHAM E. Systematics and Evolution of Lower Central American Cichlids Inferred from Analysis of Cytochrome b Gene Sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, v 9, n.2, pp192-203, 1998.
- MASTROCHIRICO-FILHO, V.A. et al. Development of a SNP linkage map and genome-wide association study for resistance to *Aeromonas hydrophila* in pacu (*Piaractus mesopotamicus*). *BMC genomics*, v. 21, p. 1-13, 2020.
- MASTROCHIRICO-FILHO, V.A. et al. SNP discovery from liver transcriptome in the fish *Piaractus mesopotamicus*. *Conservation genetics resources*, v. 8, p. 109-114, 2016.
- MAYR, E. Populations, species, and evolution: an abridgment of animal species and evolution. Harvard University Press, 1970.
- MENEZES C. et al. The influence of stocking density and food deprivation in silver catfish (*Rhamdia quelen*): A metabolic and endocrine approach. *Aquaculture*, v. 435, p.257-264, 2015.
- MORRONE, J.J. Biogeographical regionalisation of the neotropical region. *Zootaxa*, v. 3782, n. 1, p. 1–110-1–110, 2014.
- MULLIKIN J.; HUNT S.; COLE C. An SNP map of human chromosome 22. *Nature* v.407, p.516–520, 2000.
- NOBILE, A.B. et al. Status and recommendations for sustainable freshwater aquaculture in Brazil. *Reviews in Aquaculture*, v. 12, n. 3, p. 1495-1517, 2020.
- OCHOA, L.E. et al. Phylogenomic analysis of trichomycterid catfishes (Teleostei: Siluriformes) inferred from ultraconserved elements. *Scientific Reports*, v. 10, n. 1, p. 2697, 2020.
- PARRA, J. E. G. et al. Alimentação de fêmeas de Jundiá com fontes lipídicas e sua relação com o desenvolvimento embrionário e larval. *Ciência Rural*, Santa Maria, v. 38, n.7, p.2011-2017, 2018.

- PEIXE BR. ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PISCICULTURA. ANUÁRIO PEIXE BR DE PISCICULTURA, 2020. 136p.
- PEIXE BR. ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PISCICULTURA. ANUÁRIO PEIXE BR DE PISCICULTURA, 2022. 144p.
- PERDICES A., et al. Evolutionary history of the genus *Rhamdia* (Teleostei: Pimelodidae) in Central America, *Molecular Phylogenetics and Evolution*, v.25, p. 172-189, 2002.
- PHILIPSEN, J.S. et al. Genetic variability in four samples of *Neoplecostomus yapo* (Teleostei: Loricariidae) from the rio Paranapanema basin, Brazil. *Neotropical Ichthyology*, v. 7, p. 25-30, 2009.
- PIEDRAS, S.R.N. Comparison between organic and inorganic selenium employed in the diet of silver catfish (*Rhamdia quelen*) fingerlings. *Boletim do Instituto de Pesca*, v.31, n.2, p.171-174, 2018.
- PINNA, M.C.C. de Phylogenetic analysis of the Asian catfish families Sisoridae, Akysidae, and Amblycipitidae, with a hypothesis on the relationships of the neotropical Aspredinidae (Teleostei, Ostariophysi). *Fieldiana. Zoology*, n. 84, p. 1-83, 1996.
- PIO, N.L.; CARVALHO, T.P. Evidence on the paleodrainage connectivity during Pleistocene: Phylogeography of a hypoptopomatine endemic to southeastern Brazilian coastal drainages. *Neotropical Ichthyology*, v. 19, 2021.
- PRITCHARD, J.K.; STEPHENS, M.; DONNELLY, P. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, v. 155, n. 2, p. 945-959, 2000.
- RAUTENBERG, G.E. et al. Genetic Structure of a Native Neotropical Fish Species: New Insights about a South American Bioindicator. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, v. 83, n. 2, p. 168-179, 2022.

- REEVES R.G; BERMINGHAM E. Colonization, population expansion, and lineage turnover: phylogeography of Mesoamerican characiform fish, *Biological Journal of the Linnean Society*, v.88, n.2, p.235–255, 2006.
- RESENDE, E.K. Peixes Migratórios Da Bacia Do Paraguai Paraná, Excluindo a Bacia Do Alto Paraná. Peixes migratórios da América do Sul: biologia, pesca e estado de conservação. World Fisheries Trust: Vitoria, Canadá, p. 99-156, 2003.
- RIBOLLI J. et al. DNA barcoding confirms the occurrence of *Rhamdia branneri* and *Rhamdia voulezi* (Siluriformes: Heptapteridae) in the Iguazu River Basin. *Neotropical Ichthyology*, v.15, n.1, 2017.
- RIBOLLI, J. et al. Cryptic diversity and diversification processes in three cis-Andean *Rhamdia* species (Siluriformes: Heptapteridae) revealed by DNA barcoding. *Genetics and Molecular Biology*, v. 44, 2021.
- RIBOLLI, J.; ZANIBONI-FILHO, E. Individual contributions to pooled-milt fertilizations of silver catfish *Rhamdia quelen*. *Neotropical Ichthyology*, v. 7, p. 629-634, 2009.
- RÍOS, N. et al. Population genomics in *Rhamdia quelen* (Heptapteridae, Siluriformes) reveals deep divergence and adaptation in the Neotropical region. *Genes*, v. 11, n. 1, p. 109, 2020.
- RÍOS, N. et al. Species complex delimitation and patterns of population structure at different geographic scales in Neotropical silver catfish (*Rhamdia*: Heptapteridae). *Environmental Biology of Fishes*, v. 100, p. 1047-1067, 2017.
- RÍOS, N.; BOUZA, C.; GARCÍA, G. Past hybridisation and introgression erased traces of mitochondrial lineages evolution in the Neotropical silver catfish *Rhamdia quelen* (Siluriformes: Heptapteridae). *Hydrobiologia*, v. 830, p. 161-177, 2019.
- ROCHA, C.B. Phytase enzyme supplementation on performance and mineral retention in bones of silver catfish juveniles (*Rhamdia quelen*). *Boletim do Instituto de Pesca*. v.34, n.1, p.151-157, 2018.

- ROXO, F.F. et al. Phylogenomic reappraisal of the Neotropical catfish family Loricariidae (Teleostei: Siluriformes) using ultraconserved elements. *Molecular phylogenetics and evolution*, v. 135, p. 148-165, 2019.
- RUZZANTE, D.E. et al. Phylogeography and phenotypic diversification in the Patagonian fish *Percichthys trucha*: the roles of Quaternary glacial cycles and natural selection. *Biological Journal of the Linnean Society*, v. 103, n. 2, p. 514-529, 2011.
- S. CORONEL, J. et al. Differential population history in the migratory catfishes *Brachyplatystoma flavicans* and *Pseudoplatystoma fasciatum* (Pimelodidae) from the Bolivian Amazon assessed with nuclear and mitochondrial DNA markers. *Journal of fish biology*, v. 65, n. 3, p. 859-868, 2004.
- SATO, Y.; GODINHO, H.P. Migratory fishes of the São Francisco river. CAROLSFELD, J.; HARVEY, B.; ROSS, C, p. 195-232, 2003.
- SCARANTO, B.M.S.; RIBOLLI, J.; ZANIBONI-FILHO, E. DNA barcoding reveals blend of silver catfish *Rhamdia* species from fish farms in Southern Brazil. *Aquaculture Research*, v. 49, n. 5, p. 1907-1913, 2018.
- SCHENONE, N. et al. Fish-farming water quality and environmental concerns in Argentina: A regional approach. *Aquaculture International*, v.19, p.855-863, 2011.
- SEKINO, M. et al. Relatedness inferred from microsatellite genotypes as a tool for broodstock management of Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. *Aquaculture*, v. 233, n. 1-4, p. 163-172, 2004.
- SIQUEIRA, A.C. et al. Evolutionary processes underlying latitudinal differences in reef fish biodiversity. *Global Ecology and Biogeography*, v. 25, n. 12, p. 1466-1476, 2016.
- SIVASUNDAR A.; BERMINGHAM E.; ORTÍ G. Population structure and biogeography of migratory freshwater fishes (*Prochilodus*: Characiformes) in major South American rivers. *Molecular Ecology*, v.10, p.407-417, 2001.

SMITH, B.T. et al. The drivers of tropical speciation. *Nature*, v. 515, n. 7527, p. 406-409, 2014.

SOFIA, S.H. et al. Genetic diversity of *Hypostomus ancistroides* (Teleostei, Loricariidae) from an urban stream. *Genetics and Molecular Biology*, v. 31, p. 317-323, 2008.

STEYER, K. et al. Low rates of hybridization between European wildcats and domestic cats in a human-dominated landscape. *Ecology and Evolution*, v. 8, n. 4, p. 2290-2304, 2018.

STRUCK, T.H. et al. Finding evolutionary processes hidden in cryptic species. *Trends in Ecology & Evolution*, v. 33, n. 3, p. 153-163, 2018.

SULLIVAN, J.P.; LUNDBERG, J.G.; HARDMAN, M. A phylogenetic analysis of the major groups of catfishes (Teleostei: Siluriformes) using *rag1* and *rag2* nuclear gene sequences. *Molecular phylogenetics and evolution*, v. 41, n. 3, p. 636-662, 2006.

TAKAHASHI, T. et al. A ddRAD-based population genetics and phylogenetics of an endangered freshwater fish from Japan. *Conservation Genetics*, v. 21, p. 641-652, 2020.

TAYLOR, H.R. et al. Valid estimates of individual inbreeding coefficients from marker-based pedigrees are not feasible in wild populations with low allelic diversity. *Conservation Genetics*, v. 16, p. 901-913, 2015.

TEMPLETON, A.R. *Genética de populações e teoria microevolutiva*. Sociedade Brasileira de Genética, Ribeirão Preto, 2011.

TEUGELS, G.G. Taxonomy, phylogeny and biogeography of catfishes (Ostariophysi, Siluroidei): an overview. *Aquatic Living Resources*, v. 9, p. 9-34, 1996.

THOMAZ, A.T. et al. Geographic distributions, phenotypes, and phylogenetic relationships of *Phalloceros* (Cyprinodontiformes: Poeciliidae): Insights about diversification among sympatric species pools. *Molecular phylogenetics and Evolution*, v. 132, p. 265-274, 2019.

- THOMAZ, A.T. et al. Testing the effect of palaeodrainages versus habitat stability on genetic divergence in riverine systems: study of a Neotropical fish of the Brazilian coastal Atlantic Forest. *Journal of Biogeography*, v. 42, n. 12, p. 2389-2401, 2015.
- TONELLA, L.H. et al. NEOTROPICAL FRESHWATER FISHES: A dataset of occurrence and abundance of freshwater fishes in the Neotropics. 2022.
- TRONCO, A.P. Feeding of jundiá (*Rhamdia quelen*) larvae with semi-purified diets and lipid sources. *Boletim do Instituto de Pesca*, v.33, n.1, p.9-17, 2018.
- USSO, M.C., et al. Genetic and chromosomal differentiation of *Rhamdia quelen* (Siluriformes, Heptapteridae) revealed by repetitive molecular markers and DNA barcoding. *Zebrafish*, v. 16, n. 1, p. 87-97, 2019.
- VAINI, J.O. et al. Genetic identification of interspecific hybrid of Neotropical catfish species (*Pseudoplatystoma corruscans* vs. *Pseudoplatystoma reticulatum*) in rivers of Mato Grosso do Sul State, Brazil. *Neotropical Ichthyology*, v. 12, p. 635-641, 2014.
- VALLADÃO G.; GALLANI S.; PILARSKI F. South American fish for continental aquaculture. *Reviews in Aquaculture*, p.1–19, 2018.
- VAZ, B.S. et al. Sequence analysis of the growth hormone gene of the South American catfish *Rhamdia quelen*. *Genetics and Molecular Research*, v. 9, n. 4, p. 2184-2190, 2010.
- VERA, M.; ALVAREZ-DIOS, J.A.; FERNANDEZ, C.P.; BOUZA, C.; VILAS, R.; MARTINEZ, P. Development and Validation of Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) Markers from Two Transcriptome 454-Runs of Turbot (*Scophthalmus maximus*) Using High-Throughput Genotyping. *International Journal of Molecular Sciences*, v.14, p.5694-5711, 2013.

- YABU, M.H.S. et al. First record of non-native hybrid catfish *Pseudoplatystoma reticulatum* × *Leiarius marmoratus* in the Upper Paraná River basin, Brazil. *Journal of Fish Biology*, v. 92, n. 1, p. 261-267, 2018.
- YAMAMOTO, F.Y. et al. Alterations of cytochrome P450 and the occurrence of persistent organic pollutants in tilapia caged in the reservoirs of the Iguaçu River. *Environmental Pollution*, v. 240, p. 670-682, 2018.
- ZAWADZKI, C.H. et al. Allozyme relationships in hypostomines (Teleostei: Loricariidae) from the Itaipu reservoir, upper Rio Paraná basin, Brazil. *Genetica*, v. 123, n. 3, p. 271, 2005.
- ZEMPLAK, T.S. et al. Climate-induced changes to the ancestral population size of two Patagonian galaxiids: the influence of glacial cycling. *Molecular ecology*, v. 20, n. 24, p. 5280-5294, 2011.
- ZHANG, H. et al. Population genetic analysis of aquaculture salmonid populations in China using a 57K rainbow trout SNP array. *Plos one*, v. 13, n. 8, p. e0202582, 2018.