

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

**Análise da Estrutura Genética de *Brycon orbignyanus*
na Bacia do Rio Paraná para Fins de Conservação**

Fernando Yuldi Ashikaga

Botucatu

2013

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

**Análise da Estrutura Genética de *Brycon orbignyanus*
na Bacia do Rio Paraná para Fins de Conservação**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Zoologia) do Instituto de Biociências de Botucatu, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor.

Aluno: Fernando Yuldi Ashikaga

Orientador: Prof. Dr. Fausto Foresti

Botucatu

2013

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO DE AQUIS. E TRAT. DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: **ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE**

Ashikaga, Fernando Yuldi.

Análise da Estrutura Genética de *Brycon orbignyanus* na Bacia do Rio Paraná para Fins de Conservação / Fernando Y Ashikaga. - Botucatu, 2013

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Fausto Foresti

Capes: 20406029

1. Genética animal. 2. Genética de populações. 3. Vida selvagem – Conservação. 4. Biodiversidade – Conservação. 5. Peixe de água doce – Genética. 6. Brycon – Paraná, Rio, Bacia.

Palavras-chave: *Brycon orbignyanus*; Conservação; Estrutura genética; Marcadores moleculares; Variabilidade genética.

Laboratório de Biologia e Genética de Peixes

UNESP - Botucatu - SP



UNESP



Instituto de Biociências



Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo

Dedicado à minha família

Agradecimentos

De forma sucinta e direta, agradeço àqueles que constituem parte importante da minha vida, e que de forma direta e/ou indireta me auxiliaram nos passos da minha jornada, que com este trabalho, alcanço mais um dos meus objetivos.

Agradeço a Deus pelas bênçãos e milagres em minha vida.

Ao meu pai Massao, minha mãe Satiko e aos demais familiares por serem minhas primeiras e eternas referências de vida.

A minha família, constituída pela minha esposa Fernanda, meu futuro filho(a), que aguardamos apreensivos pela sua chegada e meus pets (Zuck, Amelie e Mel), os quais fazem minha vida ter sentido e por eles acordo todos os dias disposto a fazer valer a pena.

Aos meus amigos e comparsas, sejam eles de infância, de faculdade, de trabalho ou de outras origens, os quais são minha fonte de forças, alegrias e por que não: problemas! Não cito nomes pelo simples receio de esquecer de algum.

Ao meu orientador Professor Doutor Fausto Foresti, o qual admiro tanto pessoalmente quanto profissionalmente, pela oportunidade e confiança para desenvolver meu trabalho, além do conhecimento e experiência a mim transmitidos.

Ao professor Claudio Oliveira, pela orientação no desenvolvimento deste trabalho e ao CEPTA/ICMBio, na figura do Dr. José Augusto Senhorini, pela colaboração nas coletas.

Aos membros da Banca Examinadora: Dra. Iracilda Sampaio, Dr. José Augusto Senhorini, Dr. Evoy Zaniboni Filho e Dr. Luiz Henrique Garcia Pereira.

Ao programa de Pós Graduação em Zoologia e a Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP/Botucatu.

Aos órgãos de fomento a pesquisa: FAPESP e CNPq.

Resumo

A fauna de água doce no Brasil é particularmente diversa e muitas das espécies de peixes que a compõem não são encontradas naturalmente fora da América do Sul. Essa diversidade abrange um número elevado de estoques naturais, os quais vêm sofrendo sensível redução nos cursos d'água como resultado da exploração desordenada dos recursos. A piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) é uma espécie do gênero *Brycon* de grande interesse econômico, seja pela apreciação de sua carne pelo mercado consumidor ou pelo seu comportamento agressivo quando capturado em pesca esportiva, o que lhe garante um alto valor comercial. Esta espécie está distribuída na bacia do rio Paraná, realiza migrações periódicas para reprodução e alimentação e está ameaçada de extinção, sendo que na última lista das espécies da fauna brasileira ameaçada de extinção, a piracanjuba foi classificada como criticamente em perigo. A variação genética dentro de uma espécie é um conceito fundamental para a genética aplicada à ecologia e diversos autores sugerem pelo menos três razões biológicas para a preservação da variabilidade genética das populações naturais como objetivos da biologia da conservação: a perda da variabilidade pode aumentar a probabilidade de extinção através de um declínio na fecundidade e viabilidade; populações com baixos níveis de variação genética, sobre as quais a seleção natural pode operar, podem ter oportunidades reduzidas para futuras adaptações frente a mudanças evolutivas; e a preservação da variabilidade genética pode ter papel chave na identificação de unidades evolutivas significativas para a formulação de programas de conservação. É neste contexto que este estudo realizou o estudo populacional da espécie *Brycon orbignyanus*, com a utilização de marcadores moleculares microssatélites e marcadores mitocondriais D-Loop, em exemplares capturados em diferentes pontos da bacia do rio Paraná, com o

intuito de conhecer a real estrutura populacional desta espécie e contribuir para sua conservação. Paralelamente a este estudo, análises genéticas dos estoques de peixes produzidos em diferentes Estações de Pisciculturas também foram realizadas, com o intuito de verificar a compatibilidade deste plantel de peixes com os grupos nativos, os quais são alvos de ações de manejo que contemplem a reposição da ictiofauna por ações de repovoamento. Com base nos resultados obtidos, os grupos selvagens de *B.orbignyanus* na bacia do rio Paraná, mostraram-se estruturados geneticamente, sendo que os grupos coletados em tributários com piores condições ambientais (desmatamento, pesca, barramentos e poluição) foram os que apresentaram menores índices de variabilidade genética e maior estruturação populacional. Pela análise genética realizada comparando grupos selvagens e de cativeiro, foi possível observar a baixa variabilidade genética dos estoques pesqueiros produzidos pelas diferentes estações de pisciculturas e uma alta estruturação genética quando comparado aos grupos selvagens. Estes fatos nos permitem concluir que os grupos selvagens de *B.orbignyanus* na bacia do rio Paraná possuem variabilidade genética condizente a espécimes em ambiente natural, apresentam-se estruturados geneticamente em subpopulações, devem ser considerados como unidades evolutivas independentes quando forem objeto de manejo ecológico e por fim, os esforços na produção pesqueira voltada ao repovoamento são ineficientes para a produção de um plantel compatível geneticamente com grupos selvagens.

Lista de Figuras

Figura 1 - Exemplar de piracanjuba (*Brycon orbignyanus* Valenciennes 1849).. 22

Figura 2: Mapa identificando os locais de amostragem de *Brycon orbignyanus*.

a- Alto Paraná; b- Ilha Grande; c- Porto Camargo; d- Rio Ivinhema; e- Rio Paranapanema; f- Rio Sucuriú; g- Rio Verde; h- Rio Uruguai; i- Jupiá; j- CEPTA; l- Furnas; m/n- Itutinga 1 e 2; o/p- LAPAD 1 e 2 26

Figura 3: Mapa identificando os locais de amostragem de *Brycon orbignyanus*.

1- Alto Paraná; 2-Porto Camargo; 3-Paranapanema; 4-Rio Sucuriu; 5-Rio Uruguai; 6-Rio Verde; 7-Rio Ivinhema; 8-Ilha Grande 33

Figura 4: Mapa identificando os locais de amostragem de *Brycon orbignyanus*.

1- Ilha Grande; 2- Rio Ivinhema; 3- CEPTA; 4- Jupiá; 5/6- Itutinga 1 e 2; 7- Furnas; 8/9- LAPAD 1 e 2 60

Figura 5: Rede de haplótipos de *B.orbignyanus* calculada pelo método

Median-Joining. Os círculos coloridos representam os haplótipos encontrados no presente estudo. O tamanho do círculo é proporcional à quantidade de indivíduos que compartilham o mesmo haplótipo 65

Lista de Tabelas

Tabela 1: Número de amostras analisadas para cada marcador e para cada grupo amostral de <i>B.orbignyana</i>	34
Tabela 2: Sequência de nucleotídeos das repetições <i>motifs</i> , dos <i>primers</i> flanqueadores e temperatura de anelamento (Ta) para os <i>loci</i> de microssatélites analisados para <i>B.orbignyana</i>	35
Tabela 3: Dados de quatro <i>loci</i> microssatélites para cada grupo de <i>B.orbignyana</i> . N=número de indivíduos; n=número de alelos; Np=número de alelos privados; Ho= heterozigosidade observada; He= heterozigosidade esperada; FIS= índice de fixação (endogamia); HWE= teste de desequilíbrio de Hardy-Weinberg; *= P≤0,012 ajustados com a correção de Bonferroni; R= frequência de alelos nulos por <i>locus</i>	39
Tabela 4: Índices de diversidade genética intrapopulacional obtidos com marcadores microssatélites para os grupos selvagens de <i>B.orbignyana</i> . *= P≤0,012 ajustados com a correção de Bonferroni	41
Tabela 5: Análise da variância molecular (AMOVA) e FST, entre os grupos de <i>B.orbignyana</i> , com marcadores microssatélites; *P< 0,05, após correção sequencial de Bonferroni	42

Tabela 6: Índices de fixação interpopulacional (FST) par a par, entre os grupos de <i>B.orbignyana</i> , com marcadores microssatélites. *P< 0,05, após correção sequencial de Bonferroni	43
Tabela 7: Valores dos testes de neutralidade (D de Tajima e Fs de Fu) para os grupos de <i>B.orbignyana</i> , com marcadores microssatélites. *P< 0,05	43
Tabela 8: Número de indivíduos e sua distribuição dentro dos grupos de <i>B.orbignyana</i>	44
Tabela 9: Número amostral (N), diversidade nucleotídica, gênica, número de haplótipos (Nh) e número de sítios polimórficos dos grupos de <i>B.orbignyana</i> ..	47
Tabela 10: Análise da variância molecular (AMOVA) e FST, utilizando marcador mitocondrial D-Loop entre os grupos de <i>B.orbignyana</i> , *P< 0,05, após correção sequencial de Bonferroni	48
Tabela 11: Índice de fixação interpopulacional (FST) par a par, entre os grupos de <i>B.orbignyana</i> , marcadores mitocondriais D-Loop. *P< 0,05, após correção sequencial de Bonferroni	48
Tabela 12: Valores dos testes de neutralidade (D de Tajima e Fs de Fu) para os grupos de <i>B.orbignyana</i> , com marcadores mitocondriais D-Loop. *P< 0,05...	49

Tabela 13: Número amostral (N), diversidade nucleotídica, gênica, número de haplótipos (Nh) e Número de sítios polimórficos dos grupos selvagens e de cativeiro de <i>B.orbignyanus</i>	62
Tabela 14: Número de indivíduos por haplótipo e sua distribuição dentro dos grupos selvagens e de cativeiro de <i>B.orbignyanus</i>	63
Tabela 15: Análise da variância molecular (AMOVA) e FST, utilizando marcador mitocondrial D-Loop entre os grupos selvagens e de cativeiro de <i>B.orbignyanus</i> . *P< 0,05, após correção sequencial de Bonferroni	66
Tabela 16: Índices de fixação interpopulacional (FST) par a par, entre os grupos selvagens e de cativeiro de <i>B.orbignyanus</i> . P< 0,05, após correção sequencial de Bonferroni	66

Sumário

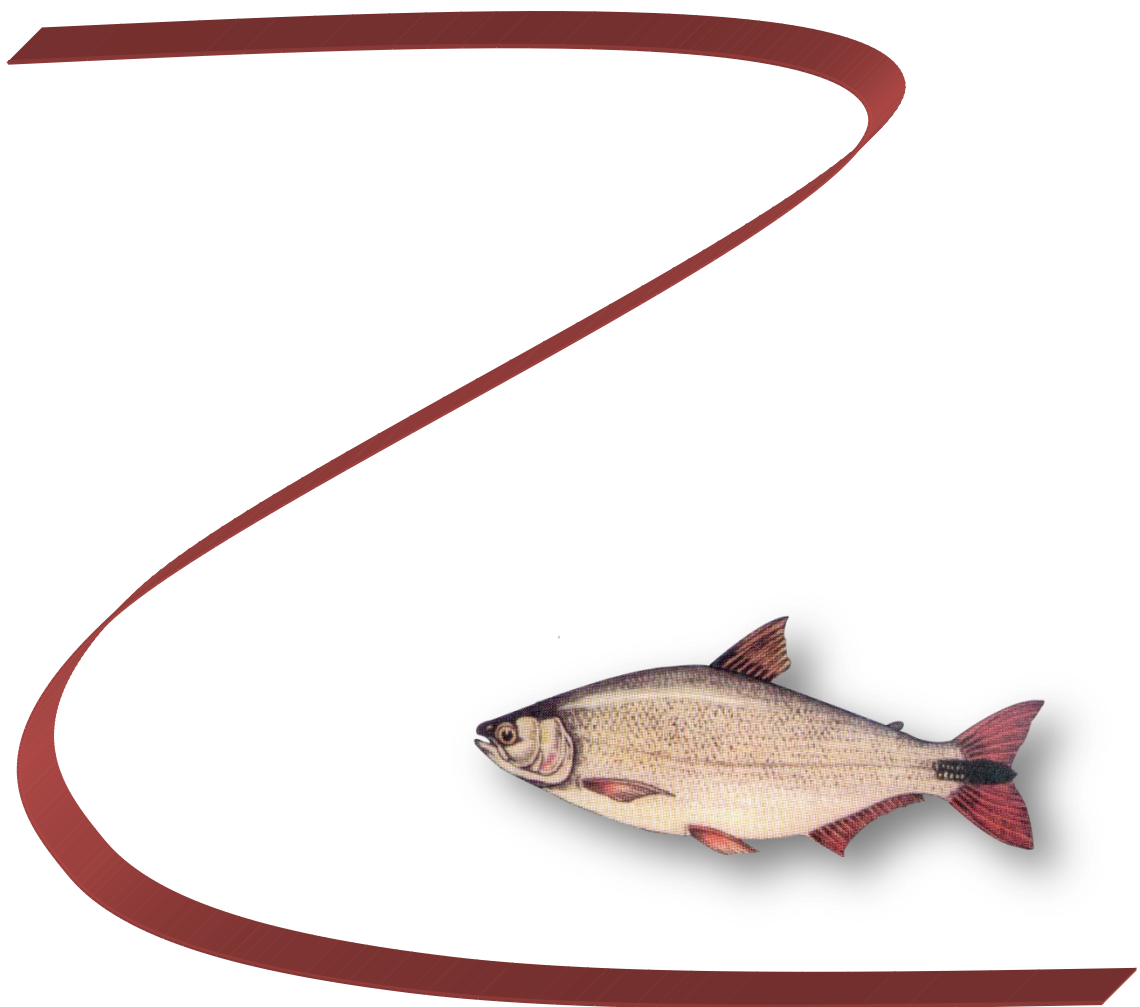
Resumo

Lista de Figuras

Lista de Tabelas

1. Introdução	15
1.1. Importância dos Peixes	15
1.2. Estratégias de Conservação	16
1.3. Marcadores Moleculares	17
1.4. Considerações sobre a Bacia do Rio Paraná, Gênero <i>Brycon</i> e <i>Brycon orbignyanus</i>	19
2. Objetivos	23
2.1. Objetivos Específicos	24
3. Materiais e Métodos	25
3.1. Coleta das Amostras	25
3.2. Extração de DNA e Amplificação das Amostras por PCR	25
3.3. Análise Estatística	27
4. Resultados	28
4.1. Capítulo I: Estrutura Populacional de <i>Brycon orbignyanus</i> na Bacia do Rio Paraná	30
4.2. Capítulo II: Restrição da Variabilidade Genética de <i>Brycon orbignyanus</i> em Cativeiro	57
5. Conclusões Gerais	72
6. Referências Gerais	74

INTRODUÇÃO



1- Introdução

1.1 - Importância dos Peixes

Os peixes estão entre os recursos naturais mundiais mais importantes, conforme destacado por Ormerod (2003) ao destacar que, se a importância econômica não é suficiente para enfatizar o valor que estes organismos representam, deve-se considerar a importância intrínseca de sua conservação como entidade biológica. Esta importância está na biodiversidade e ciclos de vida que apresentam, na ecologia comportamental, nas interações ecológicas e nas adaptações fisiológicas desenvolvidas ao longo da evolução, além da potencial utilidade que muitas espécies oferecem no manejo de ecossistemas, relacionadas ao controle de insetos vetores, manejo de vegetação invasora e em biomanipulações usadas para restaurações de sistemas aquáticos. Além disso, os peixes são reconhecidos pelo importante papel que cumprem nos processos do ecossistema, os quais incluem os diferentes níveis da cadeia trófica e a transferência de energia entre estes níveis.

Peixes e outros organismos marinhos são os únicos animais selvagens consumidos pela espécie humana em grande escala através da exploração direta de populações naturais. Assim, os problemas e as soluções encontradas na sua exploração são completamente diferentes daqueles oriundos da exploração das plantas e animais domésticos (Solé-Cava, 2001). Justamente por isso é que os estoques naturais de peixes têm sofrido sensível redução nos cursos d'água, como resultado da exploração desordenada dos recursos pela captura de indivíduos jovens, pesca predatória, falta de fiscalização e medidas protecionistas e, principalmente, pela crescente fragmentação dos rios devido à construção de empreendimentos hidrelétricos, que modificam as áreas de desova coletiva e interrompem o trajeto migratório de algumas espécies. Desta

maneira, torna-se fundamental o conhecimento da biologia e da dinâmica populacional destes animais visando a tomada de medidas racionais para a preservação dos estoques (Agostinho e Gomes, 1997; Hahn *et al.*, 1998; Hilsdorf e Petrere, 2002; Agostinho *et al.*, 2002, Marciano, 2005; Ribeiro Fº, 2006; Silva, 2006).

1.2 - Estratégias de Conservação

O manejo de recursos pesqueiros necessita de um amplo conhecimento de todos os componentes do sistema, que compreendem os próprios peixes, os ambientes e outros organismos. A interação entre esses componentes é tão forte que ações isoladas podem acarretar no fracasso dos programas (Agostinho *et al.*, 2005[a]; Agostinho *et al.*, 2005[b]). No intuito de aumentar a sobrevivência e conservação das espécies destes organismos, programas de repovoamento estão sendo utilizados com maior intensidade no Brasil (Sirol e Brito, 2006). No entanto, os resultados obtidos da aplicação deste instrumento são limitados quando não há uma orientação na aplicação de estratégias que permitam alcançar os objetivos e sua utilização eficaz, podendo resultar na perda de diversidade genética de peixes a serem soltos, constituindo uma ameaça para os ecossistemas por causarem impactos nas populações de peixes existentes (Povh, 2007). Segundo Lopera-Barreiro (2009) devido a esse motivo é necessário o desenvolvimento de manejos genéticos de progênes que direcionem os potenciais riscos genéticos para ações específicas, incluindo a seleção dos reprodutores, acasalamentos e práticas de criação e liberação. As análises genéticas em estoques de pisciculturas representam informações importantes para conseguir resultados expressivos na produção e na conservação de peixes, já que a perda de variabilidade genética é muito comum na piscicultura devido ao manejo inadequado.

Apesar dos programas de repovoamento serem aceitos pela sociedade (Sirol e Brito, 2006) e parte da comunidade científica, é primordial o seu monitoramento genético e biológico, já que o repovoamento pode representar riscos genéticos para as populações naturais e para o ecossistema, podendo conduzir uma espécie à extinção (Agostinho *et al.*, 2005[a]; Agostinho *et al.*, 2005[b]; Sonstebo *et al.*, 2007). Em adição às análises genéticas, a melhora das práticas de manejo reprodutivo deve ser também realizada, já que um manejo inadequado realizado com práticas de acasalamentos com um número insuficiente de reprodutores pode trazer problemas ao promover a perda da variabilidade genética (Aho *et al.*, 2006).

Um monitoramento eficiente é recomendável para que os efeitos de qualquer alteração ambiental de maior amplitude possam ser identificados e acompanhados, permitindo a tomada de decisões que amenizem ao máximo os impactos causados. Assim, além de estudar trechos de rios e tributários com maior abrangência e por períodos mais longos, é importante também preservar as características físicas dos ambientes, impedindo a instalação de obstáculos como grandes barragens e agentes transformadores como fontes poluidoras, que atingirão diretamente as espécies (Shibatta *et al.* 2007). O monitoramento deve ser entendido como uma etapa obrigatória que deve seguir toda ação de manejo, representada por transposição de peixes, estocagem, manipulação de habitats, controle da pesca, etc., sendo uma ferramenta indispensável de avaliação e atuando como um subsídio ao gerenciamento dos recursos naturais.

1.3 - Marcadores Moleculares

Segundo Lowe (2004), a variação genética dentro de uma espécie é um conceito fundamental para a genética aplicada à ecologia e possui três componentes: diversidade

genética, diferenciação genética e distância genética dos seus componentes. A diversidade genética mede a quantidade de variação encontrada numa população, a diferenciação genética descreve como esta variação é distribuída entre populações, enquanto a distância genética quantifica o grau de similaridade entre indivíduos ou grupos de indivíduos. Pelo menos três razões biológicas são sugeridas por Rubin *et al.* (2001) no que se refere à preservação da variabilidade genética de populações naturais como objetivo da biologia da conservação, relacionando que a perda da variabilidade pode aumentar a probabilidade de extinção, em decorrência de um declínio na fecundidade e viabilidade. Populações com baixos níveis de variação genética, sobre as quais a seleção natural pode operar, podem ter oportunidades reduzidas para futuras adaptações frente a mudanças evolutivas; e a preservação da variabilidade genética pode ter papel chave na identificação de unidades evolutivas significativas para a conservação.

O grau de identidade de uma população em relação às outras depende do nível de fluxo gênico entre elas (Futuyma, 1997), sendo este dependente da taxa de migração entre as populações. Por outro lado, a taxa de migração depende do número de populações que se encontram dentro da região, da distribuição geográfica, do padrão espacial, da distância entre elas e da habilidade de dispersão da espécie (Frankhan *et al.*, 2002). O fluxo gênico homogeniza a variação genética entre as populações (Genovart *et al.*, 2003), verificando-se que quando a taxa de fluxo gênico é baixa ou nula, os efeitos da deriva podem ser mais facilmente visíveis na diferenciação das populações (Slatkin e Barton, 1989).

A importância e expressividade dos estudos de genética das populações vêm aumentando consideravelmente nas últimas décadas. Marcadores moleculares têm sido amplamente aplicados para acessar a repartição genética entre populações

geograficamente isoladas para definir unidades evolutivas significativas abaixo do nível de espécie, para formulação de propostas de manejo e conservação e para revisar tradicionais designações de espécies e subespécies (Dantas, 2007). De acordo com Perez-Sweeney *et al.* (2003), avaliações da estrutura populacional proporcionam um retrato genético das populações, fornecendo estimativas do grau de endogamia, diversidade genética e diferenciação entre os espécimes. Estes dados quando associados ao conhecimento de atributos como o tamanho efetivo da população, fluxo gênico e sistemas de acasalamento são particularmente importantes no delineamento das ações de manejo a serem adotadas.

O conhecimento prévio da distribuição da diversidade genética dentro e entre populações de uma espécie obtida por meio da aplicação de marcadores moleculares é uma etapa inicial importante para o desenvolvimento de programas de manejo e conservação *in situ* e de empreendimentos que visem à sua reestruturação. Para isso deve-se levar em conta se uma espécie está representada apenas por uma população, ou se é composta por populações geneticamente diferenciadas e distribuídas pela área de ocorrência, devendo ser conhecido o grau de interação entre elas. No caso de peixes de água doce, as populações em geral se distribuem por locais isolados, o que pode minimizar as trocas gênicas entre elas, levando a processos de diferenciação genética (Hiltsdorf e Petrere, 2002).

1.4 - Considerações sobre a Bacia do Rio Paraná, sobre o gênero *Brycon* e sobre *Brycon orbignyianus*

O Rio Paraná, principal rio da bacia do Prata, é o décimo maior rio do mundo em descarga de água ($50.10^8 \text{ m}^3 \text{ ano}^{-1}$) e o quarto em área de drenagem (28.10^6 km^2), drenando toda a região centro-sul da América do Sul, desde as encostas dos Andes até a

Serra do Mar, nas proximidades da costa atlântica. Por drenar as regiões mais populosas da América do Sul, os ambientes aquáticos dessa bacia têm sido seriamente afetados pela atividade antrópica. Dentre os impactos mais comuns deste processo destacam-se as elevadas cargas de biocidas e nutrientes devido a emissão de esgotos domésticos, industriais e atividade agrícola, o desmatamento da vegetação marginal e, principalmente a construção de barragens, que tem suprimido trechos lóticos e amplas áreas alagáveis do Rio Paraná e de seus principais tributários (Agostinho e Gomes, 2005).

O gênero *Brycon*, componente da família Characidae, compreende 75 espécies nominais de peixes de médio a grande porte, distribuídos desde o sul do México até o Rio da Prata, na Argentina, e nos rios da América do Sul transandina, da Colômbia até o extremo norte do Peru. Dentre estas espécies nominais, 43 foram descritas com sua localidade típica nos rios da América do Sul cisandina, ocorrendo nesta região da bacia do Rio Orinoco, rios guianenses e da bacia amazônica, incluindo os rio Tocantins e Capim, até a bacia platina e nos rios do leste brasileiro, do Rio São Francisco ao Rio Paraíba do Sul (Lima, 2001). Constituem o gênero *Brycon* peixes de médio a grande porte, com exemplares adultos variando entre 15 a 70 centímetros de comprimento padrão, que habitam rios e ambientes aquáticos associados, como lagos marginais e planícies de inundação, principalmente em regiões florestadas. Espécies de *Brycon* vivem geralmente em pequenos cardumes, tendo uma dieta omnívora que inclui frutos, sementes, flores, insetos, peixes e mesmo pequenos vertebrados (Lima e Castro, 2000). Realizam migrações reprodutivas bastante extensas já identificadas em pelo menos dois casos, *Brycon orbignyianus* e *Brycon amazonicus*. (Godoy, 1975; Goulding, 1980).

Segundo a revisão feita por Lima (2001), as espécies do gênero *Brycon* são amplamente utilizadas como alimento em toda sua área de distribuição, sendo também

alvo bastante procurado pela pesca profissional e esportiva. Atualmente diferentes espécies deste gênero vêm sendo cultivadas no Brasil, Venezuela e Peru e, como reflexo de sua popularidade. As espécies do gênero *Brycon* recebem diversos nomes populares ao longo de sua área de distribuição, sendo conhecidas como matrinxã, jatuarana, piabanha, piraputanga, piracanjuba, pirapitinga e vermelha.

A piracanjuba, *Brycon orbignyanus* Valenciennes, 1849 (Figura 1) é uma espécie reofílica encontrada nos componentes da bacia do Paraná-Uruguai, principalmente nos rios Grande e Paraná (Castagnolli, 1992), podendo ser encontrada também em canais e lagoas associadas aos vales dos grandes rios (Agostinho *et al.*, 1997). É uma espécie onívora, alimentando-se eventualmente de peixes e insetos. O macho reproduz-se a partir de dois anos de idade, com 20 cm de comprimento, apresentando perceptível aspereza na nadadeira anal como característica sexual secundária, resultante de pequenas espículas que aparecem na época da reprodução. Nas fêmeas, a reprodução ocorre a partir do terceiro ano de idade, quando os exemplares atingem cerca de 25 cm de comprimento (Vaz *et al.*, 2000). A piracanjuba apresenta coloração levemente alaranjada e cauda vermelha com uma faixa preta iniciada no pedúnculo caudal (Figura 2). Esta espécie é sensível a mudanças dinâmicas da água, tendo sua sobrevivência ameaçada pela escassez de alimento alóctone (Cecílio *et al.*, 1997).

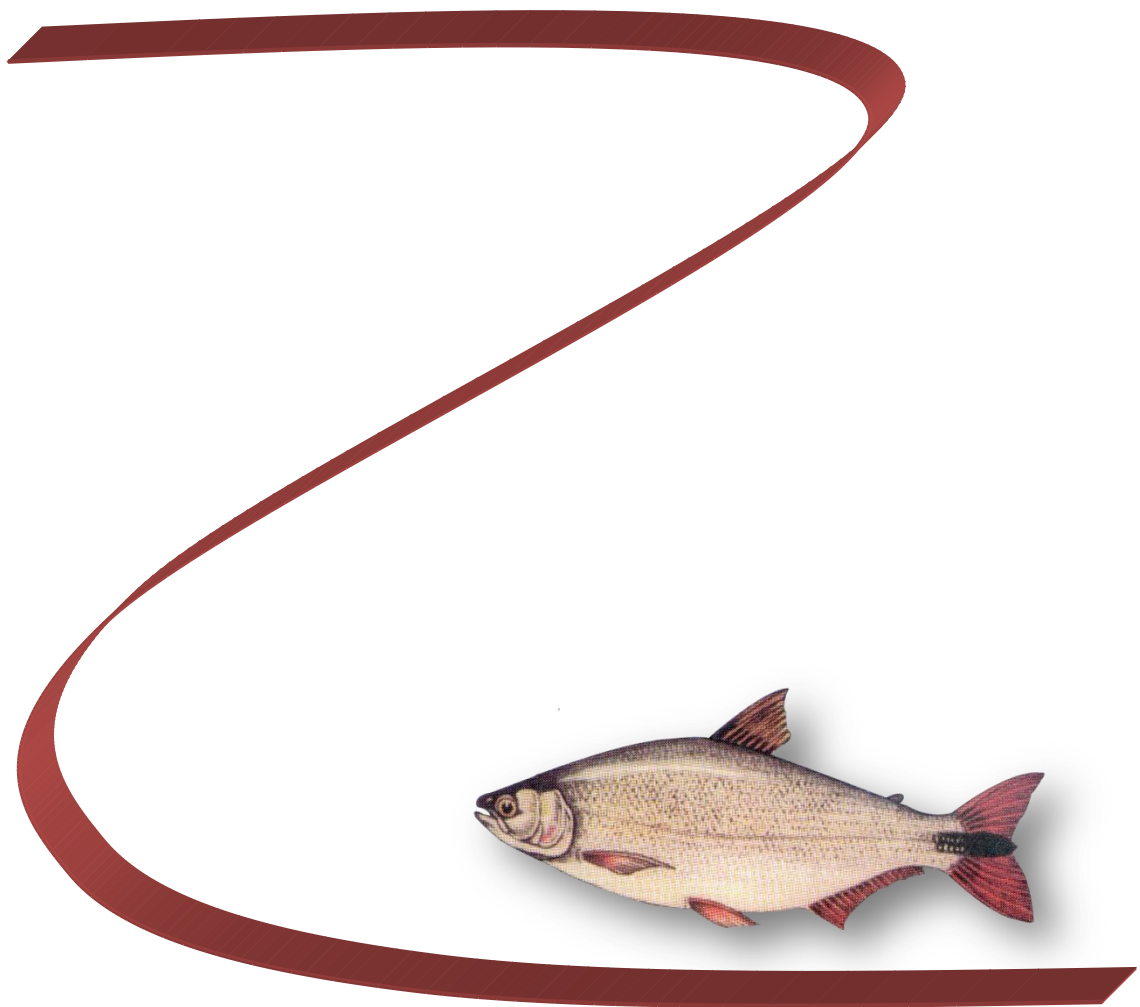


Figura 1 - Exemplar de piracanjuba (*Brycon orbignyianus* Valenciennes 1849).

A espécie realiza deslocamentos migratórios reprodutivos. No baixo Rio Paraná e Rio Uruguai, na Argentina e Uruguai, *B. orbignyianus* migra em direção descendente nos rios em outubro e em direção ascendente em março, quando as águas começam a esfriar. A reprodução nessa região se dá entre dezembro e janeiro (Ringuelet *et al*, 1967). Contudo, de modo oposto ao que acontece no baixo Paraná e Rio Uruguai, no alto Paraná a migração reprodutiva é empreendida pela movimentação rio acima, sendo que, após a reprodução os indivíduos descem o rio, podendo se afastar bastante do sítio reprodutivo (Lima, 2001).

Sendo esta espécie muito sensível às degradações ambientais, ao mesmo tempo em que está sendo superexplorada nas pescarias comerciais e esportivas, a piracanjuba encontra-se extinta ou altamente deplecionada em vários rios da bacia do Prata (Godoy, 1975). Dentre as espécies brasileiras de água doce, a piracanjuba é uma das mais prejudicadas com o barramento dos rios, estando sujeita a um rápido processo de extinção (Paiva, 1982).

OBJETIVOS



2- Objetivos

O conhecimento da estrutura genética das espécies selvagens de peixes é extremamente valioso para a definição de políticas de conservação, principalmente considerando que várias destas espécies são de grande interesse econômico e comercial, bem como pelo fato de já estarem, de alguma forma, em processos de diminuição populacional. A piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) é uma espécie que realiza migrações periódicas para reprodução ou para alimentação, sendo muito apreciadas pela qualidade da carne e pelo comportamento agressivo desejável na pesca esportiva, razões que lhe garantem alto valor comercial. Tendo em vista o cenário de fragmentação dos rios da bacia do Paraná, o desmatamento de matas ciliares pela exploração agrícola, a crescente degradação dos ambientes, a prática de pesca comercial e esportiva na região aliadas à falta de fiscalização e controle, torna-se necessário um estudo detalhado da estrutura populacional desta espécie de peixes nesta região, para que medidas conservacionistas possam ser tomadas com o intuito de preservar esta espécie.

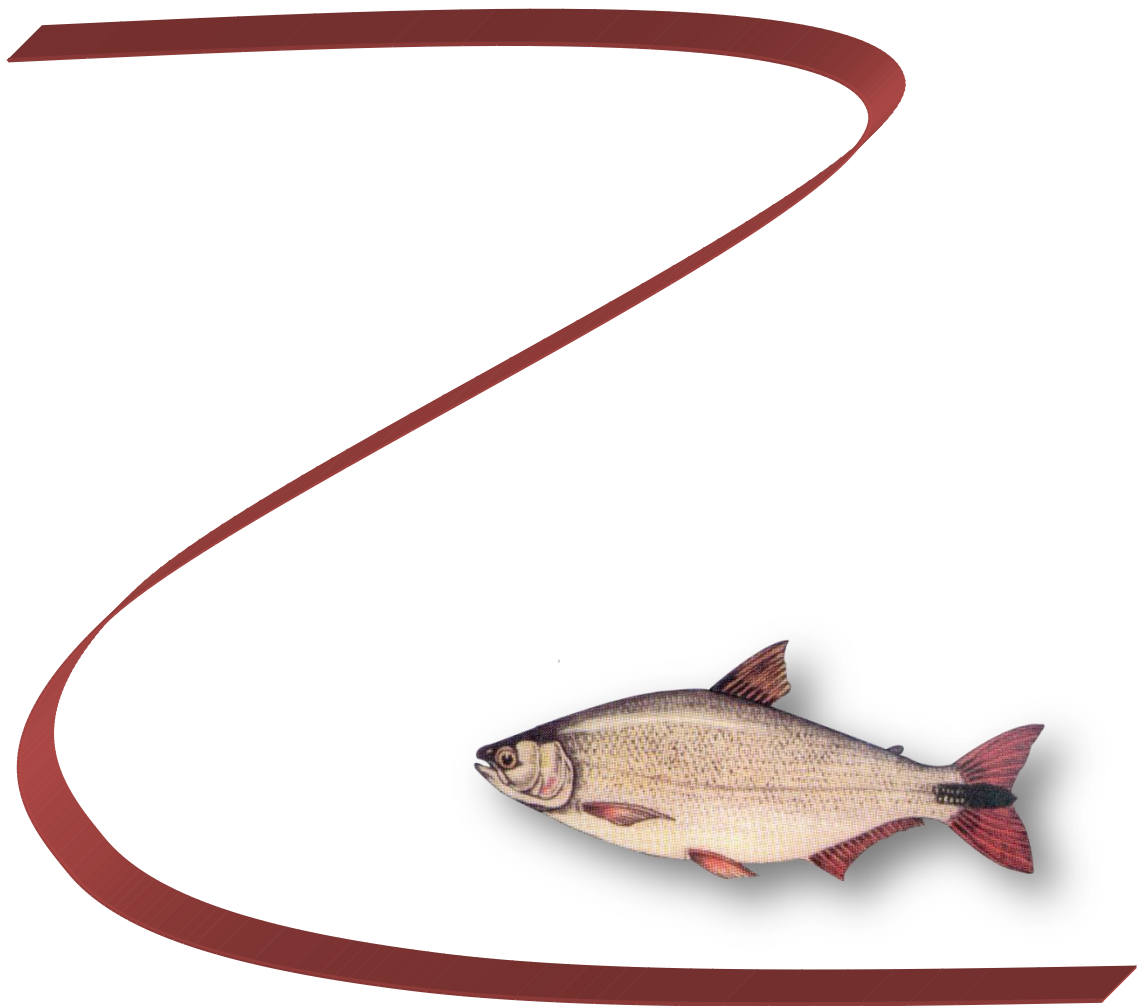
Assim, o objetivo geral deste trabalho é determinar a estrutura genética populacional de grupos selvagens de *Brycon orbignyanus*, a partir de amostras coletadas em diversos pontos da bacia do Rio Paraná, para que possam servir de subsídio para a formulação de modelos de gestão, planejamento e conservação desta espécie. Além disso, com o intuito de averiguar as diferenças genéticas existentes entre grupos de *B. orbignyanus* reproduzidos em cativeiro com grupos selvagens coletados em seu ambiente natural, pretende-se gerar informações para planos de manejo da reintrodução desta espécie de modo mais eficiente.

2.1 - Objetivos específicos

De modo específico, pretende-se:

- Realizar a análise intrapopulacional dos diferentes grupos selvagens de *Brycon orbignyianus* utilizando marcadores genéticos moleculares do tipo microssatélite e o sequenciamento da região controladora do DNA mitocondrial (D-Loop), como forma de quantificação da variabilidade genética;
- Realizar a análise interpopulacional nos diferentes grupos selvagens de *Brycon orbignyianus* utilizando marcadores genéticos moleculares do tipo microssatélite e o sequenciamento da região controladora do DNA mitocondrial (D-Loop), para a determinação da estrutura genética populacional desta espécie na bacia do Rio Paraná;
- Realizar a análise intrapopulacional dos diferentes grupos de amostras das populações selvagens e de cativeiro de *Brycon orbignyianus*, utilizando o sequenciamento da região controladora do DNA mitocondrial (D-Loop), como forma de quantificação da variabilidade genética;
- Realizar a análise interpopulacional entre os diferentes grupos de *Brycon orbignyianus*, utilizando o sequenciamento da região controladora do DNA mitocondrial (D-Loop), para a determinação da estrutura genética populacional desta espécie nas diferentes condições, como populações selvagens e de cativeiro;
- Fornecer subsídios para a formação de bancos genéticos naturais da espécie que poderão ser utilizados em propostas visando à preservação do potencial genético das populações selvagens de espécies nativas de peixes nas áreas biogeográficas onde estas populações já existam naturalmente e estejam historicamente adaptadas;
- Fornecer subsídios para direcionar planos de manejo mais eficientes, gerando informações que possam capacitar a produção de peixes em cativeiro como uma ferramenta eficaz para a conservação da fauna nativa.

MATERIAIS E MÉTODOS



3- Materiais e Métodos

3.1 - Coleta das Amostras

As coletas de amostras de indivíduos dos grupos selvagens de *Brycon orbignyianus* foram realizadas em localidades situadas ao longo do Rio Paraná (Figura 2) e também em pontos situados nos seus principais afluentes, buscando quando possível, obter amostragem de aproximadamente 30 indivíduos para cada ponto de coleta. Para obtenção das amostras, apenas um fragmento da nadadeira adiposa de cada exemplar foi retirado e conservado em álcool para realização das análises genéticas em laboratório, sendo tomados os devidos cuidados para manter a integridade dos indivíduos amostrados na tentativa de devolvê-los vivos ao ambiente. Esta mesma metodologia de coleta tecidual foi realizada para a amostragem dos espécimes dos grupos mantidos em cativeiro, sendo que amostras de plantéis de peixes foram coletadas em diferentes Estações de Piscicultura (Figura 2).

O número amostral e o número de grupos analisados serão detalhados na descrição de dois capítulos relacionados em Resultados, que foram denominados “Estrutura Populacional de *Brycon orbignyianus* na Bacia do Rio Paraná” e “Restrição da Variabilidade Genética de *Brycon orbignyianus* em Cativeiro”.

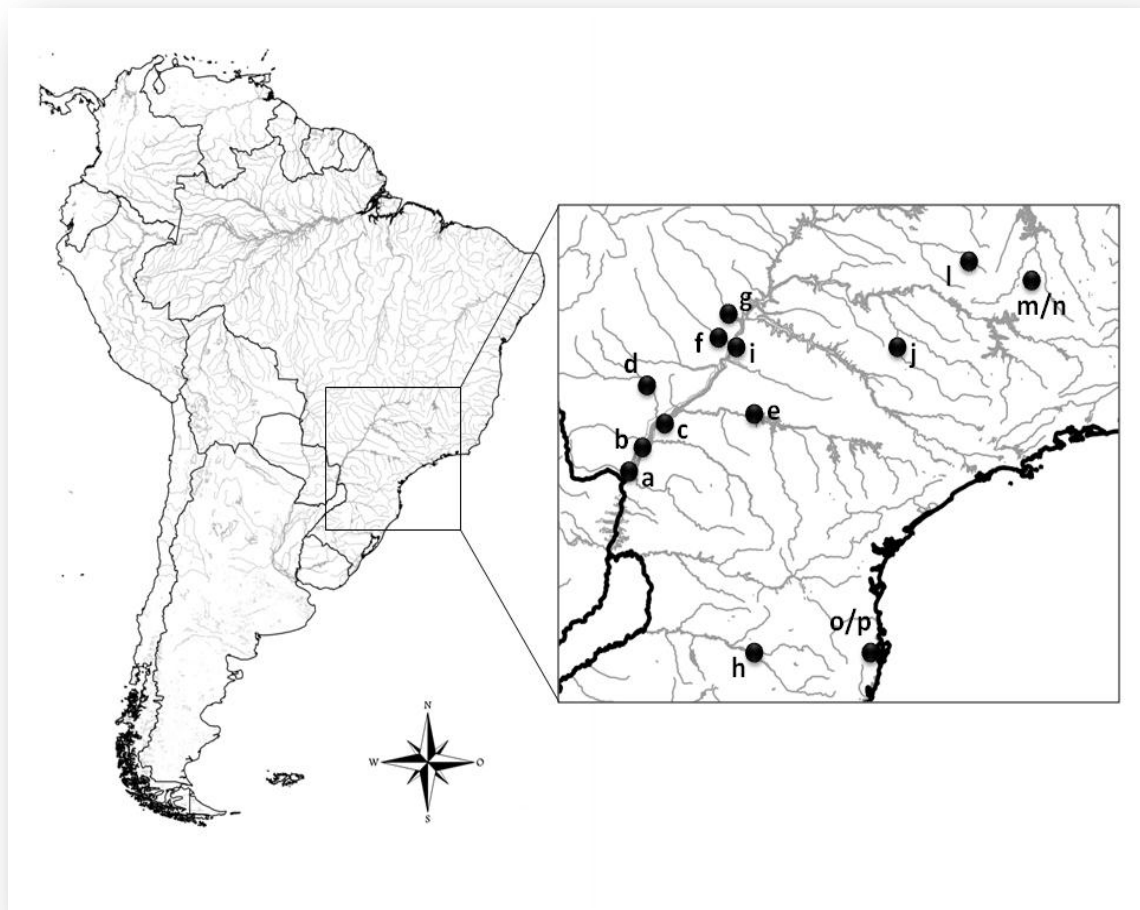
3.2 - Extração de DNA e Amplificação das Amostras por PCR

A extração do DNA total seguiu o protocolo de extração proposto por Aljanabi e Martinez (1997), sendo que eventualmente também foi utilizado o kit de extração Nucleospin® Tissue XS (Macherey Nagel).

Para as análises com marcadores microssatélites, foram utilizados *loci* descritos na literatura, nos trabalhos de Barroso et. al. (2003) com a espécie *Brycon opalinus* e

Sanches e Galetti (2006) com *Brycon hilarii*. As reações de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) foram padronizadas para cada *locus*, sendo então os produtos submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida 10% e corados com nitrato de Prata. A genotipagem foi realizada pelo software Kodak Digital Science, com a utilização do *ladder* 10pb (Invitrogen) como marcador de peso molecular.

Figura 2: Mapa identificando os locais de amostragem de *Brycon orbignyanus*. a- Alto Paraná; b- Ilha Grande; c- Porto Camargo; d- Rio Ivinhema; e- Rio Paranapanema; f- Rio Sucuriú; g- Rio Verde; h- Rio Uruguai; i- Jupiá; j- CEPTA; l- Furnas; m/n- Itutinga 1 e 2; o/p- LAPAD 1 e 2.



Para o marcador mitocondrial (D-Loop) foi utilizado o *primer forward* descrito no trabalho de Sivasundar *et al.* (2001) para a espécie *Prochilodus lineatus* e o *primer reverse*, nomeado provisoriamente como RCR1, desenhado de região mais interna, para

amplificar um fragmento de aproximadamente 700pb. O sequenciamento da região controle foi realizada em sequenciadores automáticos ABI 3130 e ABI 3500 (Applied Biosystems) utilizando o protocolo de reação do kit DYEnamic ET Dye Terminator (Applied Biosystems). Foram sequenciados tanto os fragmentos *forward* quanto o *reverse*, sendo que as sequencias consenso foram obtidas pelo software ATGC versão 4.0.

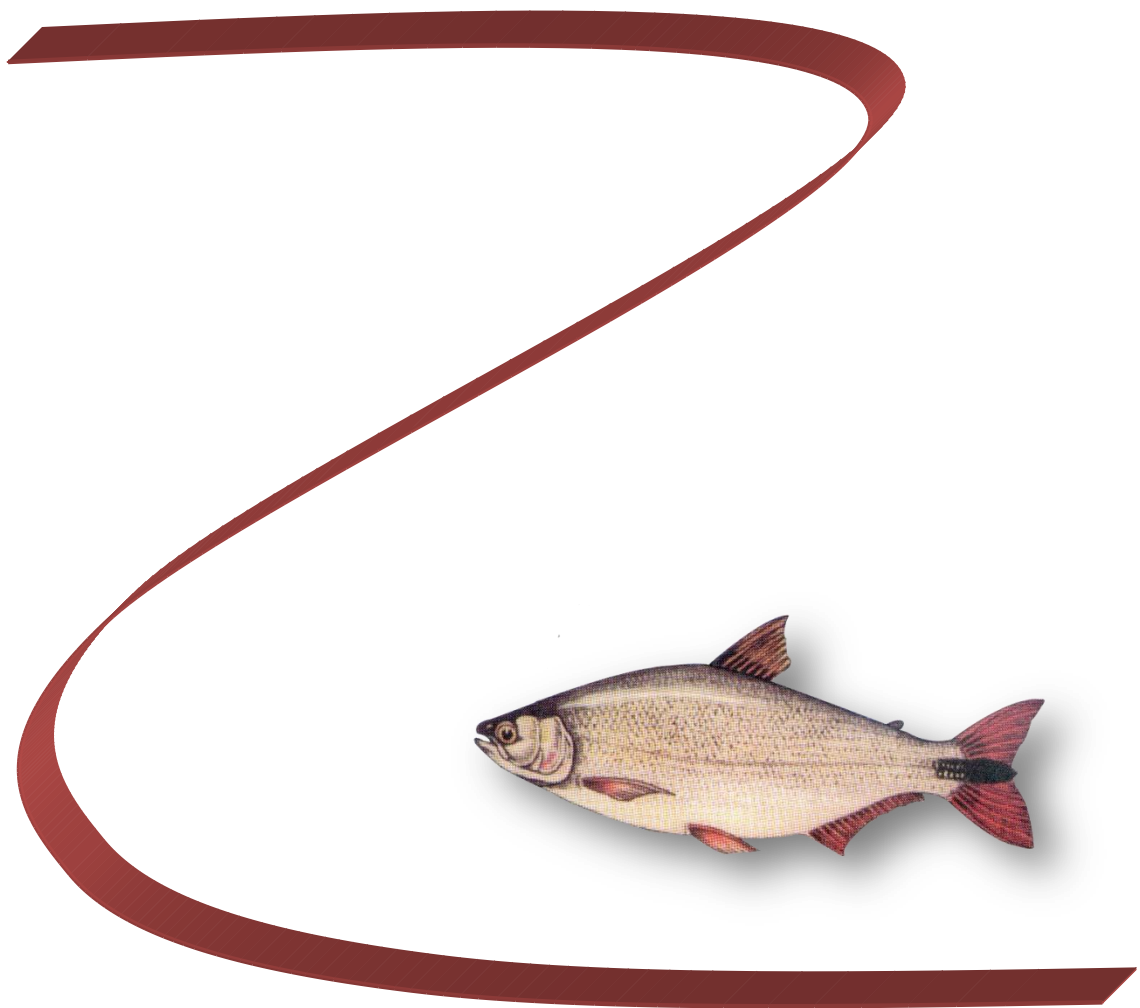
3.3 - Análise Estatística

De forma geral, as análises estatísticas foram realizadas com o intuito de averiguar tanto a variabilidade genética dentro dos grupos quanto sua distribuição dentro de uma população, visando identificar indícios de possível estruturação populacional entre os grupos analisados.

Nas análises realizadas com marcadores microssatélites, foram utilizados os softwares: Genalex 6.1 (Peakall e Smouse 2006), Arlequin 3.1 (Excoffier *et al.* 2005) e Microchecker 2.2.1 (van Oosterhout *et al.* 2004), para estimar parâmetros de variabilidade genética (número total de alelos, alelos privados, heterozigosidade esperada e observada) e de estrutura genética (índice de fixação intra e interpopulacionais, análise de variância molecular, teste exato de desequilíbrio de Hardy-Weinberg e o teste de neutralidade).

Para as análises do marcador mitocondrial D-Loop, as sequências foram alinhadas e editadas pelo software Bioedit Sequence Alignment Editor (Hall 1999) para então serem utilizados os softwares DNAsp Sequence Polymorphism (Rozas *et al.* 2003) e Arlequin 3.1 (Excoffier *et al.* 2005), para as estimativas de variabilidade (número de haplótipos, número de sítios polimórficos, diversidade gênica e nucleotídica) e de estrutura populacional (análise de variância molecular, teste de neutralidade e índices de fixação interpopulacionais).

RESULTADOS



4- Resultados

Os resultados decorrentes das análises genéticas realizadas nas amostras de *Brycon orbignyana* serão apresentados em dois capítulos, conforme segue:

4.1 - Capítulo I: Estrutura populacional de *Brycon orbignyana* (Characiformes, Characidae) na bacia do Rio Paraná.

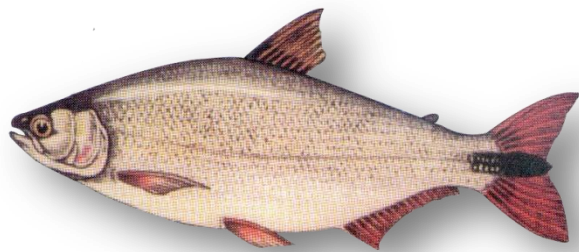
Neste capítulo foram realizadas análises genéticas em amostras de *B. orbignyana* coletados no rio Paraná e seus principais tributários. A partir das análises com marcadores do tipo microssatélites e D-Loop, foi evidenciada a existência de estruturação populacional entre os grupos analisados, sugerindo uma distribuição heterogênea da variabilidade genética. As implicações destes resultados vão desde a adoção de medidas protecionistas para garantir a integridade dos grupos remanescentes, quanto à proposição de manejo direcionado para cada região, garantindo seu sucesso ecológico.

4.2 - Capítulo II: Restrição da variabilidade genética de *Brycon orbignyana* nos estoques mantidos em cativeiro.

Este segundo capítulo traz os resultados obtidos nas análises genéticas realizadas em exemplares provenientes de estoques selvagens e de outros provenientes de estoques cultivados mantidos em cativeiro de *B. orbignyana*. Os dados fornecidos pela análise da região controladora do DNA mitocondrial (D-Loop) revelaram que a variabilidade genética dos grupos reproduzidos em cativeiro é baixa quando comparada à dos grupos

selvagens. Essa redução da variabilidade genética traz como consequência uma alta divergência populacional, tornando os grupos de cativeiro incompatíveis geneticamente com os grupos selvagens. Estes resultados devem ser considerados quando da elaboração de planos de ação que visem à conservação de *Brycon orbignyanus* na bacia do Rio Paraná.

CAPÍTULO I



4.1 - Estrutura Populacional de *Brycon orbignyana* (Characiformes, Characidae) na Bacia do Rio Paraná

Resumo

A biodiversidade de peixes de água doce é cada vez mais comprometida com o aumento da demanda de recursos, principalmente em consequência do crescimento populacional humano. Poluição, barragens hidrelétricas, sobrepesca, desmatamento e introdução de espécies exóticas estão entre os fatores antrópicos que colocam diversas espécies de peixes em risco de extinção. Tendo em vista a necessidade de preservar a biodiversidade, diversos planos de ação têm sido adotados, muitas vezes sem o respaldo de estudos científicos. Neste contexto, este estudo teve como objetivo avaliar aspectos genéticos de grupos selvagens de *Brycon orbignyana* na Bacia do Rio Paraná, uma espécie de peixe Neotropical ameaçada de extinção. Os resultados indicaram que as diferentes amostragens realizadas em localidades ao longo do Rio Paraná e de seus principais tributários, ainda apresentam índices de variabilidade genética satisfatórios. Contudo, com base na análise de variância molecular e nos índices de fixação interpopulacional, foi constatado que a população de *B. orbignyana* na Bacia do Rio Paraná encontra-se estruturada em diferentes subpopulações, de forma que futuros planos de manejo que contemplem estes locais devem considerar cada região como uma unidade evolutiva independente.

Introdução

Os peixes se apresentam como os vertebrados mais diversificados e os de maior variação genética conhecida. Existem aproximadamente 20.000 espécies de peixes descritas, sendo que a maior parte habita águas quentes dos oceanos tropicais, perfazendo um total de 40%. Os peixes de água doce são responsáveis por 20 a 25% da biodiversidade dos vertebrados e há indícios de que somente na América do Sul ocorram mais de 8.000 espécies, considerando apenas duas ordens descritas (Characiformes e Siluriformes) (Lowe-McConnel, 1999; Torres *et al.*, 2004; Chistiakov *et al.*, 2006; Nelson, 2006).

A fauna de peixes de água doce no território brasileiro é particularmente diversa e muitas das espécies que a compõem não são encontradas naturalmente fora da América do Sul. Esta diversidade contempla um número elevado de estoques naturais, os quais vêm sofrendo sensíveis reduções nos cursos d'água, como resultado da exploração desordenada dos recursos, pela captura de indivíduos jovens, pela pesca predatória, falta de fiscalização e de medidas protecionistas e, principalmente, pela crescente fragmentação dos rios devido à construção de empreendimentos hidrelétricos, que modificam as áreas de desovas coletivas e interrompem o trajeto migratório de algumas espécies. Desta maneira, torna-se fundamental o conhecimento da biologia e da dinâmica populacional destes animais para a tomada de medidas racionais na preservação dos estoques (Agostinho *et al.*, 2002; Hilsdorf e Petrere, 2002; Carolsfeld *et al.*, 2003).

A preocupação com a realização de estudos de genética de populações vem aumentando consideravelmente nas últimas décadas. Marcadores moleculares têm sido amplamente identificados e aplicados para acessar a repartição genética entre

populações geograficamente isoladas, para definir unidades evolutivas significativas abaixo do nível de espécie, para elaborar propostas de manejo e conservação e para revisar tradicionais designações de espécies e subespécies (Dantas, 2007). De acordo com Perez-Sweeney *et al.* (2003), avaliações da estrutura populacional fornecem um retrato genético das populações, fornecendo estimativas de endogamia, diversidade genética e diferenciação entre os espécimes (Chistiakov *et al.*, 2006). Estes dados, quando associados ao conhecimento de atributos como o tamanho efetivo da população, fluxo gênico e sistemas de acasalamento são particularmente importantes no delineamento das ações de manejo a serem adotadas.

Desta forma, a espécie *Brycon orbignyianus*, popularmente conhecida como piracanjuba e amplamente distribuída pela Bacia do Prata, se destaca por se apresentar especialmente sensível às modificações ambientais estabelecidas pela construção de barragens, pelo desmatamento ciliar e pelo aumento da poluição. Além disso, esta espécie é altamente explorada comercialmente, uma vez que sua carne é de grande aceitação e pela prática de pesca esportiva, o que faz com que atualmente figure na lista de espécies ameaçadas de extinção.

Tendo em vista este cenário, o presente trabalho tem como objetivo analisar aspectos genético-populacionais de *B. orbignyianus* em componentes da Bacia do Rio Paraná, de forma a averiguar se os diferentes grupos amostrados comportam-se como uma única população, sem diferenças genéticas entre os grupos, ou se apresentam de forma estruturada em diferentes subpopulações, com diferenças genéticas entre os grupos, fornecendo informações que possam servir de subsídio para a formulação de modelos de gestão, planejamento e conservação desta espécie.

Materiais e Métodos

Coleta das Amostras

As coletas de exemplares de *Brycon orbignyanus* foram realizadas ao longo do Rio Paraná e também nos seus principais afluentes, nas localidades indicadas na Figura 3 e, quando possível, foram amostrados cerca de 30 indivíduos para cada ponto de coleta (Tabela 1). Para obtenção das amostras, de cada animal é retirado apenas um pedaço da nadadeira adiposa, que é conservado em álcool para análises genéticas em laboratório, sendo tomados os devidos cuidados para manter a integridade dos indivíduos amostrados na tentativa de devolvê-los vivos ao ambiente.

Figura 3: Mapa identificando os locais de amostragem de *Brycon orbignyanus*. 1- Alto Paraná; 2- Porto Camargo; 3-Paranapanema; 4- Rio Sucuriu; 5-Rio Uruguai; 6- Rio Verde; 7- Rio Ivinhema; 8- Ilha Grande.

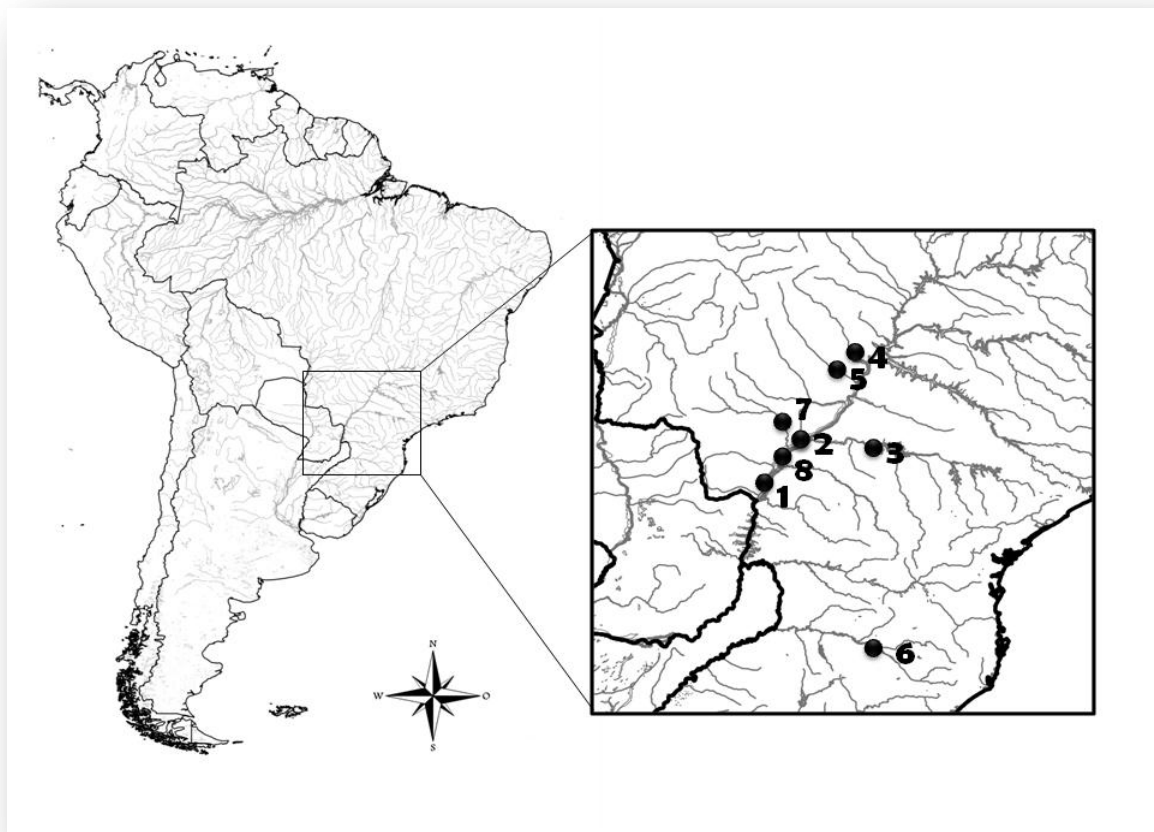


Tabela 1: Número de amostras analisadas para cada marcador e para cada grupo amostral de *B. orbignyanus*.

Grupo	Marcador	
	Microssatélite	D-Loop
1 Alto Paraná	27	22
2 Porto Camargo	20	11
3 Paranapanema	23	22
4 Rio Sucuriu	19	11
5 Rio Uruguai	24	18
6 Rio Verde	25	25
7 Rio Ivinhema	32	29
8 Ilha Grande	29	27
Total	199	165

Extração de DNA e Amplificação das Amostras por PCR

Para os estudos populacionais, o DNA total foi obtido a partir de amostras de fragmentos de nadadeiras conservados em álcool, utilizando o protocolo de extração proposto por Aljanabi e Martinez (1997) e com o kit de extração de DNA total Nucleospin® Tissue XS (Macherey Nagel).

As sequências dos *primers* utilizados para a amplificação dos *loci* de microssatélites de *B. orbignyanus* foram obtidas da literatura, segundo os trabalhos de Barroso et. al. (2003) com a espécie *Brycon opalinus* e Sanches e Galetti (2006) com *Brycon hilarii*. Em ambos os trabalhos foram descritos sete *loci* de microssatélites para as espécies estudadas, sendo que também foram realizados testes de transferabilidade para espécies mais próximas. Foram selecionados quatro *loci* polimórficos (Tabela 2) após sucessivos testes e otimizações dos protocolos de amplificação como alterações nas concentrações de DNA, *primers*, dNTP e MgCl₂, assim como modificações na temperatura de anelamento e tempo de execução de cada passo da reação de PCR.

Tabela 2: Sequência de nucleotídeos das repetições *motifs*, dos *primers* flanqueadores e temperatura de anelamento (Ta) para os *loci* de microssatélite analisados para *B. orbignyana*.

<i>loci</i>	Repetição <i>motif</i>	Sequência dos <i>Primers</i> (5'→3')	Ta (°C)
BoM6	(CA)5TA	F: GGAGTTTGTGTGTGGAGACCGAG	55
	(CA)10T(CA)4	R: GCACGCAGACACCAGA	
BoM13	(CT)11	F: CATTTCCTCAGTCCTTTTCAGC	54
		R: CCCACTTAGGGTCGCAC	
Bh5	(AC)13	F: CTTCCACTCATACCGGCACT	55
		R: ACATCTGGCATTAGGCATAG	
Bh13	(AT)7	F: AGCAATTTAAGCAAGTGAAG	53
		R: GCGTCGGAGCAGTAGTTATA	

Para análise da região controladora do DNA mitocondrial (D-Loop), foi utilizado o *primer forward* descrito no trabalho de Sivasundar *et al.* (2001) (FTTF: 5' GCCTAAGAGCATCGGTCTTGTA 3') e um *primer reverse* nomeado como RCR1 (5' CCTGAAGTAGGAACCAGATG 3'). Todas as reações de PCR foram realizadas utilizando o aparelho termociclador Veriti 96, Applied Biosystems.

Os marcadores microssatélites seguiram um protocolo geral de amplificação, sendo utilizado o volume total de 12,5µl, com 7,3µl de H₂O, 1,2 µl tampão (10X), 0,45µl MgCl₂ (50mM), 0,4µl dNTP (2mM), 0,5µl de cada *primer* (10mM), 0,1µl de Taq DNA polimerase e 2,0µl de DNA. A temperatura de anelamento dos *primers* foi adequada para cada *locus*, sendo que os programas para amplificação seguiram os seguintes passos: denaturação inicial a 95°C por 5min, 36 ciclos com denaturação da cadeia a 95°C por 30s, hibridização dos *primers* a Ta°C (Tabela 2) por 30s e extensão dos nucleotídeos a 72°C por 30s, seguido pela extensão final a 72°C por 10 min. Os

produtos de PCR foram visualizados em géis de poliacrilamida 10%, sendo a coloração realizada com nitrato de Prata e os géis fotografados e analisados utilizando o programa Kodak Digital Science, onde o peso molecular de cada alelo é determinado pela comparação com o *ladder* 10pb (Invitrogen).

Para o marcador mitocondrial D-Loop, as amplificações seguiram o protocolo descrito, com 8,25µl de H₂O, 1,25µl tampão (10X), 0,4µl MgCl₂ (50mM), 0,5µl dNTP (2mM), 0,5µl de cada *primer* (10mM), 0,1µl de Taq DNA polimerase e 1,0µl de DNA, em um volume total de 12,5µl. O programa de amplificação seguiu os seguintes passos: denaturação inicial a 95°C por 10 min, seguida de 30 ciclos com denaturação da cadeia a 95°C por 30s, hibridização dos *primers* a 54°C por 30s e extensão dos nucleotídeos a 72°C por 30s seguido pela extensão final a 72°C por 15 min. Os segmentos de DNA amplificados foram visualizados após eletroforese em gel de agarose a 1%, sendo posteriormente realizada uma purificação enzimática com o kit ExoSAP-IT®, seguindo as recomendações do fabricante. Para a reação de sequenciamento foi utilizado o kit DYEnamic ET Dye Terminator (Applied Biosystems), segundo protocolo fornecido pelo fabricante e a leitura dos fragmentos de DNA sequenciados foi realizada em sequenciadores automáticos, modelos ABI 3130 e ABI 3500 (Applied Biosystems). Para cada amostra foram obtidas sequências com os *primer forward* e *reverse*, sendo que as sequências consenso foram obtidas pelo software ATGC versão 4.0.

Análise Estatística

O software Genealex 6.1 (Peakall e Smouse 2006) foi utilizado para a determinação do número total de alelos (N_a), alelos privados (N_p) e para a exportação das matrizes utilizadas em outros programas. Os valores de heterozigosidade esperada e observada (H_e , H_o), os índices de fixação intra e interpopulacional (Wright 1978), a análise de variância molecular (AMOVA), teste exato de desequilíbrio de Hardy-

Weinberg (HWE) e o teste de neutralidade (FS de FU e D de Tajima) foram obtidas com a aplicação do software Arlequin 3.1 (Excoffier *et al.* 2005). Os níveis de significância para os testes de desequilíbrio de HWE e FST foram ajustados usando as correções de Bonferroni (Rice, 1989; Guo e Thompson, 1992), sendo a correção padrão para HWE ($P \leq \alpha/k$, onde α representa o índice de significância 0,05 e k o número de *loci*) e sequencial para índices de fixação ($P \leq \alpha/k$, onde α representa o índice de significância 0,05 e k o número de estimativas). Eventuais desvios do HWE podem ser atribuídos à presença de alelos nulos, resultantes da não amplificação de alguns alelos devido a substituições, inserções ou deleções no sítio de hibridização dos *primers*; *stutters*, representados por série de bandas causadas provavelmente pelo deslizamento da *Taq* polimerase durante a PCR; ou *dropouts*, decorrentes da presença de alelos menores amplificados com mais frequência em relação aos alelos de maior tamanho, explicados pela amplificação preferencial. Dessa forma, o software Microchecke R 2.2.1 (van Oosterhout *et al.* 2004) foi utilizado para determinar a presença destes fatores nos *loci* analisados.

Para as análises do marcador mitocondrial D-Loop, as sequências foram alinhadas e editadas pelo software Bioedit Sequence Alignment Editor (Hall, 1999), para então serem utilizados os softwares DNAsp Sequence Polymorphism (Rozas *et al.* 2003) e Arlequin 3.1 (Excoffier *et al.* 2005), que resultaram na determinação do número de haplótipos (Nh), número de sítios polimórficos (Nsp), diversidade gênica e nucleotídica, análise de variância molecular (AMOVA), teste de neutralidade (FS de FU e D de Tajima) e índices de fixação interpopulacional (FST).

Resultados

Microsatélites

No total, foram analisadas 199 amostras de *Brycon orbignyanus* divididas em oito grupos, sendo cada grupo correspondente a um local (Tabela 1). Em todos eles, a heterozigosidade esperada apresentou valores superiores aos da heterozigosidade observada, indicando um déficit de heterozigotos para todos os grupos. Os valores maiores e menores de heterozigosidade observada foram observados no *locus* Bh5 da amostra Porto Camargo (0,54894) e no *locus* BoM6 da amostra Rio Uruguai (0,12627), respectivamente. Mas, de uma forma geral, os valores de heterozigosidade observada mostraram-se satisfatórios, apresentando valores acima de 0,2, sendo que o maior valor de heterozigosidade média observada foi verificado na amostra Rio Ivinhema (0,425) e o menor na amostra Rio Sucuriu (0,203).

O número de alelos (N_a) e o número de alelos privados (N_p) foram estimados para cada *locus* e para cada amostra, sendo que a maior quantidade de alelos foi amostrada no *locus* Bh5 da amostra Alto Paraná (23) e o número de alelos privados, quando presente, não ultrapassou a um dentro de uma amostra em um *locus*. Considerando o comparativo entre grupos, o maior valor médio de alelos e o maior valor de alelos privados totais foram amostrados para a amostra do Rio Ivinhema (16,75 e 3,00 respectivamente) e o menor valor médio para a do Rio Paranapanema (8,25 e 0,0 respectivamente).

O índice de fixação intrapopulacional FIS, que fornece uma estimativa da endogamia presente em cada grupo, também foi estimado da mesma maneira que os parâmetros anteriores, de forma que o maior valor obtido foi apresentado pelo *locus* BoM13 da amostra do Rio Sucuriu (0,65465) e o menor para o *locus* BoM6 da amostra

do Alto Paraná (0,05964). Na comparação entre os grupos (Tabela 4), o maior valor de FIS foi obtido para da amostra do Rio Paranapanema (0,44552) e o menor para a de Ilha Grande (0,12910).

Como forma de testar o equilíbrio de Hardy-Weinberg, os valores significativos do teste de desequilíbrio revelam quais *locus* apresentam problemas. O teste de desequilíbrio de HWE juntamente com o teste de alelos nulos possibilitou identificar que a presença de alelos nulos em um determinado *locus* de um grupo é a causa do desequilíbrio. Conforme observado na Tabela 3, é possível constatar que os *locus* BoM6 e BoM13 das amostras dos Rios Sucuriu e Uruguai estão em desequilíbrio de HWE e apresentaram alelos nulos em sua análise.

Tabela 3: Dados de quatro *loci* microssatélites para cada grupo de *B. orbignyana*. *N* = número de indivíduos; *Na* = número de alelos; *Np* = número de alelos privados; *Ho* = heterozigiosidade observada; *He* = heterozigiosidade esperada; FIS = índice de fixação (endogamia); HWE = valores probabilísticos de concordância com o equilíbrio de Hardy-Weinberg; * = $P \leq 0,012$ ajustados com a correção de Bonferroni; *R* = frequência de alelos nulos por *locus*.

População	<i>loci</i>			
	Bh5	Bh13	BoM6	BoM13
1- Alto Paraná				
N	27	27	26	27
Na/Np	23/1	18/0	10/0	8/1
Ho	0,53545	0,41986	0,23864	0,28286
He	0,61663	0,42656	0,24682	0,35156
FIS	0,15682	0,11268	0,05964	0,40862
HWE	0,54686	0,48453	0,34683	0,10354
R				
2- Porto Camargo				
N	20	18	19	20
Na/Np	18/0	14/0	7/0	7/1
Ho	0,54894	0,29868	0,26486	0,28946

He	0,61546	0,32687	0,35498	0,40684
FIS	0,35498	0,15686	0,24686	0,32496
HWE	0,26835	0,35468	0,15684	0,04683
R				
3- Paranapanema				
N	23	23	21	23
Na/Np	12/0	10/0	5/0	6/0
Ho	0,34683	0,27656	0,18653	0,16468
He	0,51986	0,28626	0,26486	0,23546
FIS	0,57986	0,46863	0,26486	0,46876
HWE	0,04683	0,72678	0,03354	0,04866
R				
4- Rio Sucuriu				
N	19	19	19	19
Na/Np	15/0	12/0	9/0	4/0
Ho	0,28264	0,19846	0,17651	0,15676
He	0,28235	0,21668	0,34868	0,30468
FIS	0,16486	0,15766	0,35435	0,65465
HWE	0,05486	0,26835	0,01126*	0,00024*
R			0,24686	0,35264
5- Rio Uruguai				
N	21	22	24	24
Na/Np	13/0	9/0	7/0	5/0
Ho	0,31761	0,23350	0,12627	0,18385
He	0,46864	0,24700	0,23087	0,45032
FIS	0,46876	0,35468	0,36866	0,44566
HWE	0,48762	0,75646	0,00468*	0,00416*
R			0,15687	0,56762
6- Rio Verde				
N	25	25	25	25
Na/Np	21/0	18/0	13/0	8/0
Ho	0,32486	0,16846	0,16843	0,19568
He	0,36683	0,17656	0,18656	0,24863
FIS	0,12387	0,19846	0,16766	0,16566
HWE	0,35652	0,24687	0,03791	0,04986
R				

7- Rio Ivinhema				
N	32	32	31	32
Na/Np	22/1	21/1	15/0	9/1
Ho	0,51354	0,43546	0,39846	0,35486
He	0,60646	0,44656	0,42653	0,37653
FIS	0,07984	0,11268	0,08856	0,24663
HWE	0,48616	0,26863	0,87662	0,54683
R				
8- Ilha Grande				
N	29	29	29	29
Na/Np	18/0	15/0	11/0	7/0
Ho	0,41686	0,34846	0,33355	0,29863
He	0,41856	0,44686	0,36486	0,35486
FIS	0,07756	0,11452	0,14578	0,17854
HWE	0,02468	0,26686	0,01597	0,04686
R				

Tabela 4: Índices de diversidade genética intrapopulacional obtidos com marcadores microssatélites para os grupos selvagens de *B. orbignyana*. * = $P \leq 0,012$ ajustados com a correção de Bonferroni.

GRUPOS	N_a	\overline{H}_o	H_e	π_n	F_{IS}
Alto Paraná	14,75	0,369203	0,410393	0,584648	0,18444*
Porto Camargo	11,5	0,350485	0,426038	0,594864	0,27091*
Paranapanema	8,25	0,24365	0,32661	0,404656	0,44552*
Sucuriu	10,0	0,203593	0,288098	0,375366	0,33288*
Rio Uruguai	8,5	0,215308	0,349208	0,554866	0,40944*
Rio Verde	15,0	0,214358	0,244645	0,439929	0,16391*
Ivinhema	16,75	0,42558	0,46402	0,628677	0,13192*
Ilha Grande	12,75	0,349375	0,396285	0,555685	0,12910*

Pela análise de variância molecular (AMOVA) foi possível identificar que a maior fonte de variação está presente dentro dos grupos (77,438%). Apesar da maior

parte desta variação ser atribuída a variabilidade genética presente dentro de cada grupo, o valor atribuído ao índice de fixação interpopulacional ($F_{ST} = 0,22562$) é considerado alto, indicando uma alta estruturação genética entre os oito grupos selvagens amostrados (Tabela 5). Pela análise do F_{ST} par a par (Tabela 6), é possível verificar que os valores maior e menor de divergência entre dois grupos estão na comparação entre Rio Paranapanema e Ilha Grande (0,4080) e Alto Paraná e Porto Camargo (0,0038), respectivamente.

Tabela 5: Análise da variância molecular (AMOVA) e F_{ST} , entre os grupos de *B. orbignyana*, com marcadores microssatélites. * $P < 0,05$, após correção sequencial de Bonferroni.

População	Fonte de variação	Soma dos quadrados	Componentes de variação	% de variação	F_{ST}
	Entre os grupos	124,246	3,3853	21,576	0,2256*
Grupos	Entre ind. dentro de grupos	84,654	0,9641	0,986	
	Dentro de grupos	846,561	8,7834	77,438	
Total		1055,461	13,1328		

Pelo resultado do teste de neutralidade (Tabela 7), é possível identificar se um determinado grupo amostral está em processo de expansão ou declínio populacional. Valores positivos para o teste D de Tajima e F_s de Fu revelam a situação de declínio populacional, enquanto que valores negativos são interpretados como uma população em processo de expansão, desde que estes valores sejam estatisticamente significativos. Com base nesta premissa, foi possível averiguar que a maior parte dos grupos está em

expansão populacional, sendo que somente a amostra Alto Paraná apresentou um valor positivo para o teste, indicando, portanto um declínio da população. Nota-se também que em todas as amostras, em pelo menos um dos testes (Fu ou Tajima) houve valor significativo (significância de 5%).

Tabela 6: Índices de Fixação Interpopulacional (FST) par a par entre os grupos de *B. orbignyana* com marcadores microssatélites. * $P < 0,05$, após correção sequencial de Bonferroni.

	1	2	3	4	5	6	7	8
1		+	+	+	+	+	+	+
2	0,0038		+	+	+	+	+	+
3	0,2952	0,3220		-	+	+	+	+
4	0,2402	0,2414	0,0162		-	+	+	+
5	0,2844	0,2853	0,2049	0,1393		+	+	+
6	0,0668	0,0268	0,2574	0,1928	0,2280		+	+
7	0,0692	0,0280	0,1979	0,1408	0,1769	0,0439		+
8	0,0801	0,0257	0,4080	0,3484	0,3649	0,0590	0,1094	

Tabela 7: Valores dos testes de neutralidade (D de Tajima e FS de Fu) para os grupos de *B. orbignyana*, com marcadores microssatélites. * $P < 0,05$.

População	D de Tajima	Valor de P	Fs de Fu	Valor de P
Alto Paraná	0,5486	0,0354*	-0,2468	0,7654
Porto Camargo	-0,2186	0,0164*	-0,9465	0,0018*
Paranapanema	-1,0264	0,0279*	2,2256	0,6535
Rio Sucuriu	0,9556	0,4654	-1,3216	0,0014*
Rio Uruguai	-1,0564	0,0166*	0,8465	0,7654
Rio Verde	2,3583	0,3549	-6,5486	0,0015*
Ivinhema	-1,2186	0,4763	-4,5433	0,0165*
Ilha Grande	-0,3548	0,0146*	-9,3564	0,0153*

Região Controladora do DNA Mitocondrial – D-Loop

Nas análises com o marcador D-Loop, foram utilizados 165 espécimes, divididos em oito grupos. A Tabela 8 mostra a distribuição dos 80 haplótipos identificados nos grupos amostrais, sendo que o haplótipo 24 foi o mais frequente, ocorrendo em 20 indivíduos distribuídos em quatro grupos. Pelos resultados apresentados na Tabela 9 é possível notar que a amostra Rio Sucuriu apresentou o menor número de haplótipos e sítios polimórficos (quatro e 13, respectivamente) enquanto que a amostra Ilha Grande revelou os maiores valores (23 e 38, respectivamente).

Os maiores valores de diversidade gênica e nucleotídica foram detectados na amostra Porto Camargo (1,0000 e 0,1890, respectivamente), enquanto que o menor valor de diversidade gênica foi verificado na amostra Rio Uruguai (0,4052) e de diversidade nucleotídica na amostra Rio Paranapanema (0,0307).

Tabela 8: Número de indivíduos por haplótipo e sua distribuição dentro dos grupos de *B. orbignyanus*.

Haplótipos	1	2	3	4	5	6	7	8
Hap 1	2	-	-	-	-	-	-	-
Hap 2	2	-	-	-	-	-	-	-
Hap 3	4	1	-	-	-	-	-	-
Hap 4	1	-	-	-	-	-	-	-
Hap 5	1	-	-	-	-	-	-	-
Hap 6	1	-	-	-	-	-	-	-
Hap 7	1	-	-	-	-	-	-	1
Hap 8	2	-	-	-	-	-	-	-
Hap 9	1	-	-	-	-	-	2	-
Hap 10	2	-	-	-	-	-	1	2
Hap 11	4	-	9	2	-	2	-	-

Hap 12	1	-	-	-	-	1	1	4
Hap 13	-	1	-	-	-	-	-	-
Hap 14	-	1	-	-	-	1	-	-
Hap 15	-	1	-	-	-	-	-	-
Hap 16	-	1	-	-	-	-	-	-
Hap 17	-	1	-	-	-	-	-	-
Hap 18	-	1	-	-	-	-	-	-
Hap 19	-	1	-	-	-	-	-	-
Hap 20	-	1	-	-	-	1	-	-
Hap 21	-	1	-	-	-	-	-	-
Hap 22	-	1	-	-	-	-	-	-
Hap 23	-	-	1	-	-	-	-	-
Hap 24	-	-	9	6	-	3	2	-
Hap 25	-	-	3	-	-	-	-	-
Hap 26	-	-	-	2	-	-	-	-
Hap 27	-	-	-	1	-	-	-	-
Hap 28	-	-	-	-	14	-	-	-
Hap 29	-	-	-	-	1	-	-	-
Hap 30	-	-	-	-	1	-	-	-
Hap 31	-	-	-	-	1	-	-	-
Hap 32	-	-	-	-	1	-	-	-
Hap 33	-	-	-	-	-	1	-	-
Hap 34	-	-	-	-	-	1	-	-
Hap 35	-	-	-	-	-	1	1	-
Hap 36	-	-	-	-	-	1	-	-
Hap 37	-	-	-	-	-	1	-	-
Hap 38	-	-	-	-	-	1	-	-
Hap 39	-	-	-	-	-	1	-	-
Hap 40	-	-	-	-	-	1	-	-
Hap 41	-	-	-	-	-	1	-	1
Hap 42	-	-	-	-	-	1	1	-
Hap 43	-	-	-	-	-	1	-	-
Hap 44	-	-	-	-	-	1	-	1
Hap 45	-	-	-	-	-	2	-	-
Hap 46	-	-	-	-	-	1	-	-
Hap 47	-	-	-	-	-	1	-	-

Hap 48	-	-	-	-	-	1	1	-
Hap 49	-	-	-	-	-	-	4	-
Hap 50	-	-	-	-	-	-	1	-
Hap 51	-	-	-	-	-	-	1	-
Hap 52	-	-	-	-	-	-	2	-
Hap 53	-	-	-	-	-	-	1	-
Hap 54	-	-	-	-	-	-	2	-
Hap 55	-	-	-	-	-	-	1	1
Hap 56	-	-	-	-	-	-	1	-
Hap 57	-	-	-	-	-	-	1	-
Hap 58	-	-	-	-	-	-	1	-
Hap 59	-	-	-	-	-	-	1	-
Hap 60	-	-	-	-	-	-	1	-
Hap 61	-	-	-	-	-	-	1	-
Hap 62	-	-	-	-	-	-	1	-
Hap 63	-	-	-	-	-	-	1	-
Hap 64	-	-	-	-	-	-	-	1
Hap 65	-	-	-	-	-	-	-	1
Hap 66	-	-	-	-	-	-	-	1
Hap 67	-	-	-	-	-	-	-	1
Hap 68	-	-	-	-	-	-	-	1
Hap 69	-	-	-	-	-	-	-	1
Hap 70	-	-	-	-	-	-	-	1
Hap 71	-	-	-	-	-	-	-	1
Hap 72	-	-	-	-	-	-	-	1
Hap 73	-	-	-	-	-	-	-	1
Hap 74	-	-	-	-	-	-	-	1
Hap 75	-	-	-	-	-	-	-	1
Hap 76	-	-	-	-	-	-	-	1
Hap 77	-	-	-	-	-	-	-	1
Hap 78	-	-	-	-	-	-	-	1
Hap 79	-	-	-	-	-	-	-	1
Hap 80	-	-	-	-	-	-	-	1

Tabela 9: Numero amostral (N), Diversidade Nucleotídica, Diversidade Gênica, Número de Haplótipos (Nh) e Número de Sítios Polimórficos dos grupos formados pelas amostras de *B. orbignyana*.

População	N	Diversidade Gênica	Nh	Nsp	Diversidade Nucleotídica
1 Médio Paraná	22	0.9307 +/- 0.0312	12	26	0.1447 +/- 0.0775
2 Porto Camargo	11	1.0000 +/- 0.0388	11	35	0.1890 +/- 0.1049
3 Paranapanema	22	0.6753 +/- 0.0574	4	14	0.0307 +/- 0.0204
4 Rio Sucuriu	11	0.6909 +/- 0.1276	4	13	0.0472 +/- 0.0304
5 Rio Uruguai	18	0.4052 +/- 0.1428	5	18	0.0492 +/- 0.0302
6 Rio Verde	25	0.9833 +/- 0.0171	21	26	0.1412 +/- 0.0753
7 Rio Ivinhema	29	0.9754 +/- 0.0173	22	36	0.1357 +/- 0.0722
8 Ilha Grande	27	0.9801 +/- 0.0193	23	38	0.1356 +/- 0.0723

Segundo a análise de variância molecular (AMOVA) (Tabela 10), foi identificado que a maior fonte de variação está contida dentro dos grupos amostrais (76.5870%). Ainda nesta análise, foi observado que a estimativa do índice de fixação interpopulacional F_{ST} para todos os grupos foi de 0,2341, valor este suficientemente alto para indicar uma estruturação genética populacional entre os grupos. Pela análise do F_{ST} par a par (Tabela 11) foi possível identificar quais grupos são mais próximos e mais distantes entre si, sendo que o maior valor de F_{ST} foi determinado na comparação entre as amostras Rio Uruguai e Ilha Grande (0,4739) e o menor valor entre Alto Paraná e Porto Camargo (0,0049).

Tabela 10: Análise da variância molecular (AMOVA) e FST, utilizando marcador mitocondrial D-Loop entre os grupos de *B. orbignyana*. * P < 0,05, após correção sequencial de Bonferroni.

População	Fonte de variação	Soma dos quadrados	Componentes de variação	% de variação	FST
	Entre os grupos	162.198	0.9085	20.6849	0,2341*
Grupos	Entre ind. dentro de grupos	5.121	0.1198	2.7279	
	Total	695.448	4.3922		

Tabela 11: Valores obtidos para os Índices de Fixação Interpopulacional (FST) par a par, entre amostras de *B. orbignyana*, marcadores mitocondriais D-Loop. * P < 0,05, após correção sequencial de Bonferroni.

	1	2	3	4	5	6	7	8
1	0.00000	-	+	+	+	+	+	+
2	0.00498	0.00000	+	+	+	-	-	-
3	0.38340	0.41822	0.00000	-	+	+	+	+
4	0.31195	0.31360	0.02110	0.00000	+	+	+	+
5	0.36941	0.37061	0.26616	0.18093	0.00000	+	+	+
6	0.08679	0.03488	0.33440	0.25047	0.29614	0.00000	+	+
7	0.08999	0.03641	0.25703	0.18289	0.22976	0.05713	0.00000	+
8	0.10413	0.03345	0.52991	0.45251	0.47394	0.07671	0.14213	0.00000

Para este marcador, também foram realizados os testes de neutralidade de D de Tajima e Fs de Fu. Assim como os marcadores do tipo microssatélite, quase todos os grupos apresentaram valores negativos e estatisticamente significativos, indicativo de

um estado de expansão dos grupos, sendo que somente o grupo representado pela amostra Alto Paraná apresentou um valor estatisticamente não significativo (Tabela 12).

Tabela 12: Valores dos testes de neutralidade (D de Tajima e FS de Fu) para os grupos de *B. orbignyana*, com marcadores mitocondriais D-Loop. * P < 0,05.

População	D de Tajima	Valor de P	Fs de Fu	Valor de P
Médio Paraná	0.82670	0.83500	-0.13371	0.50500
Porto Camargo	-0.23586	0.41700	-3.78081	0.02600*
Paranapanema	-1.85865	0.01300*	1.69427	0.84400
Rio Sucuriu	-1.57984	0.03900*	1.62676	0.81400
Rio Uruguai	-1.68210	0.03200*	1.64121	0.82500
Rio Verde	0.85311	0.84600	-9.41046	0.00200*
Ivinhema	-0.40931	0.35400	-8.62652	0.00200*
Ilha Grande	-0.65255	0.28800	-11.98438	0.00000*

Discussão

Segundo Torres *et al.* (2004), inúmeros trabalhos foram realizados com marcadores moleculares nos últimos anos devido ao surgimento de técnicas mais resolutivas de identificação e quantificação de polimorfismos de DNA. No que diz respeito aos peixes de água doce, sendo a região Neotropical caracterizada como a mais diversificada em número de espécies e densidade populacional, a biologia molecular disponibiliza ferramentas capazes de acessar a variação molecular existente neste grupos de organismos e relacioná-la a fatores ambientais e antrópicos.

Estudos da diversidade genética de diversas espécies de peixes têm sido realizados com diferentes classes de marcadores moleculares e os resultados obtidos indicando diferentes níveis de variabilidade entre as classes de marcadores refletem um

equilíbrio entre as taxas de mutação e deriva genética. Neste sentido, as taxas de mutação para marcadores microssatélites são estimadas entre 10^{-3} e 10^{-4} por *locus* por geração, enquanto para marcadores D-loop essas taxas tem valores de 10^{-5} a 10^{-9} por *locus* por geração (Lougheed *et al.*, 2000). Com base nisso, marcadores moleculares hiper-variáveis como microssatélites e D-loop são úteis nos estudos que visam estimar a variabilidade e a estrutura genética dos componentes populacionais de uma espécie (Brown, 1986; Excoffier *et al.*, 1992).

Alguns fatores devem ser considerados para a escolha dos marcadores moleculares utilizados em um estudo genético populacional, sendo que para este estudo foram selecionados dois marcadores com características e alvos distintos (um nuclear e outro mitocondrial). Por se tratar de um marcador molecular co-dominante e apresentar alta taxa evolutiva, os microssatélites foram escolhidos para a análise da variabilidade e estrutura genética populacional dos grupos selvagens de *Brycon orbignyianus* na Bacia do Rio Paraná. Segundo Selkoe e Toonen (2006), cada *locus* microssatélite pode ser considerado uma amostra do genoma. Devido à recombinação, seleção e deriva genética, genes e regiões diferentes do genoma têm histórias genealógicas ligeiramente diferentes, sendo que o uso de um único *locus* (ou poucos) para estimar características populacionais a partir de dados genéticos pode determinar uma alta taxa de erro de amostragem. Assim, a análise de múltiplas amostras do genoma, pela combinação dos resultados de muitos *loci*, pode fornecer uma maneira mais precisa e estatisticamente mais poderosa de comparar populações e indivíduos.

Segundo Oliveira *et al.* (2006), estudos populacionais utilizando marcadores microssatélites tem sido cada vez mais utilizados, em decorrência da sua característica co-dominante e da sua alta taxa evolutiva. Porém, os custos para obtenção destes marcadores ainda são relativamente altos, o que torna um fator limitante para muitas

pesquisas. Neste contexto, uma medida alternativa que pode ser adotada é o uso de *primers* já isolados de *loci* microssatélites para espécies filogeneticamente próximas. Este processo é denominado de transferabilidade, sendo que os *primers* utilizados são ditos heterólogos. Para este estudo populacional de *B. orbignyanus* foram utilizados *primers* desenvolvidos para *loci* de *Brycon hilarii* e *Brycon opalinus*, isolados por Sanches e Galetti (2006) e Barroso *et al.* (2003), respectivamente. Os autores, além de isolarem sete *loci* de microssatélites para as respectivas espécies de estudo, também testaram o potencial de transferabilidade para outras espécies de peixes da família Bryconidae. Neste presente trabalho, foram testados todos os quatorze *loci* isolados para *B. hilarii* e *B. opalinus* em *B. orbignyanus*, com um número amostral maior e adequações no protocolo.

O marcador mitocondrial D-loop também foi utilizado para este estudo, tendo em vista sua herança materna e por apresentar maior taxa evolutiva que os demais genes mitocondriais. O *primer forward* utilizado foi o descrito no trabalho de Sivasundar (2001), desenvolvido para a espécie *Prochilodus lineatus*. A fim de se obter um fragmento menor que aquele analisado por Sivasundar, foi desenvolvido outro *primer reverse*, mais interno, cujo fragmento resultante da amplificação deste conjunto fosse uma região menor, mais fácil de ser amplificada e que ainda contemplasse a porção inicial mais polimórfica da região controladora do DNA mitocondrial (Brown, 1986; DeWoody e Avise, 2000).

A análise intrapopulacional dos grupos selvagens de *B. orbignyanus* com ambos os marcadores, proporcionou estimativas de variabilidade genética heterogênea. De forma geral, as amostras coletadas ao longo do trecho médio e alto do Rio Paraná, juntamente com aquelas coletadas de indivíduos do Rio Ivinhema, foram aquelas que apresentaram os melhores índices. Em contrapartida, as amostras coletadas nos Rios

Paranapanema, Verde, Uruguai e Sucuriu apresentaram valores baixos nas estimativas de variabilidade genética.

Tendo em vista o trabalho de DeWoody e Avise (2000), estes valores mostram-se compatíveis com aqueles obtidos para outras populações naturais, uma vez que estes autores apontam que o nível médio de variação genética dado pela \bar{H}_o em *loci* microsatélites para peixes de água doce é aproximadamente 0,54 (\pm 0,25). Estes mesmos autores ainda descrevem uma comparação da variabilidade genética com grupos de peixes marinhos, que apresentaram níveis significativamente mais altos de variação genética ($0,77 \pm 0,19$) e peixes anádromos (ex: salmão), que geralmente apresentaram valores intermediários entre populações de espécies marinhas e de água doce.

Corroborando com os dados dos marcadores microsatélites, a análise do sequenciamento da região controladora do DNA mitocondrial (D-Loop) em *B. orbignyanus* proporcionou melhores estimativas de variabilidade genética nas amostras correspondentes aos grupos coletados nos Rios Paraná e Ivinhema. Portanto, os valores de diversidade haplotípica, nucleotídica, número de haplótipos e sítios polimórficos destes grupos são superiores aos estimados nos grupos dos Rios Paranapanema, Uruguai, Verde e Sucuriu. Trabalhos como os de Martins *et al.* (2003) que mostra 32 haplótipos e diversidade haplotípica de 0,848 a 1,00 para *Leporinus elongatus* do Rio Paraná; e de Garcez *et al.* (2011) que estimou 46 haplótipos e diversidade haplotípica de 0,555 a 0,941 em *Prochilodus lineatus* do Alto Paraná, apresentam valores semelhantes aos estimados neste estudo para *B. orbignyanus*, neste caso considerando-se espécies de peixes migradores, da mesma bacia hidrográfica.

Os possíveis motivos pelos quais populações naturais apresentam uma alta taxa de diversidade genética, segundo Nei (1987), referem-se ao fato de que estas possuem

um grande tamanho populacional, heterogeneidade ambiental e características intrínsecas à história de vida das espécies, que favorecem o rápido crescimento populacional. Segundo DeWoody e Avise (2000), populações de peixes de água doce são limitadas a drenagens particulares por tempos evolutivos curtos a moderados, devendo ser, assim, menores em tamanho que muitas populações marinhas, às quais são abertas para potenciais trocas genéticas em áreas muito maiores.

A partir desta informação, diferentes amostras referentes a grupos de uma mesma espécie coletados em diferentes rios dentro de uma mesma bacia hidrográfica, podem apresentar valores discrepantes de variabilidade genética. Este fato tem sido observado de modo bastante frequente, considerando um contexto moderno de fragmentações de rios pela construção de barragens hidrelétricas. Esta poderia ser uma das possíveis causas da baixa variabilidade encontrada, visto que rios como o Paranapanema e o Uruguai apresentam inúmeras barragens hidrelétricas ao longo de seu trajeto, tornando-os ambientes totalmente fragmentados, constituindo um cenário de reservatórios em cascata. Os quatro grupos de amostras com menor variabilidade genética, que identificam tributários dos Rios Paranapanema, Uruguai, Verde e Sucuriu, apresentam ainda agravantes como uma grande atividade de pesca esportiva e profissional, grandes regiões de retirada da mata ciliar para aumento da área destinada à agropecuária, poluição das águas devido à proximidade de áreas urbanizadas, além da introdução acidental ou proposital de espécies exóticas. Estes fatores atuam no sentido de promoverem à diminuição do tamanho populacional e o isolamento geográfico, conseqüentemente influenciando na diminuição do fluxo gênico entre as subpopulações e aumentando a endogamia (Excoffier *et al.*, 1992).

Conforme Lowe *et al.* (2004), a variabilidade genética é de suma importância para uma espécie, pois a presença de variações herdáveis a torna hábil em responder à

seleção; assim, se uma espécie for portadora de expressiva variação genética, maiores serão as chances de sobrevivência e reprodução dos indivíduos sob qualquer alteração nas pressões seletivas devido a mudanças ambientais.

Quando considerada a análise inter-populacional entre amostras dos grupos selvagens de *B. orbignyana*, o valor global de F_{ST} conforme Wright (1978) apontou para uma subdivisão da população de ocorrência na bacia do Rio Paraná em diferentes subgrupos ($F_{ST}=0,2256$). Os resultados obtidos com a AMOVA mostram ainda que a maior fonte de variação é encontrada dentro dos grupos (81,4380%). O grau de estruturação populacional pode ser verificado quando são analisados os dados dos índices de fixação populacional par a par, sendo que de todas as comparações possíveis entre os grupos selvagens de *B. orbignyana*, as maiores divergências ocorreram nas comparações com as amostras dos grupos dos Rios Paranapanema, Sucuriu e Uruguai. Em contrapartida, as amostras correspondentes aos grupos coletados ao longo do Rio Paraná (Alto Paraná, Porto Camargo e Ilha Grande) apresentaram os menores valores de F_{ST} par a par, indicando uma proximidade genética entre os indivíduos destes três grupos.

Segundo Rice *et al.* (2008), tributários desempenham importantes funções dentro de uma bacia hidrográfica, fornecendo habitats únicos e suporte a funções ecológicas importantes. Este fato poderia explicar os valores encontrados de estruturação genética estimada para os diferentes afluentes do Rio Paraná, visto que seus tributários apresentam fatores bióticos e abióticos próprios, dando condições e gerando pressões seletivas distintas para cada grupo. Da mesma forma, poderia justificar a baixa estruturação genética populacional encontrada entre as amostras referentes aos grupos Alto Paraná, Porto Camargo e Ilha Grande, uma vez que estes pontos de coleta encontram-se ao longo do Rio Paraná, em um trecho livre de barreiras.

Em trabalhos de Matsumoto e Hilsdorf (2009) com *Brycon insignis* e de Barroca *et al.* (2012) com *Prochilodus costatus* e *Prochilodus argenteus*, foi identificado um alto grau de variabilidade genética e a presença de estruturação genética entre os grupos amostrados. A estruturação genética de grupos selvagens de peixes de água doce é um fato frequentemente evidenciado, muitas vezes influenciado por fatores geológicos e comportamentais (Allan e Flecker, 2003).

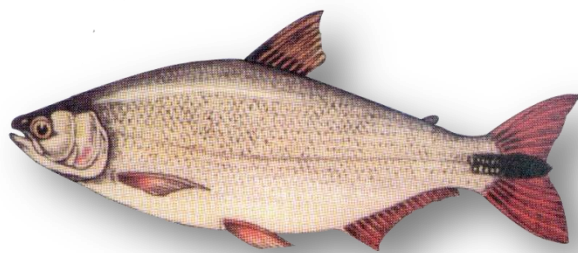
Segundo Suzuki (1999), o sucesso de ocupação e permanência das espécies num dado ecossistema está amplamente associado a um processo de reprodução bem sucedido. O sucesso reprodutivo dos grandes peixes migradores Neotropicais depende basicamente da realização de migrações anuais por longos trechos de rios, à procura de locais propícios à desova e ao desenvolvimento da prole. Deve ser ainda considerado o fato de que populações naturais em equilíbrio possuem tamanho populacional grande, de forma a diminuir a possibilidade de endocruzamento e com variabilidade genética suficiente para sua manutenção no meio ambiente. Em um cenário cada vez mais frequente de fragmentação populacional dos peixes devido ao impacto da construção de barragens hidroelétricas e à pesca predatória em diversos pontos ao longo dos rios, populações de peixes migradores que *a priori*, ao longo de um ecossistema hidrográfico livre de barreiras geográficas, manteriam uma população íntegra próxima a panmítica, com fluxo gênico constante, acasalamentos aleatórios, população grande e conseqüentemente, em equilíbrio populacional, atualmente sofrem intensa fragmentação e estruturação populacional. A falta de fiscalização, a poluição e a introdução de espécies exóticas vêm agravar este panorama, sendo que áreas propícias à desova, abrigo e alimentação são destruídas, larvas e juvenis são predados e adultos em idade reprodutiva são pescados.

Neste contexto deve ser ressaltada a importância dos estudos populacionais, com a utilização de ferramentas apropriadas e resolutivas. Os marcadores genéticos moleculares têm se mostrado apropriados para tais estudos e considera-se que sua aplicação poderá resultar em informações decisivas para a melhor compreensão da estrutura das populações e para a formulação de programas adequados de manejo e conservação das espécies de peixes.

Referências

As referências citadas neste capítulo estão listadas no tópico “Referências Gerais”, ao final do texto, juntamente com as demais utilizadas nesta tese.

CAPÍTULO II



4.2 - Restrição da Variabilidade Genética de *Brycon orbignyianus* em Cativeiro

Resumo

Populações selvagens de peixes sofrem cada vez mais com o aumento da demanda por recursos e por degradação do meio ambiente. Tendo em vista a diminuição dos estoques pesqueiros de um grande número de espécies de peixes de interesse comercial, diversas medidas mitigadoras têm sido adotadas, mas muitos equívocos são cometidos pela falta de informação prévia, seja pertinente à própria biologia das espécies ou à estrutura das populações existentes. Uma medida de manejo frequentemente adotada para refazer a composição dos ambientes comprometidos é o repovoamento de peixes com espécimes reproduzidos em cativeiro e que, embora se constitua num procedimento comum, ainda requer estudos para aumentar sua eficiência como ferramenta de conservação. Neste contexto, o presente estudo compara geneticamente amostras provenientes de grupos selvagens e de cativeiros de *Brycon orbignyianus*, com a finalidade de averiguar a identidade genética dos estoques a serem utilizados nos processos de repovoamento. Dados fornecidos pelo sequenciamento da região controle do DNA mitocondrial permitem concluir que nas comparações com os representantes dos grupos selvagens, as amostras provenientes dos estoques mantidos em cativeiro mostram uma diminuição drástica da variabilidade genética e uma grande diferenciação populacional, quando analisado os índices interpopulacionais de fixação. Este fato revela a inadequabilidade dos métodos de reprodução em cativeiro para a produção de estoques pesqueiros compatíveis geneticamente com os grupos selvagens e da impropriedade de utilização deste procedimento para a restauração das populações desta espécie no ambiente natural.

Introdução

Os peixes de água doce são responsáveis por 20 a 25% da biodiversidade dos vertebrados e há indícios de que somente na América do Sul ocorram mais de 8.000 espécies, tendo em vista aquelas relacionadas em apenas duas ordens, Characiformes e Siluriformes (Lowe-McConnel, 1999; Torres *et al.*, 2004; Chistiakov *et al.*, 2006). Contudo, toda essa diversidade de espécies sofre um processo de redução populacional e constante ameaça de extinção, promovida pela exploração desordenada dos recursos ambientais, pesca predatória, falta de fiscalização e medidas protecionistas e também pela crescente fragmentação dos rios devido à construção de empreendimentos hidrelétricos, que modificam as áreas de ocupação e de desova coletivas e interrompem o trajeto migratório de algumas espécies (Agostinho *et al.*, 2002; Hilsdorf e Petrere, 2002; Carolsfeld *et al.*, 2003). Tendo em vista essa ameaça de extinção, diversos planos de conservação têm sido elaborados, sendo que a garantia de sucesso ecológico de uma ação de manejo em um meio ambiente impactado envolve o conhecimento de múltiplos fatores.

Embora o repovoamento com espécies nativas de peixes seja considerado uma prática frequente, muitas vezes este processo é realizada sem respaldo científico. Este fato pode ser observado com a espécie *Brycon orbignyanus*, popularmente conhecida como piracanjuba, cujas populações nativas têm sido intensamente afetadas com os impactos antrópicos durante a última década. Assim, grandes esforços têm sido realizados para proteger os grupos remanescentes e repovoar os rios com espécimes reproduzidos em cativeiro.

As análises genéticas em estoques de pisciculturas representam informações importantes para a obtenção de resultados expressivos na produção e na conservação de

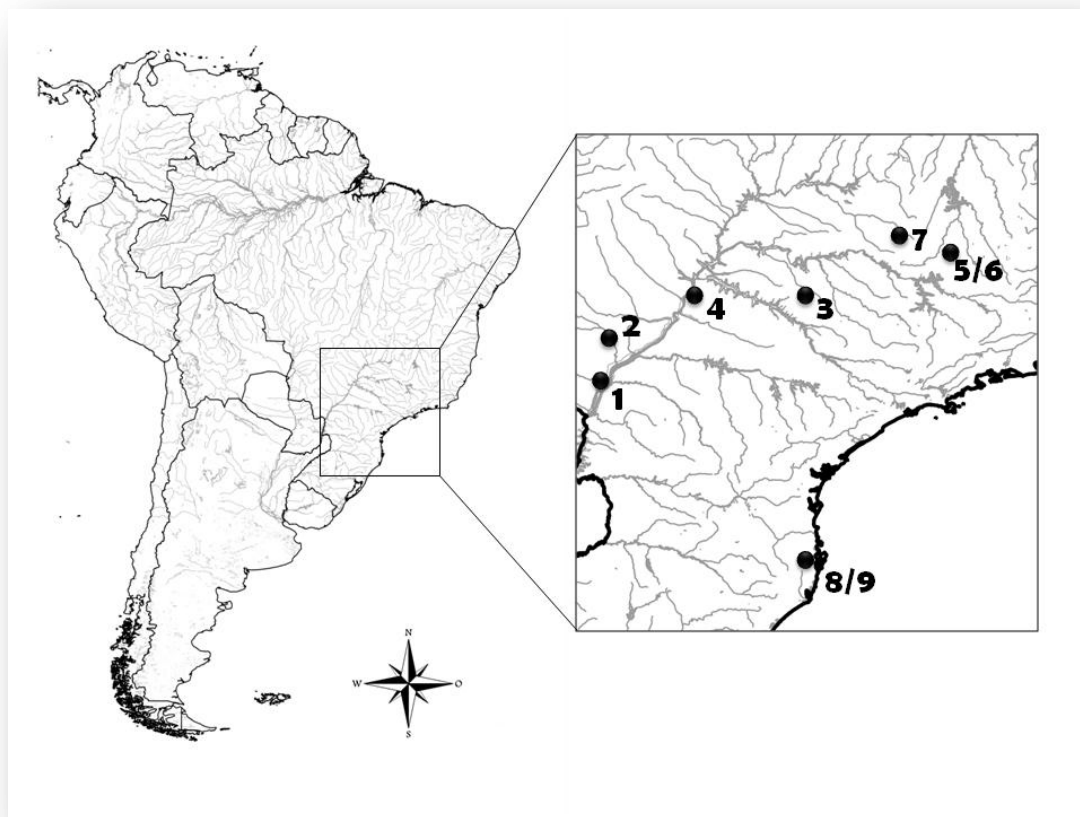
peixes, uma vez que a perda de variabilidade genética é muito comum na prática das pisciculturas devido ao manejo inadequado dos plantéis de reprodutores e da reprodução. Neste contexto, o objetivo do presente trabalho foi verificar se há diferenças genéticas entre grupos de *Brycon orbignyianus* reproduzidos em cativeiro, quando comparados com grupos selvagens coletados em seu ambiente natural, tendo em vista a geração de informações para subsidiar planos mais eficientes de manejo desta espécie.

Materiais e Métodos

Coleta das Amostras

As coletas dos indivíduos selvagens de *Brycon orbignyianus* foram realizadas em duas localidades, tendo sido obtidas amostras no Parque Nacional de Ilha Grande e no Rio Ivinhema, cujas características bióticas e abióticas do ambiente eram as menos impactadas. Já as amostras dos indivíduos mantidos e reproduzidos em cativeiro vieram de diferentes lotes obtidos em diferentes estações de pisciculturas, como o CEPTA (Centro Nacional de Pesquisa e Conservação de Peixes Continentais – ICMBio, Pirassununga, SP); Jupiá (Estação de Piscicultura da UHE Engenheiro Souza Dias - CESP); Itutinga 1 e 2 (Estação de Piscicultura da UHE Itutinga - CEMIG); Furnas (Estação de Piscicultura da UHE Furnas - FURNAS); e LAPAD 1 e 2 (Laboratório de Biologia e Cultivo de Peixes de Água Doce – Universidade Federal de Santa Catarina UFSC). Para obtenção das amostras, apenas um pequeno fragmento da nadadeira adiposa foi retirado e conservado em álcool, para análises genéticas em laboratório, sendo tomados os devidos cuidados para manter a integridade dos indivíduos amostrados na tentativa de devolvê-los vivos ao ambiente.

Figura 4: Mapa identificando os locais de amostragem de *Brycon orbignyianus*.
1- Ilha Grande; 2- Rio Ivinhema; 3- CEPTA; 4- Jupiá; 5/6- Itutinga 1 e 2; 7- Furnas;
8/9- LAPAD 1 e 2.



Extração de DNA e Amplificação das Amostras por PCR

Para os estudos populacionais, o DNA total foi obtido a partir de amostras de fragmentos de nadadeiras conservados em álcool, utilizando o protocolo de extração proposto por Aljanabi e Martinez (1997) e com o kit de extração de DNA total Nucleospin® Tissue XS (Macherey Nagel).

Para a amplificação da região controladora do DNA mitocondrial (D-Loop), foi utilizado o *primer forward* descrito no trabalho de Sivasundar *et al.* (2001) (FTTF: 5' GCCTAAGAGCATCGGTCTTGTA 3') e um *primer reverse*, nomeado como RCR1 (5' CCTGAAGTAGGAACCAGATG 3'). Todas as reações de PCR foram realizadas utilizando o aparelho termociclador Veriti 96 (Applied Biosystems).

As ampliações seguiram o protocolo estabelecido, utilizando 8,25µl de H₂O, 1,25µl tampão (10X), 0,4µl MgCl₂ (50mM), 0,5µl dNTP (2mM), 0,5µl de cada *primer* (10mM), 0,1µl de Taq DNA polimerase e 1,0µl de DNA, em um volume total de 12,5µl. O programa de amplificação seguiu os seguintes passos: denaturação inicial a 95°C por 10 min, 30 ciclos com denaturação da cadeia a 95°C por 30s, hibridização dos *primers* a 54°C por 30s e extensão dos nucleotídeos a 72°C por 30s, seguida pela extensão final a 72°C por 15 min. Os segmentos de DNA amplificados foram visualizados após eletroforese em gel de agarose a 1%, sendo posteriormente realizada uma purificação enzimática com o kit ExoSAP-IT®, seguindo as recomendações do fabricante.

Para a reação de sequenciamento foi utilizado o kit DYEnamic ET Dye Terminator (Applied Biosystems), segundo protocolo fornecido pelo fabricante e a leitura dos fragmentos de DNA sequenciados foi realizada em sequenciadores automáticos, modelos ABI 3130 e ABI 3500 (Applied Biosystems). Para cada amostra foram obtidas sequências com os *primer forward* e reverse, sendo que as sequências consenso foram obtidas pela aplicação do software ATGC, versão 4.0.

Análise Estatística

As sequências foram então alinhadas e editadas pelo software Bioedit Sequence Alignment Editor (Hall 1999), para serem utilizados os softwares DNAsp Sequence Polymorphism (Rozas *et al.* 2003) e Arlequin 3.1 (Excoffier *et al.* 2005) na determinação do número de haplótipos (Nh), número de sítios polimórficos (Nsp), identificação da diversidade gênica e nucleotídica, da análise de variância molecular (AMOVA), na aplicação do teste de neutralidade (FS de FU e D de Tajima) e na obtenção dos índices de fixação interpopulacionais (FST).

Resultados

Ambos os grupos de indivíduos amostrados provenientes das localidades Ivinhema e Ilha Grande revelaram alta diversidade haplotípica (0,975 e 0,980, respectivamente) e diversidade nucleotídica (0,151 e 0,146, respectivamente), indicativo de alta variabilidade genética nestes grupos (Tabela 13). Por outro lado, todos os grupos relativos à criação em cativeiro revelaram baixos índices de diversidade genética.

Tabela 13: Numero amostral (N), Diversidade Nucleotídica, Gênica, Número de Haplótipos (Nh) e Numero de Sítios Polimórficos dos grupos selvagens e de cativeiro de *B. orbignyana*.

	N	Diversidade Nucleotídica	Diversidade Gênica	Nh	Nsp
1 Ivinhema	29	0.151 +/- 0.080	0.975 +/- 0.017	22	38
2 Ilha Grande	27	0.146 +/- 0.078	0.980 +/- 0.019	23	42
3 Cepta	18	0.000 +/- 0.000	0.000 +/- 0.000	1	0
4 Jupiá	32	0.000 +/- 0.000	0.000 +/- 0.000	1	0
5 Itutinga 1	29	0.050 +/- 0.030	0.569 +/- 0.085	5	19
6 Itutinga 2	27	0.075 +/- 0.043	0.433 +/- 0.075	2	10
7 Furnas	25	0.032 +/- 0.021	0.153 +/- 0.091	2	12
8 Lapad 1	27	0.014 +/- 0.011	0.074 +/- 0.067	2	11
9 Lapad 2	25	0.000 +/- 0.000	0.000 +/- 0.000	1	0

Pela análise da Tabela 14 e da Figura 5, é possível verificar a heterogeneidade da distribuição dos 48 haplótipos dentro dos nove grupos. O grupo representante da amostra Ilha Grande foi o que apresentou a maior quantidade de haplótipos (Nh=23), enquanto que os grupos CEPTA, Jupiá e LAPAD 2, as menores quantidades de haplótipos (Nh=1).

Tabela 14: Número de indivíduos por haplótipo e sua distribuição dentro dos grupos selvagens e de cativeiro de *B. orbignyanus*.

Haplótipos	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Hap 1	4	-	-	-	7	-	-	-	-
Hap 2	1	-	-	-	-	-	-	-	-
Hap 3	1	-	-	-	-	-	-	-	-
Hap 4	2	-	-	-	-	-	-	-	-
Hap 5	1	-	-	-	-	-	-	-	-
Hap 6	2	-	-	-	-	-	-	-	-
Hap 7	2	-	-	-	-	-	-	-	-
Hap 8	1	2	-	-	-	-	-	-	-
Hap 9	1	-	-	-	-	-	-	-	-
Hap 10	1	4	-	-	-	-	23	-	-
Hap 11	1	-	-	-	-	19	-	-	-
Hap 12	2	-	18	32	18	8	-	-	-
Hap 13	1	-	-	-	-	-	-	-	-
Hap 14	1	-	-	-	-	-	-	-	-
Hap 15	1	1	-	-	-	-	-	-	-
Hap 16	1	-	-	-	-	-	-	-	-
Hap 17	1	-	-	-	-	-	-	-	-
Hap 18	1	-	-	-	-	-	-	-	-
Hap 19	1	1	-	-	-	-	-	-	-
Hap 20	1	-	-	-	-	-	-	-	-
Hap 21	1	-	-	-	-	-	-	-	-
Hap 22	1	-	-	-	-	-	-	-	-
Hap 23	-	1	-	-	-	-	-	-	-
Hap 24	-	1	-	-	-	-	-	-	-
Hap 25	-	1	-	-	-	-	-	-	-
Hap 26	-	1	-	-	-	-	-	-	-
Hap 27	-	1	-	-	-	-	-	-	-
Hap 28	-	1	-	-	-	-	-	-	-
Hap 29	-	1	-	-	-	-	-	-	-
Hap 30	-	1	-	-	-	-	-	-	-
Hap 31	-	1	-	-	-	-	-	-	-
Hap 32	-	1	-	-	-	-	-	-	-

Hap 33	-	1	-	-	-	-	-	-	-
Hap 34	-	1	-	-	-	-	-	-	-
Hap 35	-	1	-	-	-	-	-	-	-
Hap 36	-	1	-	-	-	-	-	-	-
Hap 37	-	1	-	-	-	-	-	-	-
Hap 38	-	1	-	-	-	-	-	-	-
Hap 39	-	1	-	-	-	-	-	-	-
Hap 40	-	1	-	-	-	-	-	-	-
Hap 41	-	1	-	-	-	-	-	-	-
Hap 42	-	-	-	-	2	-	-	-	-
Hap 43	-	-	-	-	1	-	-	-	-
Hap 44	-	-	-	-	1	-	-	-	-
Hap 45	-	-	-	-	-	-	2	-	-
Hap 46	-	-	-	-	-	-	-	26	-
Hap 47	-	-	-	-	-	-	-	1	-
Hap 48	-	-	-	-	-	-	-	-	25

A análise de variância molecular (AMOVA) entre todos os nove grupos de amostras analisados revelou um valor do índice de fixação interpopulacional elevado ($F_{ST} = 0,5880$), indicando uma forte estruturação genética entre os componentes dos diferentes grupos (Tabela 15). Quando comparados estes mesmo índices par a par (Tabela 16), nota-se que para a maioria das comparações entre os grupos há indicações da existência de alto nível de estruturação genética populacional, exceto para a comparação entre os grupos CEPTA e Jupuí ($F_{ST} = 0,0000$).

Os grupos Jupuí e Furnas são originários de sucessivos cruzamentos de matrizes coletadas do reservatório das Usinas Hidrelétricas de Jupuí (CESP) e Itaipú (Itaipú – Binacional), respectivamente, enquanto que os do grupo CEPTA descendem do cruzamento de indivíduos do grupo Jupuí. Os indivíduos dos grupos LAPAD 1 e 2 são provenientes de dois cruzamentos diferentes de matrizes selvagens capturadas no Rio Uruguai, assim como os grupos Itutinga 1 e 2, formados pela reprodução em cativeiro de indivíduos capturados no Rio Paraná. Com base nestes dados, as comparações entre

os grupos LAPAD 1 e 2 mostraram forte estruturação genética ($F_{ST}=0.899$), justificada pela presença de dois haplótipos exclusivos para o primeiro grupo e um haplótipo exclusivo para o segundo. Por essa razão, tanto a diversidade nucleotídica (0,014 e 0,000) quanto a gênica (0,074 e 0,000) apresentadas para estes dois grupos é baixa. Itutinga 1 e 2 apresentaram a maior diversidade genética para os grupos de cativoiro (0,050 e 0,075). Já no grupo Furnas, foram detectados somente dois haplótipos, identificando baixos valores de diversidade gênica (0,153) e nucleotídica (0,032).

Figura 5: Rede de haplótipos de *B. orbignyana* calculada pelo método Median-Joining. Os círculos coloridos representam os haplótipos encontrados no presente estudo. O tamanho do círculo é proporcional à quantidade de indivíduos que compartilham o mesmo haplótipo.

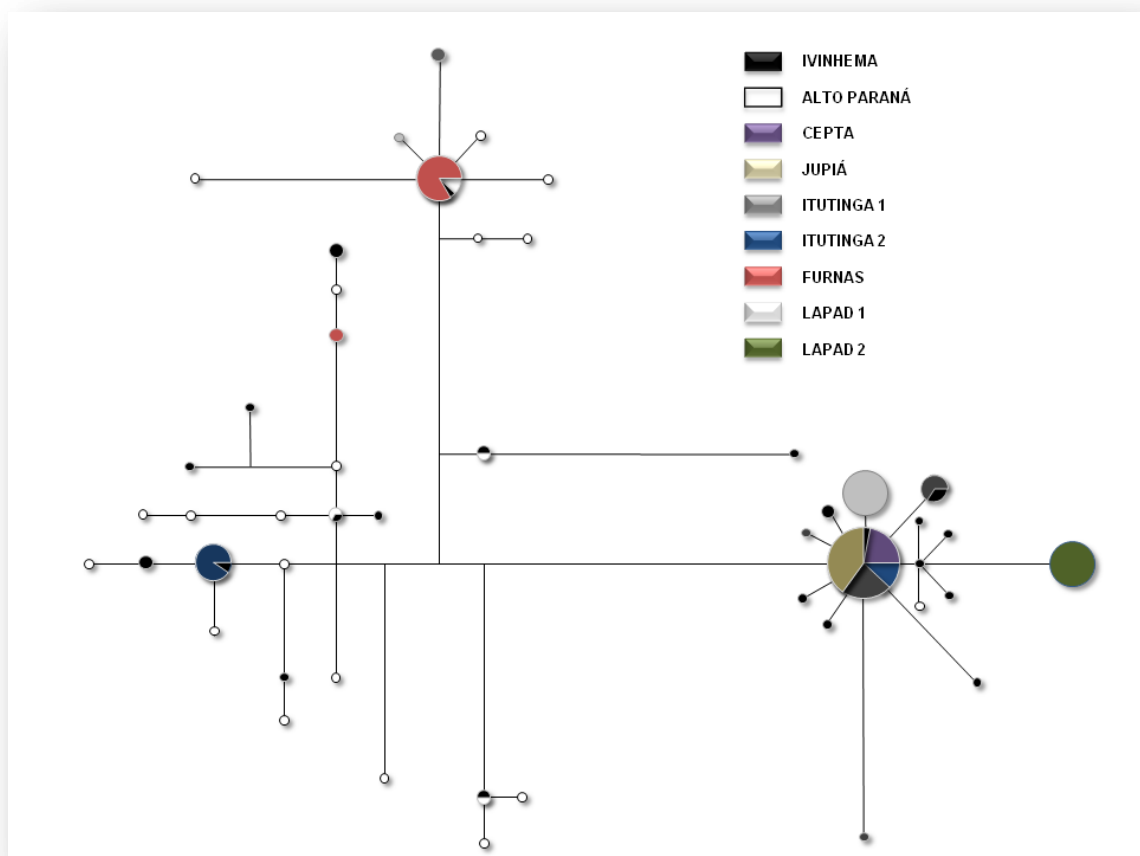


Tabela 15: Análise da variância molecular (AMOVA) e FST, utilizando marcador mitocondrial D-Loop entre os grupos selvagens e de cativeiro de *B. orbignyana*. * P < 0,05, após correção sequencial de Bonferroni.

População	Fonte de variação	Soma dos quadrados	Componentes de variação	% de variação	FST
	Entre os grupos	322,724	0,9590	25,31	0,5880*
Grupos	Entre ind. dentro de grupos	139,433	1,2693	33,50	
	Dentro de grupos	359,028	1,5609	41,19	
Total		821,184	3,78932		

Tabela 16: Índices Fixação Interpopulacional (FST) par a par, entre os grupos selvagens e de cativeiro de *B. orbignyana*. * P < 0,05, após correção sequencial de Bonferroni.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1		+	+	+	+	+	+	+	+
2	0,151		+	+	+	+	+	+	+
3	0,234	0,552		-	+	+	+	+	+
4	0,299	0,624	0,000		+	+	+	+	+
5	0,176	0,495	0,066	0,106		+	+	+	+
6	0,164	0,256	0,648	0,712	0,557		+	+	+
7	0,495	0,305	0,903	0,926	0,784	0,710		+	+
8	0,334	0,594	0,650	0,714	0,354	0,684	0,887		+
9	0,471	0,629	1,000	1,000	0,651	0,777	0,910	0,899	

Discussão

De certa forma, os resultados obtidos revelando baixa diversidade genética nos estoques originários de reprodutores mantidos e manejados em cativeiro já eram esperados, uma vez que as praticas de controle e manejo dos reprodutores e da reprodução de peixes realizados por grande parte das estações de piscicultura não atentam para um controle rígido da variabilidade genética. Neste sentido, deve ser enfatizado que o conhecimento da estrutura genética dos estoques selvagens e de cativeiro de espécies envolvidas em programas de repovoamento, constitui informação fundamental para o sucesso de tais empreendimentos. No presente estudo, verifica-se que o estoque representante do grupo CEPTA teve sua origem a partir de cruzamentos entre indivíduos do grupo Jupiá que, por sua vez, é formado de matrizes originais capturadas no rio Paraná e mantidas em cativeiro por inúmeras gerações. Tal situação se apresenta bastante propícia para promover significativo aumento da consanguinidade no estoque, resultando na conseqüente diminuição da variabilidade genética nas progênies produzidas. Assim, a ausência de diferenciação genética estrutural entre os grupos CEPTA e Jupiá e os baixos índices de variabilidade genética encontrados nestes estoques decorrem de um efeito fundador, ligado à sua origem.

Este processo de cruzamento endogâmico, comum neste tipo de produção pesqueira, acelera o processo de erosão genética e agrava a qualidade dos juvenis produzidos sendo que, a cada geração produzida, menores serão seus índices de variabilidade genética, com a presença de menos indivíduos heterozigotos e mais homozigotos (Van Treuren *et al.*, 1991; Lafreve *et al.*, 2004; Bijlsma e Loeschcke, 2011; Hedrick *et al.*, 2012).

A mesma baixa variabilidade genética foi obtida com os outros grupos mantidos em cativeiro, como Itutinga 1 e 2, LAPAD 1 e 2 e Furnas, certamente também decorrentes das práticas de manejo utilizadas. Contudo, a estrutura genética populacional entre estes grupos mostrou-se forte, o que, segundo Wright (1978), poderia ser decorrente do efeito diferencial dos estoques fundadores. Pode ser hipotetizado que a formação destes grupos foi provavelmente originada de desovas obtidas a partir de poucas matrizes e que as matrizes parentais utilizadas foram diferentes para cada grupo. Em decorrência disto, a utilização de poucos casais para a produção de estoques pesqueiros também irá resultar em juvenis com baixa variabilidade genética, devido à fonte restrita de novos alelos (Hedrick *et al.*, 2012; Fraser e Bernatchez, 2001) e o número restrito de parentais, aliado à endogamia histórica destas matrizes certamente irá refletir em um alto valor de diferenciação interpopulacional (FST), segundo Lafreve *et al.*, 2004, resultando na estruturação populacional encontrada.

Em contrapartida, os dois grupos nativos representados pelas amostras Ilha Grande e Ivinhema apresentaram melhores condições genéticas, quando comparado aos grupos de cativeiro. O maior tamanho populacional, maior fluxo gênico, cruzamentos mais aleatórios e a presença pressões seletivas, são fatores que levaram, com o passar dos anos, à seleção de indivíduos mais adaptados e, conseqüentemente, formando um grupo com maior variabilidade genética (Olver *et al.*, 1995; Crawford e Morito, 1997; Fraser e Bernatchez, 2001).

Comparando os dados de estrutura genética entre todos os grupos de amostras, sejam eles capturados em ambiente natural ou produzidos em cativeiro, nota-se a presença de uma forte estruturação genética populacional. Este fato permite inferir sobre a incompatibilidade do estoque pesqueiro produzido em cativeiro com os dois grupos selvagens considerados, indicando com clareza a impropriedade da utilização dos

planteis de juvenis produzidos para um programa de repovoamento que contemple estes dois locais. As amostras referentes aos grupos Ilha Grande proveniente do Rio Paraná e Ivinhema, coletado ao longo do Rio Ivinhema, também apresentaram uma forte estruturação genética entre eles, indicando, portanto, a existência de populações diferenciadas, com baixo fluxo gênico entre elas.

Assim como os dados obtidos pela aplicação do programa AMOVA, a rede de haplótipos construída a partir dos dados obtidos da análise de todas as amostras revela o alto nível de homogeneidade dos grupos produzidos em cativeiro, enquanto os indivíduos das amostras de ambos os grupos selvagem não formam um agrupamento delimitado, reflexo da sua diferenciação e de sua alta variabilidade genética. Devido a este fato, a realização de um manejo ecológico que contemplasse a reintrodução de espécimes reproduzidos em cativeiro, a partir dos estoques considerados neste trabalho, certamente levaria à introdução de um “*pool* genético” tão homogêneo e incompatível com os grupos selvagens que possivelmente resultaria no fracasso do empreendimento, tanto no ponto de vista de aplicação de um manejo adequado, quanto aos aspectos ligados à conservação das populações selvagens desta espécie.

Como dito anteriormente, o manejo de populações selvagens é uma prática comum, especialmente em populações de peixes de água doce. Contudo, para um manejo mais eficiente, alguns critérios devem ser adotados e as adaptações dos indivíduos dos diferentes grupos em seus respectivos habitats poderia ser a razão da estruturação genética encontrada nas populações. Com base nestas informações, cabe aos proponentes de um programa de manejo de fauna respeitar a integridade do “*pool* gênico” original de cada grupo. Assim, a escolha das matrizes que irão compor o plantel de reprodutores nas operações de reprodução realizadas em cativeiro constitui um passo decisivo no processo, pois irá garantir a viabilidade do estoque produzido e a

compatibilidade genética com os grupos selvagens. Além disso, o número de indivíduos utilizados como matrizes para gerar os juvenis destinados ao repovoamento também constituem outro fator de importância e necessário de ser considerado para garantir o sucesso do repovoamento. Planteis originados de múltiplos casais formados a partir de matrizes selvagens certamente apresentarão maior variabilidade genética e poderão resultar em produtos com baixos valores de incompatibilidade para com os grupos selvagens, sofrendo, portanto menor efeito da erosão genética e aumentando as chances de sucesso do programa de manejo.

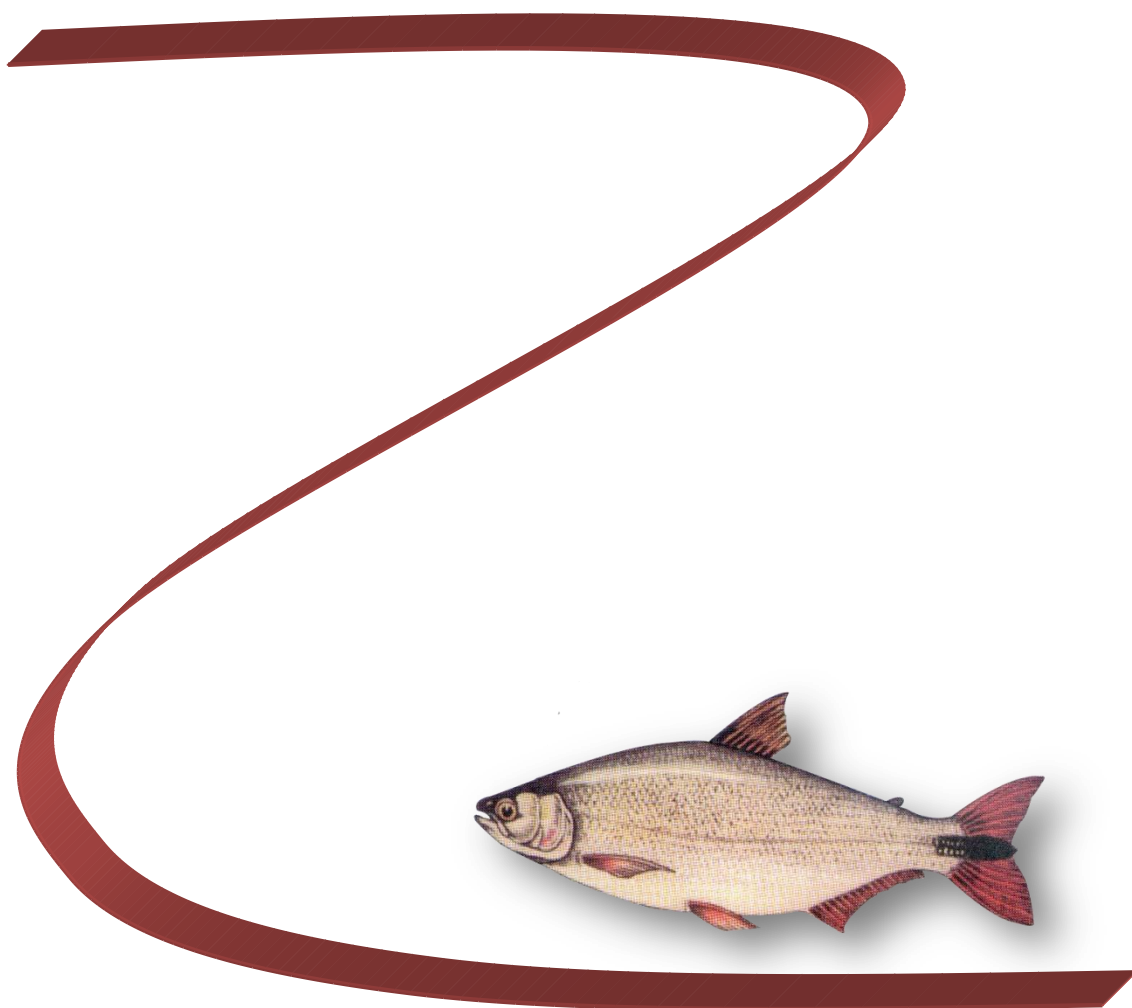
Desta forma, cada grupo selvagem que apresente estrutura genética diferente de outros deve ser considerado como uma unidade evolutiva independente, sendo que o manejo desta unidade deve ser realizado em separado dos demais, a partir da seleção de matrizes apropriadas para o local e garantindo um número suficiente de casais reprodutores efetivos, para originar planteis com características genéticas compatíveis com aqueles das populações impactadas.

Os resultados obtidos no presente trabalho realçam a incompatibilidade genética dos estoques de peixes produzidos nas diferentes estações de piscicultura analisadas com relação às amostras das populações selvagens. Deve, portanto, ser ressaltada a importância deste tipo de estudo conservacionista que visa compreender melhor a dinâmica e os padrões de diversificação das populações de peixes de água doce, bem como estabelecer melhor direcionamento para medidas eficazes que possam resultar no manejo ecológico adequado das populações selvagens.

Referências

As referências citadas neste capítulo estão listadas ao final, no tópico “Referências Gerais”, juntamente com as demais utilizadas nesta tese.

CONCLUSÕES GERAIS



Conclusões Gerais

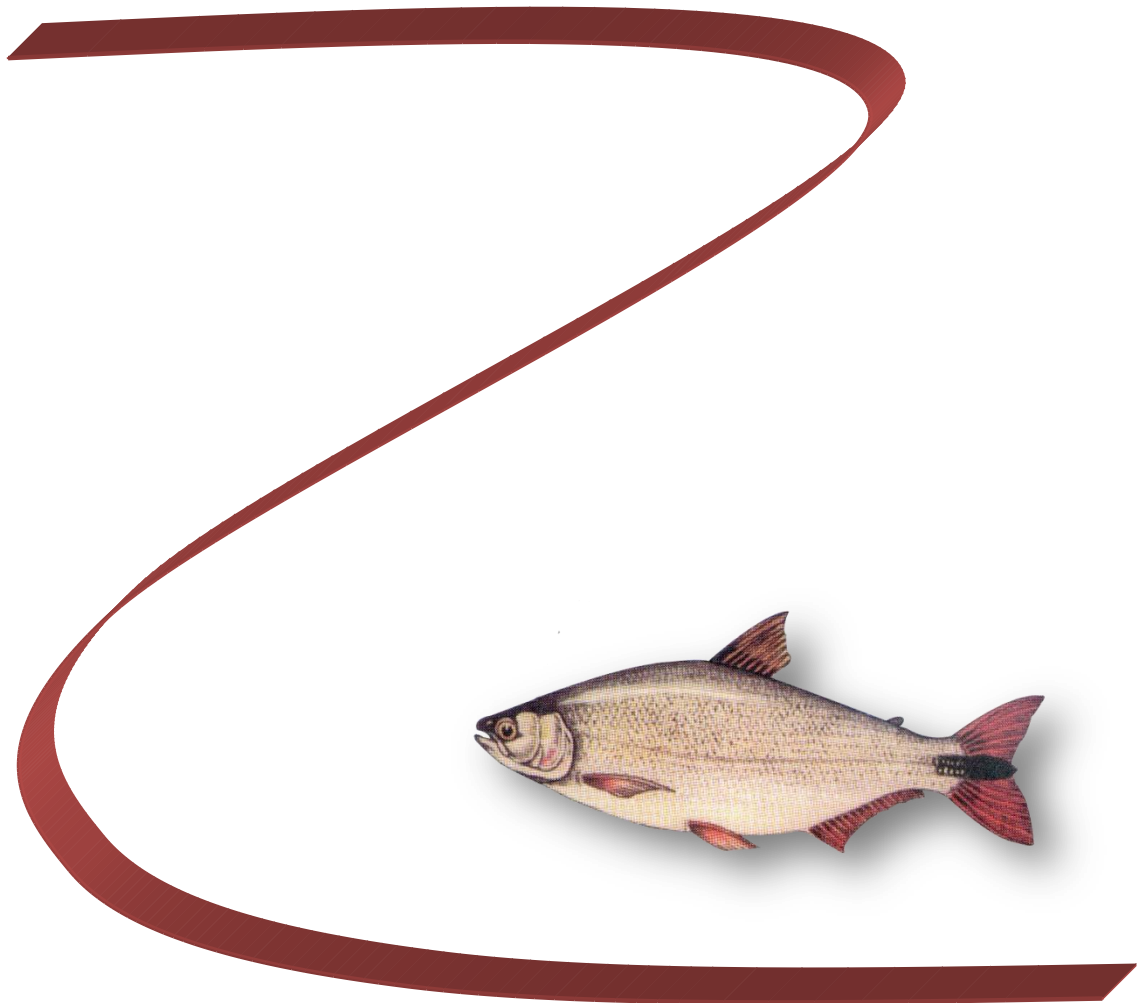
É fato que o crescimento populacional humano tem gerado inúmeros problemas para o meio ambiente e para a manutenção de sua biodiversidade. Pelos fatores anteriormente considerados, populações nativas intactas de peixes de água doce são atualmente raras, sendo que na maioria dos casos são submetidas a intensos impactos antrópicos. Com base nos resultados apresentados nos dois capítulos do presente estudo, pode-se concluir que:

- Os grupos selvagens de *Brycon orbignyanus* estudados na bacia do Rio Paraná apresentam-se estruturados geneticamente, sendo que as amostras obtidas de indivíduos capturados nas localidades do Rio Paraná, livre de barreiras intransponíveis, tendem a ser mais próximos entre si. Portanto, cada afluente que teve amostras de *B. orbignyanus* analisado, deve ser considerado como uma unidade evolutiva independente, merecendo atenção particular para o desenvolvimento de planos de manejo que contemplem a manutenção do “pool genético” daquele local.
- A variabilidade genética dentro de cada grupo de amostras de *B. orbignyanus* mostrou-se heterogênea, de forma que os grupos estudados provenientes de locais com melhores condições ambientais e menores efeitos da ação antrópica, foram aqueles cujos valores de variabilidade mostraram-se mais caracterizados para os padrões das populações selvagens. Desta forma, grupos coletados em regiões impactadas, com perceptível atuação de fatores como sobrepesca, poluição, desmatamento ciliar e barramentos causados por usinas hidrelétricas, foram aqueles que apresentaram menores índices de variabilidade genética,

identificando estas subpopulações como mais suscetíveis a processos de extinção local.

- A atual forma de reprodução de peixes em cativeiro visando à produção de progênes destinadas a programas de repovoamento, embora parecendo uma metodologia adequada sob o ponto de vista de produção pelo alto rendimento de juvenis produzidos por casal de matrizes, pode constituir-se num processo ineficiente e prejudicial ao ambiente. Sob o ponto de vista genético e conservacionista, este modelo de produção mostrou-se inadequado para a manutenção da variabilidade genética local, podendo a longo prazo trazer prejuízos às populações nativas da espécie considerada ao introduzir novos alelos ou “material genético” diferente do original e com baixa variabilidade.
- Dado o fato de que cada espécie apresenta suas próprias características e peculiaridades, uma ação destinada à conservação deve ter por base a aplicação de metodologia científica que garanta o processo biológico e sua manutenção no ambiente específico. A variabilidade genética dos indivíduos e a forma com que esta variabilidade é distribuída dentro de uma população, identificada como sua estrutura genética populacional, constituem fatores fundamentais para a compreensão do material biológico e devem ser levados em consideração no momento da elaboração de planos de ação para a conservação de uma determinada espécie. Ressalta-se também a importância deste tipo de estudo como colaboração para a manutenção da biodiversidade, minimizando as falhas com adoções de medidas com base no senso comum e maximizando os efeitos de um manejo cientificamente recomendado.

REFERÊNCIAS



Referências

- Agostinho AA e Gomes LC (1997) Reservatório de Segredo: Bases Ecológicas para o Manejo. EDUEM, Maringá, 319-364 pp.
- Agostinho AA, Gomes LC, Fernandez DR e Suzuki HI (2002) Efficiency of Fish Ladders for Neotropical Ichthyofauna. *River Res and Applic* 18:299–306.
- Agostinho AA e Gomes LC (2005) O Manejo da Pesca em Reservatórios da Bacia do Alto Rio Paraná: Avaliação e Perspectivas. In: Nogueira MG, Henry R e Jorcin A (Orgs.) *Ecologia de Reservatórios: Impactos Potenciais, Ações de Manejo e Sistemas em Cascata*. Ed. RiMa, São Carlos, 23–55 pp.
- Agostinho AA, Thomaz SM e Gomes LC (2005) Conservation of the Biodiversity of Brazil's Inland Waters. *Conserv. Biol.* 19:646-652.
- Agostinho AA, Pelicice FM e Julio-Jr HF (2005) Biodiversidade e Introdução de espécies de peixes: Unidades de Conservação. In: *Unidades de Conservação: Ações para valorização da biodiversidade*. Instituto Ambiental do Paraná – IAP. Curitiba, 95-117 pp.
- Aho T, Rönn J, Piironen J e Björklund M (2006) Impacts of Effective Population Size on Genetic Diversity in Hatchery Reared Brown Trout (*Salmo trutta* L.) Populations. *Aquaculture*. 253:244-248.
- Aljanabi SM e Martinez I (1997) Universal and Rapid Salt-Extraction of High Quality Genomic DNA for PCR-Based Techniques. *Nucleic Acids Res.* 25: 4692-4693.
- Allan JD e Flecker AS (1993) Biodiversity Conservation in Running Waters. *Bioscience*, 43:32–43.

- Barroca RM, Arantes FP, Magalhães BF, Siqueira FF, Horta CCR, Pena IF, Dergam JA e Kalapothakis E (2012) Genetic Diversity and Population Structure of *Prochilodus costatus* and *Prochilodus argenteus* Preceding Dam Construction in the Paraopeba River, São Francisco River Basin, Minas Gerais, Brazil. *O. J. Gen.* 2:121-130.
- Barroso RM, Hilsdorf AWS, Moreira HLM, Mello AM, Guimarães SEF, Cabello PH e Traub-Cseko YM (2003) Identification and Characterization of Microsatellites Loci in *Brycon opalinus* (Cuvier, 1819) (Characiforme, Characidae, Bryconinae). *Mol. Ecol. Notes.* 3:297–298.
- Bijlsma R e Loeschcke V (2012) Genetic Erosion Impedes Adaptive Responses to Stressful Environments. *Evol. App.*5:117-129
- Brown GG (1986) Structural Conservation and Variation in the D-Loop Containing Region of Vertebrate Mitochondrial DNA. *J. Mol. Biol.* 192:503-511.
- Carolsfeld J, Godinho PH, Zaniboni Filho E e Harvey BJ (2003) Cryopreservation of sperm in Brazilian migratory fish conservation. *J. Fish. Biol.* 63:472-489.
- Castagnolli N (1992) Criação de Peixes de Água Doce. Funep, Jaboticabal, 189p.
- Cecílio BE e Agostinho AA (1997) Estrutura das Populações de Peixes do Reservatório de Segredos. In: Agostinho, AA e Gomes LC. Reservatório de Segredos: Bases Ecológicas para o Manejo. EDUEM, Maringá, 113-139 pp.
- Crawford SS e Morito B (1997) Comment: Toward a Definition of Conservation Principles for Fisheries Management. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 54: 2720-2723.

- Chistiakov DA, Hellemans B e Volckaert FAM (2006) Microsatellites and their Genomic Distribution, Evolution, Function and Applications: A Review with Special Reference to Fish Genetics. *Aquaculture* 255:1–29.
- Dantas GPM (2007) *Biologia Reprodutiva, Estrutura Populacional e Variabilidade Genética de *Larus dominicanus**. Tese (Doutorado) Universidade de São Paulo, São Paulo, 120 pp.
- DeWoody JA e Avise JC (2000) Microsatellite Variation in Marine Freshwater and Anadromous Fishes Compared with Other Animals. *J Fish Biol* 56:461–473.
- Excoffier L, Laval A e Schneider S (2005) ARLEQUIN ver. 3.0: An Integrated Software Package for Population Genetics Data Analysis. *Evol. Bioinf.* Online 1:47-50.
- Excoffier L, Smouse PE e Quattro JM (1992) Analysis of Molecular Variance Inferred From Metric Distances Among DNA Haplotypes: Application to Human Mitochondrial DNA Restriction Data. *Genetics* 131:479– 491.
- Frankham R, Ballou JD e Briscoe DA (2002) *Introduction to Conservation Genetics*, Cambridge University Press, Cambridge UK, 617 pp.
- Fraser DJ e Bernatchez L (2001) Adaptive Evolutionary Conservation: Towards a Unified Concept for Defining Conservation Units. *Mol. Ecol.* 10:2741-2752.
- Futuyma D J (1997) *Biologia Evolutiva*. 2ª ed. Sociedade Brasileira de Genética. Ribeirão Preto, 646 p.
- Garcez R, Calcagnotto D e Almeida-Toledo LF (2011) Population Structure of the Migratory Fish *Prochilodus lineatus* (Characiformes) From Rio Grande

Basin (Brazil), an Area Fragmented by Dams. *Mar. Freshwat. Ecosyst.* 21: 268-275.

Genovart ML, Oro D e Bonhomme F (2003) Genetic and Morphological Differentiation Between Two Largest Breeding Colonies of Audouin's Gull *Larus audouinii*. *Ibis*, 145:448–456.

Godoy MP (1975) Subordem Characoidei. In: *Peixes do Brasil: Bacia do Rio Mogi Guassu*. Editora Franciscana, Piracicaba, 539–552 pp.

Goulding M (1980) *The Fishes and The Forest: Explorations in Amazonian Natural History*. University of California Press, Berkley, 280 pp.

Guo S e Thompson E (1992) Performing the Exact Test of Hardy-Weinberg Proportion For Multiples Alleles. *Biometrics* 48:361-372.

Hahn NS, Agostinho AA, Gomes LC e Bini LM (1998) Estrutura Trófica da Ictiofauna do Reservatório de Itaipu nos Primeiros Anos de sua Formação. *Interciencia* 23:299-305.

Hall TA (1999) BioEdit: a User-Friendly Biological Sequence Alignment Editor and Analysis Program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*. 41:95-98.

Hedrick PW, Lee R e Hurt CR (2012) Genetic Evaluation of Captive Populations of Endangered Species and Merging of Populations: Gila Topminnows as an Example. *J. Heredity*. 103:651-660.

Hilsdorf AW e Petreire Jr M (2002) Conservação de Peixes na Bacia do Rio Paraíba do Sul. *Ciência Hoje* 30:62–67.

- Lefevre F, Fady B, Fallour-Rubio D, Ghosn D e Bariteau M (2004) Impact of Founder Population, Drift and Selection on the Diversity of a Recently Translocated Tree Population. *Heredity*. 98: 542-550.
- Lima FCT (2001) Revisão Taxonômica do gênero *Brycon* dos rios da América do Sul Cisandina (Pisces, Ostariophysi, Characiformes, Characidae). Dissertação (mestrado) Universidade de São Paulo/USP, São Paulo, 296 pp.
- Lima FCT e Castro RMC (2000) *Brycon vermelha*, a New Species of Characid Fish From the Rio Mucuri, a Coastal River of Eastern Brazil (Ostariophysi, Characiformes). *Ichth Exp Fresh* 11: 55-62.
- Lopera-Barrero NM (2009) Conservation of *Brycon orbignyanus* Natural Populations and Stocks for their Reproductive, Genetic, Environmental Sustainability: A Model for Species Threatened With Extinction. **Ciência e Investigación Agraria**. 36:191-208.
- Lougheed SC, Gibbs HL, Prior KA e Weatherhead PJA (2000) Comparison of RAPD Versus Microsatellite DNA Markers in Population Studies of the *Massasauga rattlesnake*. *J Hered* 6:458-463.
- Lowe-McConnell RH (1999) Estudos Ecológicos de Comunidades de Peixes Tropicais. EDUSP, São Paulo, 535 pp.
- Lowe A, Harris S e Ashton P (2004) Ecological Genetics: Design, Analysis and Application. Blackwell Publishing, Malden, 326 pp.
- Marciano FT (2005) Composição, Abundância e Aspectos Reprodutivos das Espécies de Peixes do Reservatório Álvaro de Souza Lima (Bariri, SP) e sua Relação com as Características Ambientais do Sistema. Tese (doutorado) Universidade de São Paulo, São Carlos, 236 pp.

- Martins C, Wasko AP, Oliveira C, Foresti F (2003) Mitochondrial DNA Variation in Wild Populations of *Leporinus elongatus* From the Paraná River Basin. Genet. Mol. Biol. 26:33-38.
- Matsumoto CK e Hilsdorf AWS (2009) Microsatellite Variation and Population Genetic Structure of a Neotropical Endangered Bryconinae Species *Brycon insignis* Steindachner, 1877: Implications for its Conservation and Sustainable Management. Neotrop. Ichthyol. 7:395-402.
- Nei M (1987) Molecular Evolutionary Genetics. Columbia University Press, New York, 512 p.
- Nelson JS (2006) Fishes of the World (4^a ed.) John Wiley & Sons, Hoboken, New Jersey, 601 p.
- Oliveira EJ, Pádua JG, Zucchi MI, Vencovsky R e Vieira MLC (2006) Origin, Evolution and Genome Distribution of Microsatellites. Genet. Mol. Biol. 2:294–307.
- Olver CH, Shuter BJ e Minns CK (1995) Toward a Definition of Conservation Principles for Fisheries Management. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 52:1884-1894.
- Ormerod SJ (2003) Current Issues With Fish and Fisheries: Editor's Overview and Introduction. J. Appl. Ecol. 40:204–213.
- Paiva MP (1982) Grandes Represas do Brasil. Editerra, Brasília, 292pp.
- Peakall R e Smouse PE (2006) GENALEX 6: Genetic Analysis in Excel. Population Genetic Software for Teaching and Research. Mol. Ecol. Notes. 6: 288-295.

- Perez-Sweeney BM, Rodrigues FP e Melnick DJ (2003) Metodologias Moleculares Utilizadas em Genética da Conservação. In: Cullen LJ, Rudran R e Valadares-Padua C (Orgs.) Métodos de Estudos em Biologia da Conservação e Manejo da Vida Silvestre. Ed. UFPR, Curitiba, 343-380 pp.
- Povh JA (2007) Avaliação da Diversidade Genética e do Manejo Reprodutivo do Pacu, *Piaractus mesopotamicus*. 75p. Dissertação (Doutorado em Zootecnia), Universidade Estadual de Maringá, Maringá, Paraná.
- Ribeiro Filho RA (2006) Relações Tróficas e Limnológicas no Reservatório de Itaipu: Uma Análise do Impacto da Biomassa Pesqueira nas Comunidades Planctônicas. Tese (Doutorado) Universidade de São Paulo, São Carlos, 154 pp.
- Rice WR (1989) Analyzing Tables of Statistical Tests. *Evolution*, 43: 223-225.
- Rice SP, Roy AG e Rhoads BL (2008) River Confluences, Tributaries, and the Fluvial Network. John Wiley & Sons, Hoboken, New York, 474 pp.
- Ringuelet RA, Aramburu RH e Aramburu AA (1967) Los Peces Argentinos de Água Dulce. Província de Buenos Aires, Gobernacion, Comision de Investigacion Cientifica, La Plata, 602 pp.
- Rozas J, Sanchez-Delbarrio JC, Messeguer X, Rozas R (2003) DnaSP, DNA Polymorphism Analyses by the Coalescent and Other Methods. *Bioinformatics*. 19: 2496–2497.
- Rubin CS, Warner RE, Bouzat JL e Paige KN (2001) Population Structure of Blanding's Turtles (*Emydoidea blandingii*) in a Urban Landscape. *Biol. Conserv.* 99:323 – 330.

- Sanches A e Galetti Jr PM (2006) Genetic Evidence of Population Structuring in the Neotropical Fresh Water Fish *Brycon hilarii* (Valencinnes, 1850) Braz. J. Biol. 4:889–895.
- Selkoe KA e Toonen RJ (2006) Microsatellites for Ecologists: a Practical Guide to Using and Evaluating Microsatellite Markers. Ecol. Let. 9:615–629.
- Shibatta OA, Gealh AM e Bennemann ST (2009) Ictiofauna dos Trechos Alto e Médio da Bacia do Rio Tibagi, Paraná, Brasil. Biota Neotropica. 7:125-134.
- Silva RG (2006) Análise da Estrutura Genética Populacional do Curimbatá (*Prochilodus lineatus*, Characiformes: Prochilodontidae) na Região da Bacia do Rio Grande, SP. Dissertação (mestrado) Universidade de São Paulo, São Paulo, 112 pp.
- Sirol RN e Britto SG (2006) Conservação e Manejo da Ictiofauna: Repovoamento. In: Nogueira MG, Henry R, Jorcin A (Ed.). Ecologia de Reservatórios: Impactos Potenciais, Ações de Manejo e Sistemas em Cascatas. São Carlos, Rima. 275-284 pp.
- Sivasundar A, Bermingham E e Orti G (2001) Population Structure and Biogeography of Migratory Freshwater Fishes (*Prochilodus*: Characiformes) in Major South American Rivers. Mol. Ecol. 10: 407-417.
- Slatkin M e Barton HH (1989) A Comparison of Three Indirect Methods for Estimating Average Levels of Gene Flow. Evolution 43:1349-1368.
- Solé-Cava AJ (2001) Biodiversidade Molecular e Genética da Conservação. In: Matioli SR (Ed.) Biologia Molecular e Evolução. Editora Holos, Ribeirão Preto, 171-190 pp.

- Sonstebo JH, Borgstrom R e Heun, M. (2007) Genetic Structure of Brown Trout (*Salmo trutta L.*) From the Hardangervidda Mountain Plateau (Norway) Analyzed by Microsatellite DNA: a Basis for Conservation Guidelines. *Conserv. Genet.* 8:33-44.
- Suzuki HI (1999) Estratégias Reprodutivas de Peixes Relacionadas ao Sucesso na Colonização em Dois Reservatórios do Rio Iguaçu-PR, Brasil. Tese (Doutorado) Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 97 pp.
- Torres RA, Matoso DA e Artoni RF (2004) Genética de Peixes Neotropicais. *Biologia Molecular de Peixes Neotropicais. Biol Saúde* 10:27–37.
- Van Oosterhout C, Hutchinson WF, Wills DPM e Shipley P (2004) MICRO-CHECKER: Software for Identifying and Correcting Genotyping Errors in Microsatellite Data. *Mol. Ecol. Notes.* 4: 535-538.
- Van Treuren R, Bijlsma R, Van Delden W e Ouborgi NJ (1991) The Significance of Genetic Erosion in the Process of Extinction. *Genetic Differentiation in Salvia Pratensis and Scabiosa Columbaria in Relation to Population Size. Heredity.* 66: 181-189.
- Vaz MM, Torquato VC e Barbosa NDC (2000) Guia Ilustrado de Peixes da Bacia do Rio Grande. CEMIG/CETEC, Belo Horizonte, 144 pp.
- Wright S (1978) *Evolution and the Genetics of Populations. Volume 4. Variability Within and Among Natural Populations.* The University of Chicago Press, Chicago, 9-103 pp.