

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU
Departamento de Morfologia
Laboratório de Biologia e Genética de Peixes

Mestrado

**Reprodução em cativeiro de piracanjuba *Brycon orbignyanus*
assistida por marcador molecular como estratégia de conservação.**

Daniela José de Oliveira

Botucatu / SP
Fevereiro/2014

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU
Departamento de Morfologia
Laboratório de Biologia e Genética de Peixes

Daniela José de Oliveira

**Reprodução em cativeiro de piracanjuba *Brycon orbignyanus*
assistida por marcador molecular como estratégia de conservação.**

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

Orientador: Dr. Fausto Foresti

Botucatu / SP

Fevereiro/

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE - CRB 8/5651

Oliveira, Daniela José.

Reprodução em cativeiro de piracanjuba *Brycon orbignyanus* assistida por marcador molecular como estratégia de conservação / Daniela José Oliveira. - Botucatu, 2014

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Fausto Foresti

Capes: 20204000

1. Peixe de água doce. 2. Peixe - População. 3. Genética de populações. 4. Biodiversidade - Conservação. 5. Brycon.

Palavras-chave: Conservação da biodiversidade; Genética de populações; Peixes; Repovoamento; Variabilidade genética.

Dedicatória

Dedicado à minha família, em especial a memória de
meu avô Lourenço Braz de Oliveira.

AGRADECIMENTOS

À todos que colaboraram direta ou indiretamente para a concretização deste trabalho, meus sinceros agradecimentos...

À Deus por me permitir chegar até aqui, passar por todas as provações e seguir firme mesmo nas horas que desistir seria o mais fácil.

Aos meus queridos pais Ivani e Maria, e ao meu irmão Daniel, pelo apoio, carinho, dedicação e paciência em todos os momentos. Amo vocês eternamente.

Aos meus avós Eva, Arquino, *in memoriam* Suzana e Lourenço que mesmo distantes, torcem por cada sorriso meu. Obrigada por me fazer sentir uma eterna criança.

Ao meu orientador Professor Dr. Fausto Foresti, por sua paciência, confiança, oportunidade a mim concedidas e o privilégio de ser sua orientanda. Um exemplo de profissional.

Ao Dr. Fernando Yuldi Ashikaga, pela paciência, dedicação e pelos conhecimentos a mim transmitidos; sem isso, a realização deste trabalho seria impossível.

Ao Dr. José Augusto Senhorini, pela confiança em mim depositada há cinco anos, que desde então me mostrou o caminho e como caminhar. Obrigada Zé, por acreditar e me incentivar sempre. Sem você nada disso seria possível.

Ao Professor Dr. Claudio de Oliveira, pelos conhecimentos a mim transmitidos.

À todos do Laboratório de Biologia e Genética de Peixes, que me receberam de braços abertos, me aturam diariamente com minhas lamentações e fazem dos meus dias em Botucatu mais alegres! Obrigada por cada momento com vocês divididos, obrigada mesmo!!!

Ao Msc. Bruno Rossini, pelas sugestões feitas ao trabalho.

Às minhas amigas Ana e Íris, pelo apoio, amizade e sempre estarem comigo nos momentos mais difíceis.

À minha amiga Glaucinha, pela paciência e amizade.

À toda equipe do CEPTA/ICMBio, pela infraestrutura, apoio e pela oportunidade de realizar toda parte experimental do projeto em suas dependências, como também a disponibilização dos exemplares de *Brycon orbignyanus*. Obrigada em especial à analista ambiental Rita de Cássia G. A. Rocha.

Aos membros da Banca Examinadora, Dr. Luiz Henrique Pereira Garcia e a Dra. Vanessa Paes da Cruz pela disponibilidade e colaboração

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

Às agências de fomento FAPESP e CNPq, pelo auxílio financeiro e concessão da bolsa.

Resumo

A fauna de peixes de água doce no Brasil é particularmente diversa e muitas das espécies que a compõem não são encontradas naturalmente em outros locais. Tal diversidade contém um número elevado de estoques naturais nos cursos d'água, os quais vêm sofrendo sensível redução como resultado da exploração desordenada dos recursos, devido a captura de indivíduos jovens, pesca predatória, falta de fiscalização e medidas protecionista, poluição das águas, introdução de espécies exóticas e, principalmente, pela crescente fragmentação dos rios devido à construção de empreendimentos hidroelétricos, que modificam as áreas de desova coletiva e interrompem o trajeto migratório de algumas espécies. Atualmente constam na lista oficial de espécies ameaçadas de extinção (IN nº 4/2005) 196 espécies de peixes, sendo que 141 são de água doce, entre as quais sete são consideradas sobreexploradas. Dentre as espécies de peixes migradoras classificadas em perigo pela IUCN, o gênero *Brycon* é o mais representado no Livro Vermelho da Fauna Ameaçada de Extinção (MMA, 2008), com seis espécies ameaçadas, sendo que a piracanjuba *Brycon orbignyanus* consta entre elas. *Brycon orbignyanus* é um peixe reofílico, pois migra por longas distâncias para se reproduzir e, sendo assim, não se reproduz naturalmente em ambiente de cativeiro. Entre as ações de manejo que visam reduzir os impactos das ações antrópicas sobre os estoques de peixes, pode-se destacar a proibição da pesca durante o período de reprodução, controle da pesca, proibição do uso de determinados equipamentos de pesca, programas de repovoamento e a construção de mecanismos de transposição de peixes. Porém, muitas destas estratégias e ações para melhoria ou manutenção dos recursos naturais têm sido realizadas sem respaldo científico, com base simplesmente no senso comum. Este estudo tem como objetivo principal realizar a reprodução em cativeiro de *B. orbignyanus* de diferentes locais de origem, assistida por análises genéticas do DNA mitocondrial e também de marcadores moleculares do tipo microssatélite, de forma a produzir juvenis geneticamente adequados para o uso em programas de manejo. Para as análises genéticas, o DNA total foi obtido a partir de amostras de tecido animal coletado dos juvenis de *B. orbignyanus* resultante dos diferentes cruzamentos e também de pisciculturas. Foram utilizados marcadores do tipo mitocondrial *D-loop* e quatro *loci* microssatélites. Os grupos foram determinados através de cruzamentos dirigidos entre animais selvagens coletados na bacia do rio Paraná e animais oriundos de reprodução em cativeiro F2, destinados ao programa de

conservação da espécie, realizados no Centro Nacional de Pesquisa e Conservação de Peixes Continentais – ICMBio. Também foram utilizadas amostras obtidas de pisciculturas que desenvolvem trabalhos de repovoamento da espécie. Através do marcador molecular *D-loop* foi possível identificar 4 haplótipos totalmente distintos. Os quatro *loci* microssatélites permitiram a identificação de alguns alelos únicos, porém, como eles apresentam-se em baixas frequências, é provável que estes alelos originais sejam alelos raros ou ainda estas progênies sofreram variações de variabilidade genética devido a influência da produção de espermatozóides de um macho sobre outro durante o processo reprodutivo artificial. Pela análise de variância molecular (AMOVA) foi possível identificar que a maior fonte de variação está presente entre os indivíduos (75.95%), o valor atribuído ao índice de fixação interpopulacional ($F_{ST} = 0.24$) é considerado alto, indicando uma alta estruturação genética entre os dez grupos avaliados. Os valores de heterozigosidade esperada e observada foram altos tanto para as progênies oriundas de animais de cativeiro quanto para as progênies dos animais selvagens. Entretanto, os valores obtidos para os animais de cativeiro foram inferiores aos dos selvagens e a heterozigosidade esperada foi superior a heterozigosidade observada, mostrando uma leve perda de variabilidade genética que, com o passar dos anos e sendo mantidos tais índices de cruzamentos podem levar ao aumento da endogamia e à perda de variabilidade genética nos estoques. Com a frequente implantação de programas de repovoamento devem ser colocados em prática cuidados para evitar a perda de variação genética e acúmulo de endogamia dentro de populações de cativeiro. Neste caso, a inserção de reprodutores selvagens nestes estoques podem promover a manutenção de alelos e manter os valores de variabilidade genéticos relativamente altos. Torna-se, portanto, imprescindível a realização de estudos que identifiquem a variabilidade das populações naturais dos locais onde serão realizadas as ações de repovoamento, para identificar possíveis grupos genéticos, uma vez que as populações analisadas são estruturas.

Abstract

The freshwater fauna of fish in Brazil is particularly diverse and a lot of these species that compose it are not naturally found elsewhere. Such diversity has a high number of stocks in natural watercourses, which have suffered significant reduction as a result of uncontrolled exploitation of resources, because the capture of juveniles, overfishing, lack of supervision and protectionist measures, water pollution, introduction of exotic species, and especially by the increasing fragmentation of rivers by the construction of hydroelectric projects, which modify the collective spawning areas and disrupt the migratory path of some species. Currently listed on the official list of endangered species (IN on 4/2005) 196 fish species, of which 141 from freshwater, among which seven are considered overfished. Among the migratory fish species classified as endangered by IUCN, the Brycon is the most represented in the Red Book of Endangered Fauna (MMA, 2008), with six endangered species, and piracanjuba *Brycon orbignyanus* is among them. *Brycon orbignyanus* is a reofilico fish because migrate long distances to breed and, therefore, does not reproduce naturally in captivity environment. Between management actions to reduce the impacts of human activities on fish stocks, can highlight a ban on fishing during the breeding period , control of fishing , prohibiting the use of certain fishing equipment , programs and build fishways fish . However, many of these strategies and actions for improvement or maintenance of natural resources has been made without scientific backing, simply based on common sense. This study aims to conduct captive breeding of *B. orbignyanus* different source locations, assisted by genetic analysis of mitochondrial DNA and also molecular microsatellite markers in order to produce genetically juvenile suitable for use in management programs . For genetic analysis, total DNA was obtained from samples of animal tissue collected from juvenile *B. orbignyanus* resulting from different crosses and also fish farms. Markers of mitochondrial D-loop type four microsatellite loci were used. The groups were determined by crosses between wild animals collected in the Paraná River basin and animals from captive breeding F2, for the species conservation program, conducted at the Centro Nacional de Pesquisas e Conservação de Peixes Continentais - ICMBio. Samples from fish farms carrying out work with repopulation of the species were also used. Through the D - loop molecular marker was identified 4 completely distinct haplotypes. The four microsatellite loci allowed the identification of some unique alleles, however, as they present themselves at low frequencies, it is likely

that these unique alleles are rare alleles or variations of these progenies underwent genetic variability due to the influence of sperm production of a male over another during artificial reproductive process. By analysis of molecular variance (AMOVA) was identified that the greatest source of variation is present among individuals (75.95 %) , the value assigned to index interpopulational fixation ($F_{ST} = 0.24$) is considered high , indicating a high genetic structure between the ten groups assessed . The values of observed and expected heterozygosity were high for both the progenies derived from captive animals and for the progenies of wildlife. However, the values obtained for the captive animals were lower than those of wild and expected heterozygosity was higher than observed heterozygosity, showing a slight loss of genetic variability, over the years and being maintained indices such crossings can lead to increased inbreeding and loss of genetic variability in stocks. With the frequent deployment of restocking programs should be put in place precautions to prevent the loss of genetic variation and accumulation of inbreeding within populations in captivity. In this case, the insertion of these wild breeding stocks can promote maintenance of alleles and maintain the values of relatively high genetic variability. It is, therefore, essential to carry out studies identifying the variability of natural populations of the places where the actions of restocking will be performed to identify possible genetic groups, since the species has structured populations.

Lista de Tabelas

Tabela 1	Identificação de cada cruzamento, origem e procedência de cada grupo amostrado.....	25
Tabela 2	Sequências de nucleotídeos das repetições <i>motifs</i> , dos primers dos loci de microssatélite analisados para <i>B. orbignyana</i>	27
Tabela 3	Número de indivíduos por haplótipo e sua distribuição dentro dos grupos de <i>B. orbignyana</i>	28
Tabela 4	Análise da variância molecular (AMOVA)e FST, utilizando marcador mitocondrial <i>D-loop</i> entre os grupos de <i>B. orbignyana</i>	29
Tabela 5.	Dados de quatro <i>loci</i> microssatélites para cada grupo de <i>B. orbignyana</i> . <i>N</i> = número de indivíduos; <i>N_a</i> = número de alelos; <i>H_o</i> = heterozigosidade observada; <i>H_e</i> = heterozigosidade esperada; <i>FIS</i> = índice de fixação (endogamia); <i>HWE</i> = valores probabilísticos de concordância com o equilíbrio de Hardy-Weinberg; * = $P \leq 0,0125$ ajustados com a correção de Bonferroni.....	30
Tabela 6.	Heterozigosidade média observada e esperada dos grupos de cativo e selvagens.	30
Tabela 7	Frequência alélica de cada alelo por locus e por população obtidos através de marcador microssatélite.....	32
Tabela 8	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..	34

Lista de Figuras

Figura 1	Piracanjuba <i>Brycon orbignyanus</i> . Exemplar medindo 41 cm.....	21
Figura 2	Rede de haplótipos de <i>B. orbignyanus</i> construída através de análise da região mitocondrial <i>D-loop</i>	29

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	v
Resumo	vi
Abstract	viii
Lista de Tabelas	x
Lista de Figuras	xi
SUMÁRIO	xii
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Construção de barragens e os impactos sobre a ictiofauna	3
1.2 Marcadores moleculares.....	4
1.3 Estratégias de conservação e manejo	6
1.4 Reprodução de peixes em cativeiro.....	8
1.5 A piracanjuba, <i>Brycon orbignyanus</i>	9
2. OBJETIVOS	11
2.1 Objetivo geral.....	11
2.2 Objetivos específicos.....	12
3. MATERIAL E MÉTODOS	12
<i>Cruzamentos dirigidos em cativeiro e obtenção de amostras</i>	12
<i>Análises genéticas dos juvenis através de marcadores moleculares</i>	14
4. RESULTADOS	16
5. DISCUSSÃO	23
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	29
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	30

1. INTRODUÇÃO

Os peixes se apresentam como os vertebrados mais diversificados e os de maior variação genética conhecida, devido a este fato, peixes se apresentam como os vertebrados mais diversificados e os de maior variação genética conhecida. Existem, aproximadamente, 57580 espécies de peixes, sendo que deste total, 32776 já foram validadas (Eschmeyer e Fong, 2013). Somente nos últimos 20 anos foram descritas 6803 novas espécies de peixes, o que tornam os peixes o grupo de vertebrados com maior número de espécies descritas nas últimas décadas (Lowe-McConnell, 1999; Nelson, 2006; Eschmeyer e Fong, 2013). Toda essa biodiversidade de peixes em parte é devido a grande plasticidade destes animais a ocuparem diferentes habitats aquáticos, sendo que deste total de espécies, cerca de 45% delas vivem em água doce e 65% em ambientes de água salobra e marinhos (Eschmeyer e Fong, 2013).

A fauna de peixes de água doce no Brasil é particularmente diversa e muitas das espécies que a compõem não são encontradas naturalmente fora da América do Sul. Essa diversidade contém um número elevado de estoques naturais, os quais vêm sofrendo sensíveis reduções nos cursos d'água, como resultado da exploração desordenada dos recursos, que modificam as áreas de desova coletivas e interrompem o trajeto migratório de algumas espécies (Ashikaga, 2008). Desta maneira, torna-se fundamental o conhecimento da biologia e da dinâmica populacional destes animais para a tomada de medidas racionais de preservação dos estoques (Agostinho et al., 2002; Hilsdorf e Petrere, 2002; Carolsfeld et al., 2003; Ninhaus-Silveira, 2007; Oliveira e Senhorini, 2010).

Atualmente, grande parte dessa diversidade de espécies de peixes encontra-se ameaçada de extinção devido a inúmeros fatores, dentre eles: pesca predatória, poluição

de rios e oceanos, fragmentação ambiental, desmatamento ciliar e introdução de espécies exóticas. A *International Union for Conservation of Nature* (IUCN) é responsável por veicular uma lista, conhecida com *Red List*, na qual constam as espécies com algum risco de extinção. Do total de 11092 espécies da fauna ameaçada, os peixes representam aproximadamente 19%, sendo que do total de 2094 espécies ameaçadas, 409 foram consideradas criticamente ameaçadas, 528 ameaçadas e 1157 vulneráveis. Com base nesta estatística, os peixes representam o maior grupo taxonômico, dentre os vertebrados, em quantidade de espécies ameaçadas de extinção (IUCN, 2013). No Brasil figuram hoje na lista oficial de espécies ameaçadas de extinção (IN nº 4/2005) 196 espécies de peixes, sendo que 141 são de água doce, entre as quais sete são consideradas sobreexploradas. Dentre as espécies de peixes denominadas grandes migradores, o gênero *Brycon* é o mais representado no Livro Vermelho da Fauna Ameaçada de Extinção (MMA, 2008), com seis espécies ameaçadas, sendo que a piracanjuba *Brycon orbignyanus* consta entre elas.

A exploração desordenada do meio ambiente desencadeia a diminuição da biodiversidade, sendo que a atual perda de espécies é algo sem precedentes, podendo tornar-se irreversível ao longo do tempo (Primack e Rodrigues, 2002). A sobrevivência de uma espécie depende de populações mínimas viáveis (Brito e Fonseca, 2006) e, quando isso não é possível naturalmente, o manejo das populações se torna extremamente necessário para que seja proporcionada a garantia mínima de variabilidade genética, bem como demográfica e ecológica, para sua manutenção e perpetuação no ambiente (Cullen Jr. Et al., 2003).

Em resposta às modificações ambientais geradas por mudanças climáticas e principalmente por ações humanas, nos últimos anos populações naturais desse peixe desapareceram de vários rios brasileiros (Zaniboni-Filho et al., 2006), sendo catalogada

como espécie em risco de extinção. Por esse motivo, programas que visem à sua conservação estão sendo desenvolvidos em várias regiões do Brasil, destacando-se o repovoamento como estratégia utilizada para atingir esse objetivo (Lopera-Barrero et al., 2007).

Estudos genéticos de estoques destinados a programas de repovoamento podem trazer informações importantes para conseguir ganhos expressivos na conservação de peixes (Povh et al., 2008). Em razão do manejo genético inadequado a perda da variabilidade genética dos estoques utilizados em programas de repovoamento, pode acarretar sérios problemas que levam à endogamia, o que diminui a adaptabilidade e a sobrevivência das progênes liberadas nos rios (Frost; Evans; Jerry, 2006; Povh, 2007).

É claro o fato de que o repovoamento continuará aumentando em popularidade na sociedade, como um método mitigatório para a manutenção das populações de peixes, tornando-se assim fundamental que os programas sejam monitorados por pesquisas científicas, a fim de determinar com clareza os possíveis impactos ecológicos, sociais e econômicos (Sirol e Britto, 2005).

1.1 Construção de barragens e os impactos sobre a ictiofauna

Com o aumento populacional e a utilização desenfreada dos recursos ambientais, o desenvolvimento econômico do Brasil necessita cada vez mais de suas reservas naturais, conseqüentemente a intensidade dos impactos e degradação do ambiente vem se tornando maior e inevitável. O Brasil possui um grande potencial hídrico e para suprir a demanda energética, a construção de usinas hidrelétricas é a solução adotada para proporcionar independência energética a preço relativamente baixo (Umetsu, 2004). No entanto, esta solução é conflitante com outros interesses da sociedade,

principalmente no que diz respeito aos danos ambientais e sociais que extrapolam o local e a região onde estão localizados esses empreendimentos (Merona et al., 2001).

A redução da vazão de corpos d'água por represamento retarda o período reprodutivo dos peixes, aumentando a mortalidade dos juvenis pelo fato da desova ocorrer em período inadequado ao seu desenvolvimento (Fidalgo-Guerreiro e Ferreira, 2011). As espécies de peixes adaptadas a ambientes reofílicos são as mais afetadas com a transformação súbita do ambiente lótico para lêntico, uma vez que as adaptações e estratégias reprodutivas estavam associadas ao ambiente original (Braga, 2001). As alterações mais relevantes produzidas pelos reservatórios sobre essas espécies migradoras e endêmicas, tanto montante quanto jusante da barragem, é o bloqueio ou o retardo do movimento de peixes para as partes superiores da bacia (Andrade e Araújo, 2011).

Com a transformação dos principais rios brasileiros em uma sucessão de reservatórios, provocando alterações nas áreas de reprodução da fauna aquática, além de se transformarem em barreiras intransponíveis para os peixes (Yan et al. 2008), tais eventos são reconhecidos como uma das principais causas da diminuição e extinção de peixes (Godinho e Godinho, 1994) principalmente quando se trata de espécies migradoras, as quais geralmente são as de maior valor para pesca (Agostinho et al., 2007; Andrade e Araújo, 2011). Este fato se reveste de importância ainda maior quando se leva em conta a grande diversidade de espécies de peixes em nossos rios (Andrade e Araújo, 2011).

1.2 Marcadores moleculares

Estudos de genética de populações vêm aumentando consideravelmente nas últimas décadas principalmente devido ao desenvolvimento de instrumentos efetivos de

diferenciação genômica. 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 propostas de manejo e conservação e para revisar tradicionais designações de espécies e subespécies (Dantas, 2007).

Desde as décadas de 70 e 80, a molécula do DNA mitocondrial (DNAMt) passou a fazer parte da maioria dos estudos envolvendo estrutura populacional, relações filogenéticas e o entendimento de vários aspectos biológicos e evolutivos de uma grande variedade de organismos (Avice, 2004). Dentre as vantagens da utilização do DNAMt como marcador molecular podem-se citar características como a sua transmissão das fêmeas para os descendentes (Avice, 1994), tamanho reduzido, maior número de cópias em relação ao DNA nuclear, simplicidade estrutural e reduzido número de mecanismos de variação genética (Wolstenholme, 1992; Rokas et al., 2003).

A única grande região não codificadora do DNAMt é denominada Região Controle, também chamada de *D-loop* e caracteriza-se como uma região rica em A+T e sendo responsável pelos processos de replicação e transcrição do DNAMt, sendo que seu estudo pode fornecer importantes informações evolutivas para diversos grupos de organismos (Taylor et al., 1993; Avice, 1994). Justamente por isso, a análise de DNAMt tem sido utilizada em diversos estudos, entre eles na biologia da conservação, ao se quantificar o grau de variabilidade genética presente nas populações e a identificação de possível estruturação genética destes componentes. Ao estudar as populações sob o ponto de vista da composição genética e das ferramentas moleculares, obtém-se várias unidades finais ou básicas que são convencionalmente chamadas de haplótipos, sendo que cada haplótipo corresponde a um conjunto de bases identificadas a partir de um gene sequenciado (Freitas et al., 2009). Portanto, as diferenças entre número e tamanho

dos haplótipos podem ser usadas para estimar a variação genética dentro e entre as populações (Nei, 1987).

Dentro da classe de marcadores moleculares existentes, os microssatélites são os que ocorrem em maior frequência e são aleatoriamente distribuídos pelo genoma nuclear. São também conhecidos como sequências simples repetidas (SSRs - Simple Sequence Repeats) ou repetições curtas em tandem (STRs - Short Tandem Repeats), as quais são distribuídas abundantemente pelo genoma eucariótico e demonstram altos níveis de polimorfismo alélico (Oliveira et al., 2006).

Os locos SSR parecem ser geneticamente estáveis, possuem expressão codominante, são altamente multialélicos e apresentam segregação mendeliana. Em uma população, todos os alelos daquele loco podem ser detectados e discriminados, fazendo com que os microssatélites estejam entre os marcadores moleculares mais apropriados para mapeamento genético e físico de genomas, para a identificação e discriminação de genótipos e estudos de genética de populações (Oliveira et al., 2006).

1.3 Estratégias de conservação e manejo

Os sistemas hidrográficos estão extremamente susceptíveis aos efeitos negativos das mudanças ambientais, prejudicando o desenvolvimento natural dos estoques pesqueiros (Godinho e Kynard, 2009). Um dos reflexos dessas alterações é a redução do patrimônio ictiogenético dos ecossistemas originais, trazendo riscos a permanência de muitas espécies de peixes (Barletta et al., 2010).

Para tentar amenizar esta ameaça, várias medidas têm sido tomadas para evitar a extinção das espécies e dentre elas podemos citar uma normativa do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) IN nº 146/07, a qual estabelece que em toda e qualquer entidade que cause impacto ao meio ambiente deve

adotar medidas de proteção dos recursos biológicos (Welcomme, 1988). Entre as ações de manejo que visam reduzir os impactos das ações antrópicas sobre os estoques de peixes, destacam-se: proibição da pesca durante o período de defeso (período de reprodução), controle da pesca, proibição do uso de determinados equipamentos de pesca, programas de estocagem ou repovoamentos; e a construção de mecanismos de transposição de peixes (Hilsdorf et al., 2006; Agostinho et al., 2006).

No entanto, muitas destas estratégias e ações para melhoria ou manutenção dos recursos naturais têm sido realizadas sem respaldo científico, com base simplesmente no senso comum (Agostinho et al., 2005). Um exemplo claro são os programas de repovoamento realizados por diversas entidades e/ou órgãos públicos que, ao negligenciarem atitudes básicas da biologia das espécies, passam a ser questionados quanto à sua eficiência e aos impactos que podem causar na ictiofauna (Agostinho et al., 2005). A ação de repovoamento é uma estratégia de conservação da biodiversidade aquática que consiste em restabelecer populações naturais a partir da liberação de juvenis obtidos de estações de piscicultura (Lopera-Barrero et al., 2007).

A soltura de peixes nos rios é uma prática muito comum no Brasil, desenvolvido principalmente pelas usinas hidrelétricas. No entanto introduções de peixes sem estudos prévios, mesmo feitas com as melhores intenções, podem ocasionar um efeito *bottleneck*, e levar a uma redução da variabilidade genética (Taniguchi, 2003; Povh et al., 2006). Na atual prática da reprodução em cativeiro é comum a utilização de peixes da própria estação de piscicultura como reprodutores, sendo provável o acasalamento entre reprodutores aparentados geneticamente (Povh et al., 2006), levando ao aumento da homozigose (Moreira et al., 2003). Quando soltos em ambiente natural podem levar a diminuição da variabilidade genética da população selvagem, pela mistura de grupos nativos, geneticamente adaptados ao meio ambiente com grupos reproduzidos em

cativeiro, frequentemente com elevado grau de consanguinidade, reduzindo assim a capacidade dos peixes suportarem às variações ambientais (Povh et al., 2008).

Dessa forma, a manutenção da variabilidade genética é importante para a efetividade dos programas de repovoamento a fim de evitar efeitos indesejáveis na ictiofauna (O-Connel e Wright, 1997; Hallerman, 2003; Sirol e Britto, 2006).

1.4 Reprodução de peixes em cativeiro

A manutenção de espécimes em seu habitat natural é denominada de conservação *in situ*. Essa é, sem dúvidas, a melhor estratégia para a preservação da diversidade biológica, pelo fato de permitir a continuação dos processos evolucionários naturais e o ciclo de vida natural das espécies (Primack e Rodrigues, 2002). Contudo, a conservação *ex situ* é uma alternativa muito utilizada nos dias de hoje para a preservação de espécies ameaçadas de extinção, propiciando a criação de bancos genéticos para aquelas espécies que perderam seus habitat pela degradação ambiental (Degreef et al. 2002; Pompelli e Guerra, 2004).

Deve ser levado em consideração que peixes reofílicos, em sua maioria não se reproduzem naturalmente em cativeiro, sendo necessária a indução da reprodução com o uso de hormônios hipotalâmicos e gonadotróficos (Ninhaus-Silveira, 2007). Na reprodução de espécies em cativeiro, é viável empregar técnicas de reprodução assistida para o aumento do número de indivíduos, que poderão ser encaminhados para programas de reintrodução ou acréscimo de espécimes ao meio ambiente (Foose e Wiese, 2006).

Muito embora exista tecnologia de propagação artificial para diferentes espécies nativas e esta tecnologia vem sendo relativamente desenvolvida no Brasil, a

concentração de estudos foca principalmente espécies com potencial para aquicultura, sendo escassas pesquisas voltadas para “conservação”.

1.5 A piracanjuba, *Brycon orbignyanus*

A piracanjuba (Figura 1) pertence ao gênero *Brycon* (Bryconidae, Characiformes) e sua distribuição vai desde Honduras (Bussing, 1976) até o Rio da Prata, na Argentina (Fowler, 1950), apresentando mais de 60 espécies com ampla distribuição geográfica na região Neotropical.



Figura 1 – Piracanjuba *Brycon orbignyanus*. Exemplar medindo 41 cm.

A espécie *B. orbignyanus* (Valenciennes, 1849) é um animal grande, de corpo alongado, apresentando cabeça com duas grandes fontanelas e as escamas, tanto abaixo como acima da linha lateral, são muito semelhantes entre si quanto à forma. A linha lateral é completa, curvada anteriormente e está localizada abaixo da linha mediana do corpo. Possui ventre arredondado tornando o corpo fusiforme, sobretudo em formas jovens, com maxilar e mandíbula geralmente do mesmo comprimento. Possui dentes pentacuspídeos tricuspídeos no aspecto externo sem rebaixar a mucosa, dispostos em três séries no pré-maxilar, uma série no maxilar com muitos dentes e uma série de

dentados no dentário com dois dentes cônicos situados próximos da sínfise. Apresentam ainda numerosos branquiespinhos, raios medianos da cauda ligeiramente mais longos formando uma ponta marginal (Godoy, 1975). A piracanjuba apresenta coloração alaranjada e cauda vermelha com uma faixa preta iniciada no pedúnculo caudal (Vaz et al., 2000).

Esta espécie encontra-se amplamente distribuída na Bacia do Prata, que é a segunda maior bacia hidrográfica do planeta, com 1.397.905 km², estendendo-se por diferentes países como Brasil, Uruguai, Bolívia, Paraguai e Argentina, sendo originada pela junção dos principais rios desta região, o Paraná, o Paraguai e o Uruguai.

A piracanjuba realiza deslocamentos migratórios reprodutivos, sendo que no baixo rio Paraná e rio Uruguai, na Argentina e Uruguai, ela migra em direção descendente nos rios em outubro e em direção ascendente em março, quando as águas começam a esfriar (Ringuelet et al, 1967). Contudo, no alto Paraná, de modo oposto ao que acontece no baixo Paraná e rio Uruguai, 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).

Devido a este caráter migratório e dependente de condições preservadas de mata ciliar, qualidade e fluxo de água, *B. orbignyana* é uma espécie sensível à degradação ambiental. Estas características e juntamente com o fato desta espécie despertar grande interesse de pescadores esportivos e profissionais, tornaram a antiga grande população nativa original em fragmentos pequenos isolados por barragens (Godoy, 1975; Paiva, 1982).

2. OBJETIVOS

O manejo de recursos pesqueiros necessita de um amplo conhecimento de todos os componentes do sistema, que compreendem peixes, ambientes e outros organismos. A interação entre esses componentes é tão forte que ações isoladas podem acarretar no fracasso dos programas de conservação (Agostinho; Thomaz e Gomes, 2005) e tornarem-se uma ameaça para o ecossistema (Povh, 2007).

No entanto, não existem dúvidas de que a atividade de repovoamento se tornará cada vez mais importante como ferramenta para manejo de rios e manutenção de estoques naturais de peixes altamente explorados, com risco de extinção (Godinho e Godinho, 2003). O repovoamento, como prática de manejo visando à manutenção de determinada espécie em seu ambiente natural, deve ser precedido de estudos que definam as espécies a serem trabalhadas, o local e período de soltura, o tamanho dos indivíduos, a capacidade de suporte do ambiente, a origem dos exemplares no tocante à qualidade genética, bem como os mecanismos de controle e monitoramento desta ação (Agostinho et al., 2007).

Concomitante às análises genéticas, a melhora do manejo reprodutivo deve ser também realizada, já que um manejo inadequado, resultado de práticas de acasalamentos com baixo número de reprodutores, pode trazer problemas ao promover a perda da variabilidade genética (Aho et al., 2006). Por isso, é necessário e extremamente importante o desenvolvimento de estudos genéticos e reprodutivos adequados que diminuam os potenciais riscos para estas ações.

2.1 Objetivo geral

Este estudo tem como objetivo principal realizar a reprodução em cativeiro de *B. orbignyana* de diferentes locais de origem, assistida por análises genéticas do DNA

mitocondrial e, também de marcadores moleculares do tipo microssatélite, de forma a produzir juvenis adequados para o uso em programas de manejo.

2.2 Objetivos específicos

- ✓ Realizar cruzamentos dirigidos entre indivíduos pertencentes a grupos de reprodutores de *B. orbignyanus* com características genéticas distintas para a produção de juvenis.
- ✓ Estimar a variabilidade genética dos estoques parentais e dos descendentes produzidos utilizando marcadores genéticos moleculares dos tipos *D-loop* e microssatélite para os grupos mantidos em cativeiro, originados dos cruzamentos dirigidos.
- ✓ Estimar a compatibilidade genética dos grupos originados dos cruzamentos dirigidos pelas análises estatísticas F de Wright.
- ✓ Identificar grupos genéticos de indivíduos compatíveis com as condições de inserção no ambiente, de modo a promover a manutenção da variabilidade da espécie e a sua conservação nos ambientes naturais.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Cruzamentos dirigidos em cativeiro e obtenção de amostras

O trabalho experimental foi desenvolvido no Centro Nacional de Pesquisa e Conservação de Peixes Continentais – CEPTA, órgão vinculado ao Instituto Chico

Mendes de Conservação da Biodiversidade – ICMBio, localizado no município de Pirassununga/SP, Brasil.

Para os cruzamentos foram utilizados reprodutores selvagens adultos oriundos do Rio Ivinhema, componente da bacia do Rio Paraná e reprodutores de geração F2 mantidos em cativeiro, oriundos de cruzamentos realizados na Estação de Piscicultura de Jupiá, pertencente à Companhia Energética de São Paulo (CESP). A organização dos grupos experimentais está descrita na Tabela 1.

Para realização dos cruzamentos os animais foram selecionados conforme as características reprodutivas (papila urogenital dilatada nas fêmeas e vertência de sêmen nos machos) e submetidos ao processo reprodutivo conforme Ceccarelli e colaboradores (2005). Os cruzamentos foram realizados da seguinte forma:

- ✓ exemplares de cativeiro x exemplares de cativeiro
- ✓ exemplares de cativeiro x exemplares selvagens
- ✓ exemplares selvagens x exemplares selvagens

Além dos exemplares obtidos nestes cruzamentos foram analisados outros juvenis oriundos de outras três estações produtoras de juvenis destinados ao repovoamento para comparação e avaliação de sua variabilidade genética.

Tabela 1 Identificação de cada cruzamento, origem e procedência de cada grupo amostrado.

Sigla	Origem dos animais
Cativeiro_BM	Oriundos de lote mantidos na Piscicultura Brumado (Mogi-Mirim/SP)
Cativeiro_CT	Animais F3 resultantes de Cruzamentos da Estação de Piscicultura de Jupiá (CESP)
Cativeiro_CVT	Cruzamento de 1 fêmea cativeiro (F2) com 3 machos selvagens (Rio Ivinhema)
Cativeiro_JB	Animais de Cruzamentos da Estação de Piscicultura de Volta Grande (MG)
Cativeiro_JT	Animais de Cruzamentos da Estação de Piscicultura de Volta Grande.(MG)
Cativeiro_PP	Animais oriundos de Piscicultura Polentini (Mogi-Mirim/SP)
Selvagem_SCD	Cruzamento de 1 fêmea selvagem (Rio Ivinhema) com 3 machos de cativeiro (F2)
Selvagem_SCI	Cruzamento de 1 fêmea selvagem com 3 machos selvagens (ambos do Rio Ivinhema)
Selvagem_SCU	Cruzamento de 1 fêmea selvagem (Rio Ivinhema) com 3 machos cativeiro (F2)
Selvagem_SLA	Cruzamento de 1 fêmea selvagem com 3 machos selvagens (ambos do Rio Ivinhema)
Selvagem_SSU	Cruzamento de 1 fêmea selvagem com 3 machos selvagens (ambos do Rio Ivinhema)

Análises genéticas dos juvenis através de marcadores moleculares

Extração de DNA

Para as análises genéticas, o DNA total foi obtido a partir de amostras de tecido animal coletadas dos juvenis de *B. orbignyana* provenientes dos diferentes cruzamentos. Um pequeno fragmento da nadadeira adiposa foi retirado e conservado em álcool, sendo tomados os devidos cuidados para manter a integridade dos indivíduos amostrados na tentativa de devolvê-los vivos ao ambiente. A extração do DNA total seguiu o protocolo de extração proposto por Aljanabi e Martinez (1997), sendo que eventualmente também foi utilizado o protocolo descrito por Ivanova, et al. (2006).

Amplificação e Sequenciamento da região D-Loop

Para a reação em cadeia da polimerase (PCR) para a amplificação do fragmento correspondente à região controladora do DNA mitocondrial (*D-loop*) foi utilizado um par de *primers* descritos por Sivasundar e colaboradores (2001) para a espécie *Prochilodus lineatus* (FTTF: 5' GCCTAAGAGCATCGGTCTTGTA 3' e RCR1 (5' CCTGAAGTAGGAACCAGATG 3') o qual se mostraram eficientes para a espécie *B. orbignyana*. A amplificação foi realizada em termociclador Veriti 96, *Applied Biosystems* onde foi amplificado um fragmento de aproximadamente 700pb. Utilizando-se o protocolo para amplificação recomendado pelo fabricante da Platinum® Taq DNA Polymerase, Invitrogen. Os segmentos de DNA amplificados nas reações de PCR foram visualizados em gel de agarose 0,8%. O DNA purificado foi sequenciado segundo o protocolo de reação do kit DYEnamic ET Dye Terminator (*Applied Biosystems*) em sequenciador automático modelo ABI 3130. Foram sequenciados tanto os fragmentos em ambas as direções, sendo que as sequências consenso foram obtidas pelo software

Geneious versão 4.8.5. As sequências foram analisadas através dos softwares DNAsp Sequence Polymorphism (Rokas et al.2003) e Arlequin 3.1 (Excoffier et al. 2005)

Amplificação de locus e marcação com microssatélites

Primers descritos por Barroso et. al. (2003) com a espécie *Brycon opalinus* e Sanches e Galetti (2006) com *Brycon hilarii* (Tabela 2) foram utilizados no processo de amplificação das amostras de DNA dos espécimes em estudo, sendo que as reações seguiram o protocolo geral de amplificação recomendado pelo fabricante da Platinum® Taq DNA Polymerase, Invitrogen. A temperatura de anelamento dos *primers* foi adequada para todos os *locus*, sendo hibridização padronizada a TA 53°C por 30s. Os microssatélites foram genotipados em sequenciador automático de DNA modelo ABI 3130 e analisados através do programa GeneMapper.

Tabela 2 Sequências de nucleotídeos das repetições *motifs*, dos *primers* dos *loci* microssatélite analisados para *B. orbignyianus*.

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

Foram realizadas análises de testes exatos para equilíbrio de Hardy-Weinberg, (Guo; Thompson, 1992) nos *loci* através do programa computacional GENEPOP versão 1.3 (Raymond; Rousset, 1995). Os níveis de variação genética foram baseados em valores de heterozigosidade observada (H_o), heterozigosidade esperada (H_e), porcentagem de loci polimórficos (P) e número médio de alelos por *locus*.

4. RESULTADOS

D-loop

Foram analisadas 225 amostras de *B. orbignyanus* com o uso do marcador mitocondrial (*D-loop*). Nesta análise foi possível identificar 4 haplótipos (Tabela 3 e Figura 2), sendo que o haplótipo 2 se mostrou mais frequente (Grupos 2, 4, 7, 9 e 11), sendo encontrado em animais selvagens oriundos do Rio Ivinhema e principalmente entre os animais de cativeiro. O haplótipo 1 apresentou-se apenas nos grupos 1 e 3 que historicamente tiveram reprodutores oriundos do Rio Verde, mas que ao longo dos anos foram reproduzidos em cativeiro. O haplótipo 3 está restrito aos exemplares provenientes da Piscicultura Polentini que provavelmente usou reprodutores geneticamente distintos, enquanto o haplótipo 4 foi encontrado em animais oriundos do Rio Ivinhema.

Tabela 3 Número de indivíduos por haplótipo e sua distribuição dentro dos grupos de *B. orbignyanus*

<i>Haplótipos</i>	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Hap_1	8	0	18	0	0	0	0	0	0	0	0
Hap_2	0	22	0	23	34	0	9	0	6	0	12
Hap_3	0	0	0	0	0	39	0	0	0	0	0
Hap_4	0	0	0	0	0	0	0	25	0	29	0

Pop: 1=Cativeiro_BM; 2 = Cativeiro_CT; 3 Cativeiro_CVT; 4 = Cativeiro_JB; 5 = Cativeiro_JT;
6 = Cativeiro_PP; 7 = Selvagem_SCD; 8 = Selvagem_SCI; 9 = Selvagem_SCU; 10 =
Selvagem_SLA; 11 = Selvagem_SSU

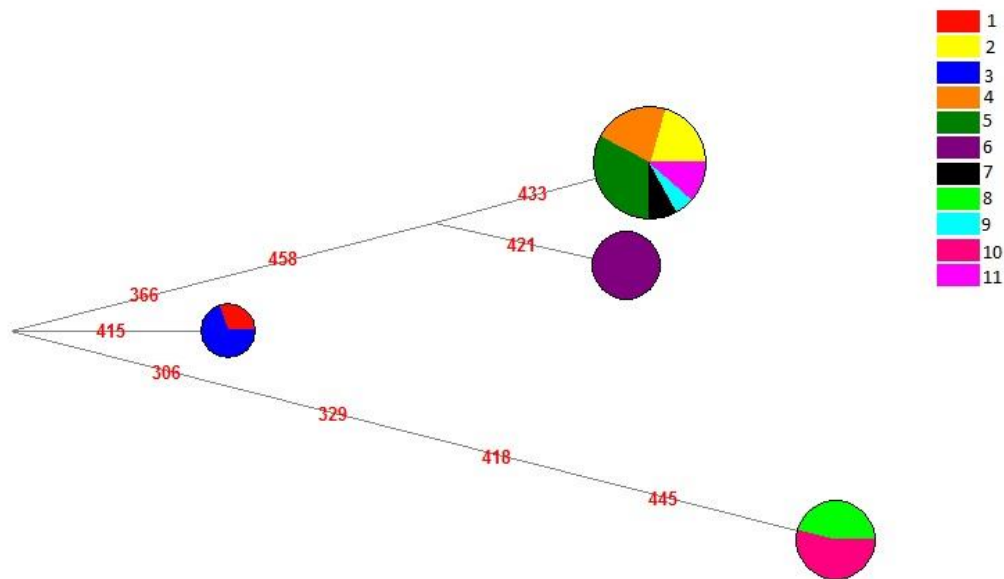


Figura 2 – Rede de haplótipos de *B. orbignyana* construída através de análise da região mitocondrial D-loop. Pop: 1=Cativeiro_BM; 2 = Cativeiro_CT; 3 Cativeiro_CVT; 4 = Cativeiro_JB; 5 = Cativeiro_JT; 6 = Cativeiro_PP; 7 = Selvagem_SCD; 8 = Selvagem_SCI; 9 = Selvagem_SCU; 10 = Selvagem_SLA; 11 = Selvagem_SSU. *Números em vermelho corresponde a localidade das bases mutacionais.

Entre os cruzamentos realizados no CEPTA foram identificados 4 haplótipos, sendo que o haplótipo 1 é encontrado na fêmea de cativeiro e os haplótipos 2 e 4 entre cinco fêmeas selvagens. Os dados obtidos através do AMOVA (Tabela 4) devem ser considerados com atenção, uma vez que os valores encontrados apresentaram-se elevados ($F_{ST}=1.000$), uma vez que cada grupo apresentava diferenças genéticas entre si.

Tabela 4 Análise da variância molecular (AMOVA) e F_{ST} , utilizando marcador mitocondrial *D-Loop* entre os grupos de *B. orbignyana*.

Origem de variação	d.f.	Soma dos quadrados	Os componentes de variância	Percentual de variação	F_{ST}
Entre os grupos	3	193.930	0.66512Va	32.06	1.00000
Entre as populações dentro dos grupos	7	184.639	1.40970Vb	67.94	
Dentro das populações	214	0.000	0.00000Vc	0.00	
Total	224	378.569	207.481		

Microssatélites

Para as análises com marcador microssatélite foram analisadas 273 amostras, distribuídas em 10 grupos, sendo que o grupo Selvagem_SCU resultado do cruzamento de 1 fêmea selvagem (Rio Ivinhema) com 3 machos cativo (F2) não teve suas amostras amplificadas e por isso foi excluído das análises. Somente o grupo Cativo_CT não apresentou FIS negativo em nenhum de seus *locus*; em todas as outras populações há pelo menos um *locus* em que a heterosidade observada supera a heterosidade esperada, levando conseqüentemente ao FIS negativo (Tabela 5).

Os maiores valores de heterosidade observada foram encontrados em Cativo+Selva_CVT para os *locus* BH5 e BH13, Selvagem_SSU para *locus* BH13 e Selvagem+Cati_SCD *locus* BH5 (1.0000), enquanto o menor valor encontrado foi em Selvagem_SCI para *locus* BOM6 (0.17241) (Tabela 5).

Tabela 5 Dados de quatro *loci* microssatélites utilizados nas análises de cada grupo de *B. orbignyana*. N = número de indivíduos; Na = número de alelos; Ho = heterosidade observada; He = heterosidade esperada; FIS = índice de fixação (endogamia); HWE = valores probabilísticos de concordância com o equilíbrio de Hardy-Weinberg; * = $P \leq 0,0125$ ajustados com a correção de Bonferroni.

Grupos	Locus			
	BH5	BH13	BOM6	BOM13
Cativo BM				
N	13	12	14	13
Na/Np	5/2	2	3	4
Ho	0.69231	0.75000	0.71429	0.69231
HE	0.71385	0.48913	0.56085	0.67385
FIS	0.0314	-0.5714	-0.2871	-0.0286
HWE	0.00197*	0.09272	0.00314*	0.04400
Cativo+Selva_CVT				
N	20	20	20	20
Na/Np	3	2	5	6/1
Ho	1.00000	1.00000	0.65000	0.65000
HE	0.63590	0.51282	0.63077	0.57949
FIS	-0.5966	-1.0000	-0.0313	-0.1253
HWE	0.00004*	0.00000*	0.82723	0.52438
Cativo CT				
N	29	31	21	28
Na/Np	7	6	3	5/1
Ho	0.75862	0.35484	0.33333	0.32143
HE	0.76407	0.58170	0.48664	0.76039
FIS	0.0073	0.3939	0.3204	0.5818

HWE	0.00000*	0.00648*	0.00036*	0.00000*
Cativeiro_JB	BH5	BH13	BOM6	BOM13
N	39	41	28	31
Na/Np	8/1	9/1	6	11/1
Ho	0.92308	0.75610	0.53571	0.71875
HE	0.75291	0.80849	0.71753	0.83879
FIS	-0.2297	0.0656	0.2569	0.1451
HWE	0.00000*	0.02654	0.00324*	0.00007*
Cativeiro_PP	BH5	BH13	BOM6	BOM13
N	30	36	33	40
Na/Np	7/1	8	5	5
Ho	0.33333	0.88889	0.48485	0.77500
HE	0.50339	0.82238	0.51469	0.69652
FIS	0.3417	-0.0821	0.0588	-0.1143
HWE	0.04403	0.00058*	0.31086	0.09572
Cativeiro_JT	BH5	BH13	BOM6	BOM13
N	36	36	32	38
Na/Np	5	4	6	7
Ho	0.91667	0.66667	0.56250	0.97368
HE	0.59233	0.63459	0.73462	0.80702
FIS	-0.5598	-0.0513	0.2372	-0.2099
HWE	0.00000*	0.76868	0.00050*	0.00079*
Selvagem_SCI	BH5	BH13	BOM6	BOM13
N	29	26	29	29
Na	4	2	4	3
Ho	0.68966	0.92308	0.17241	0.68966
HE	0.72172	0.50679	0.68179	0.67756
FIS	0.0452	-0.8519	0.7504	-0.0182
HWE	0.00919*	0.00002*	0.00000*	0.00000*
Selvagem_SLA	BH5	BH13	BOM6	BOM13
N	30	29	30	30
Na/Np	3	4/1	8/2	4
Ho	0.73333	0.90000	0.42308	0.93333
HE	0.61186	0.58588	0.65611	0.64689
FIS	-0.2026	-0.5505	0.3597	-0.4539
HWE	0.16962	0.00000*	0.00006*	0.00001*
Selvagem_SSU	BH5	BH13	BOM6	BOM13
N	10	11	11	11
Na/Np	4	8	5	4
Ho	0.60000	1.00000	0.81818	0.45455
HE	0.50000	0.85714	0.72727	0.69697
FIS	-0.2135	-0.1765	-0.1321	0.3590
HWE	1.00000	0.45202	0.16784	0.01917
Selvagem+Cati_SCD	BH5	BH13	BOM6	BOM13
N	11	12	10	8
Na/Np	5	8	4	5
Ho	1.00000	0.75000	0.50000	0.62500
HE	0.71429	0.85870	0.77895	0.70833
FIS	-0.4286	0.1316	0.3706	0.1250
HWE	0.05975	0.53747	0.25261	0.60612

O grupo Cativeiro+Selva_CVT apresentou a menor média de heterozigosidade esperada (0,58974) e a maior heterozigosidade observada (0,82500) (Tabela 6), já o

grupo Cativoiro_CT apresentou a menor valor para heterozigidade observada média (0,44206) e a Cativoiro_JB a maior heterozigidade esperada (0,77943).

Tabela 6 Heterozigidade média observada e esperada dos grupos de cativoiro e selvagens.

Grupo Cativoiro	Médias	
	Ho	He
Cativoiro_BM	0,71223	0,60942
Cativoiro_CT	0,44206	0,6482
Cativoiro_JB	0,73341	0,77943
Cativoiro_PP	0,62052	0,63424
Cativoiro_JT	0,779880	0,69214
Total	0,657620	0,67269

Grupo Selvagem	Médias	
	Ho	He
Cativoiro+Selva_CVT	0,825	0,58974
Selvagem_SCI	0,61870	0,64696
Selvagem_SLA	0,74744	0,62519
Selvagem_SSU	0,71818	0,69535
Selvagem+Cati_SCD	0,71875	0,76507
Total	0,725614	0,66446

O número de alelos (N_a) foi estimado para cada *locus* e para cada amostra (Tabela 7), sendo que a maior quantidade de alelos foi identificada para o *locus* BoM13 da amostra Cativoiro_JB (11). Considerando-se o comparativo entre grupos, o maior valor médio de alelos foi identificado também para a amostra de Cativoiro_JB (8,5) e o menor valor médio para Selvagem_SCI (3,25).

Tabela 7 Frequência alélica de cada alelo por *locus* e por população obtidos através de marcador microssatélite para *B. orbignyianus*.

<i>Locus</i>	Alelo/n	BM	CVT	CT	JB	PP	JT	SCI	SLA	SSU	SCD
Bh5	N	13	20	29	39	30	36	29	30	10	11
	158	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,379	0,000	0,100	0,000
	160	0,192	0,300	0,000	0,000	0,183	0,000	0,121	0,533	0,000	0,000
	162	0,038	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	164	0,423	0,500	0,034	0,013	0,050	0,014	0,000	0,000	0,000	0,045
	170	0,000	0,000	0,000	0,013	0,033	0,000	0,000	0,183	0,000	0,000
	172	0,308	0,200	0,034	0,000	0,000	0,000	0,310	0,283	0,000	0,000
	174	0,000	0,000	0,000	0,000	0,017	0,000	0,190	0,000	0,050	0,000
	202	0,038	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	214	0,000	0,000	0,000	0,013	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	222	0,000	0,000	0,000	0,000	0,017	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	224	0,000	0,000	0,052	0,051	0,000	0,042	0,000	0,000	0,150	0,273
	226	0,000	0,000	0,310	0,372	0,017	0,403	0,000	0,000	0,000	0,182

		250	0,000	0,000	0,034	0,090	0,000	0,042	0,000	0,000	0,000	0,045
		252	0,000	0,000	0,310	0,167	0,683	0,000	0,000	0,000	0,700	0,455
		254	0,000	0,000	0,224	0,282	0,000	0,500	0,000	0,000	0,000	0,000
Bh13	N		12	20	31	41	36	36	26	30	11	12
		146	0,000	0,000	0,000	0,000	0,083	0,000	0,000	0,000	0,045	0,000
		150	0,000	0,000	0,016	0,037	0,083	0,014	0,000	0,000	0,045	0,042
		156	0,000	0,000	0,000	0,061	0,083	0,000	0,000	0,000	0,182	0,083
		158	0,000	0,000	0,000	0,024	0,000	0,000	0,000	0,000	0,091	0,042
		160	0,000	0,000	0,032	0,037	0,319	0,375	0,000	0,000	0,273	0,125
		164	0,000	0,000	0,419	0,256	0,125	0,458	0,000	0,000	0,091	0,208
		168	0,000	0,000	0,000	0,037	0,083	0,000	0,000	0,000	0,000	0,042
		170	0,000	0,000	0,000	0,293	0,000	0,153	0,000	0,000	0,045	0,208
		172	0,000	0,000	0,500	0,195	0,208	0,000	0,000	0,000	0,227	0,250
		174	0,000	0,000	0,000	0,061	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
		226	0,375	0,500	0,000	0,000	0,000	0,000	0,462	0,450	0,000	0,000
		250	0,000	0,000	0,016	0,000	0,000	0,000	0,000	0,033	0,000	0,000
		252	0,625	0,500	0,016	0,000	0,014	0,000	0,538	0,467	0,000	0,000
Bom6	N		14	20	21	28	33	32	29	26	11	10
		125	0,071	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,077	0,000	0,000
		135	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,019	0,000	0,000
		139	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,019	0,000	0,000
		141	0,000	0,000	0,000	0,000	0,076	0,000	0,000	0,000	0,045	0,000
		147	0,000	0,000	0,000	0,018	0,000	0,000	0,017	0,019	0,000	0,000
		151	0,000	0,025	0,143	0,179	0,000	0,047	0,000	0,019	0,045	0,200
		153	0,000	0,000	0,690	0,071	0,045	0,250	0,000	0,538	0,318	0,300
		155	0,357	0,225	0,000	0,018	0,682	0,031	0,276	0,000	0,182	0,200
		157	0,000	0,000	0,167	0,393	0,076	0,156	0,310	0,077	0,409	0,300
		159	0,571	0,175	0,000	0,000	0,121	0,094	0,397	0,000	0,000	0,000
		161	0,000	0,025	0,000	0,321	0,000	0,422	0,000	0,000	0,000	0,000
		167	0,000	0,550	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,231	0,000	0,000
Bom13	N		13	20	28	31	40	38	29	30	11	8
		179	0,385	0,625	0,000	0,097	0,413	0,000	0,345	0,483	0,091	0,125
		181	0,038	0,025	0,036	0,129	0,013	0,026	0,310	0,000	0,455	0,250
		183	0,000	0,000	0,232	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
		185	0,000	0,000	0,250	0,129	0,000	0,000	0,345	0,017	0,318	0,500
		187	0,423	0,025	0,143	0,323	0,175	0,263	0,000	0,300	0,000	0,063
		189	0,154	0,000	0,339	0,177	0,000	0,250	0,000	0,000	0,000	0,000
		194	0,000	0,175	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
		197	0,000	0,000	0,000	0,000	0,325	0,000	0,000	0,200	0,000	0,063
		199	0,000	0,100	0,000	0,016	0,075	0,211	0,000	0,000	0,136	0,000
		201	0,000	0,050	0,000	0,065	0,000	0,039	0,000	0,000	0,000	0,000
		203	0,000	0,000	0,000	0,048	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
		205	0,000	0,000	0,000	0,016	0,000	0,145	0,000	0,000	0,000	0,000
		207	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,066	0,000	0,000	0,000	0,000

Pela análise de variância molecular (AMOVA) foi possível identificar que a maior fonte de variação está presente entre os indivíduos (75.95%), sendo que o valor atribuído ao índice de fixação interpopulacional ($F_{ST} = 0.24046$) foi considerado alto, indicando uma alta estruturação genética entre os dez grupos avaliados (Tabela 8).

Tabela 8 Análise da variância molecular (AMOVA) e FST, entre os grupos de *B. orbignyana*, com marcadores microsatélites. * $P < 0,05$, após correção sequencial de Bonferroni.

Fonte de variação	Soma dos quadrados	Componentes de variação	% de variação	FST
Entre as populações	194,957	0.42531	24.04557	0.24046*
Dentro das populações	642.249	1.34347	75.95443	
Total	837.206	1.76878		

5. DISCUSSÃO

Diversos estudos têm mostrado os possíveis impactos genéticos da liberação de peixes cultivados no ambiente aquático (Ward, 2006; González-Wangüemerta et. al, 2010). Os padrões de DNA mitocondrial (DNAMt), juntamente com marcadores moleculares do genoma nuclear têm sido reconhecidos como marcadores moleculares potencialmente importantes em estudos de linhagens comerciais e da análise da estrutura populacional de peixes, proporcionando informações seguras sobre os níveis de variabilidade e similaridade genética entre diferentes populações (Ovenden, 1990, Billington e Hebert, 1991; Toledo Filho et al. 1992). Neste trabalho foram utilizados dois tipos de marcadores moleculares, um segmento da grande região não codificadora do DNAMt denominada Região Controle, também chamada de *D-loop* e marcadores do tipo microssatélite, a fim de avaliar melhor os estoques destinados ao repovoamento e à conservação de *B. orbignyanus*, assim como fornecer subsídios científicos para uma maior eficácia das ações de manejo desta espécie de peixe praticadas atualmente.

A análise da rede de haplótipos realizada a partir dos dados obtidos com o marcador mitocondrial *D-loop* permitiu observar a presença de quatro agrupamentos, segundo seus haplótipos. O agrupamento H3 mostrou-se exclusivo para os indivíduos provenientes do estoque da Estação de Piscicultura de Polentini, fato este explicado pela origem de suas matrizes, sendo o único grupo com espécimes oriundos do Rio Verde – MS. Os reprodutores dos plantéis de *B. orbignyanus* das Estações de Piscicultura de Brumado e da CESP (Jupiá) compartilham o mesmo agrupamento (Haplótipo 1), sendo possível concluir que embora de proveniência não identificada, estes estoques apresentam uma mesma origem. Por outro lado, a subpopulação de *B. orbignyanus* proveniente do Rio Ivinhema apresentou alta variabilidade genética e uma estruturação

populacional significativa, em comparação às subpopulações de rios próximos, como aquelas amostradas nos rios Paraná e Verde (Ashikaga et al., 2013). Com base neste fato, dois haplótipos identificados como grupamentos H2 e H4 são observados para o restante dos grupos, sendo que eles foram originados a partir de cruzamentos com fêmeas do Rio Ivinhema.

Durante o processo de reprodução induzida em cativeiro, a perdas de reprodutores por efeito da manipulação são bastante frequentes (Ribolli e Zaniboni-Filho, 2009). No sentido de melhor adequar a técnica de reprodução e prevenir a perda de parcelas nos experimentos, mais de um casal de reprodutores foram utilizados para cada grupo nos cruzamentos dirigidos realizados dentro da Estação de Piscicultura do CEPTA/ICMBio. Contudo, devido à alta mortalidade ainda recorrente, uma vez que esta espécie de peixe é bastante afetada pelo estresse da manipulação e à escassez de fêmeas de *B. orbignyanus*, bons resultados de análise foram obtidos em apenas uma fêmea por grupo no processo reprodutivo. Este fato teve influência nos resultados genéticos populacionais, como no caso da Análise de Variância Molecular (AMOVA), distorcendo o valor de F_{ST} (1,0000) pela presença de apenas um único haplótipo por grupo. Segundo Hilsdorf e colaboradores (2002), a falta de variabilidade encontrada é consistente com o desenvolvimento de um processo de afinamento da população, sendo que tais eventos constituem a principal preocupação em programas de repovoamento e, em decorrência, verifica-se que a variabilidade nos reprodutores apresenta-se geralmente menor do que nas populações selvagens.

As dificuldades para isolar um grande número de marcadores microssatélites têm sido creditadas principalmente ao alto custo do processo de prospecção. Assim, estudos genéticos têm sido realizados utilizando *loci* já descritos na literatura em espécies filogeneticamente próximas (Barbara et al., 2007), utilizando-se frequentemente de

quatro a cinco *loci* microssatélites (Jerry et al., 2006). A partir da análise genética de quatro *loci* microssatélites foi possível distinguir diferentes alelos e estimar a sua frequência nos grupos amostrais. Contudo, nestes casos, a presença de alelos com baixa frequência tanto pode ser um indicativo da presença de alelos raros nas populações selvagens originais (Hiltsdorf et al., 2006) ou a predominância do conjunto genético de um espécime sobre outro.

A predominância do conjunto genético de um indivíduo sobre outro foi observada por Ribolli e Zaniboni-Filho (2009) em estudos reprodutivos e genéticos com *Rhandia quelen*. Tem sido verificado que é bastante utilizado na prática a mistura de sêmen de diferentes machos formando um “*pool* de sêmen” para a fecundação de ovócitos de uma fêmea, na tentativa de se obter uma prole com maior variabilidade genética. Contudo, apesar do *pool* de sêmen ser formado pela mistura de volumes iguais de sêmen proveniente de diferentes indivíduos, a prole resultante deste cruzamento não apresenta proporções genéticas correspondentes ao número de machos utilizados, sendo que a predominância de um genótipo é geralmente observada. Portanto, a progênie resultante sofre variações de variabilidade genética devido à influência de um macho sobre outro. Verificou-se, por outro lado que quando os mesmos machos foram utilizados separadamente, os resultados mostraram-se diferentes.

Em *B. orbignyianus* a metodologia de formação de *pool* de sêmen foi utilizada para se obter parte dos grupos amostrais, sendo este o motivo pelo qual os grupos oriundos de cruzamentos realizados nas dependências do CEPTA/ICMBio resultaram em indivíduos com baixa frequência de alguns alelos. Já nos indivíduos dos grupos provenientes de outras Estações de Pisciculturas não foi possível fazer a mesma inferência por desconhecimento do número efetivo dos reprodutores utilizados.

A seleção natural opera na variação genética presente em populações selvagens e irá selecionar no sentido de preservar determinados genótipos e complexos de genes que maximizam a aptidão dos indivíduos em um ambiente específico (Ward, 2006). Genótipos coadaptados irão surgir e serão susceptíveis de variar de população para população, dependendo das forças seletivas locais. Restrição de fluxo gênico entre as populações irá promover a divergência adaptativa de diferentes populações (Ward, 2006). Neste caso, o monitoramento genético das populações selvagens de cada localidade deve ser estabelecido, a fim de se evitar a introdução de indivíduos não adaptados àquele ambiente.

Para assegurar a manutenção das populações no ambiente selvagem, é de fundamental importância garantir um tamanho populacional adequado e uma variabilidade genética suficiente, de forma que permita a adaptabilidade das populações às diferentes condições ambientais (Hallerman, 2003; Champagnon et al., 2012). Em se tratando de grupos mantidos em cativeiro e reproduzidos com número de matrizes limitadas, era de se esperar que a variabilidade genética das progênes fosse baixa (Barroso et al., 2005; Panarari-Antunes et al., 2011). Contudo, não foi este o fato observado no presente trabalho e também em trabalhos com outras espécies de *Brycon*, uma vez que os grupos apresentaram valores altos de variabilidade genética para populações em cativeiro (Barroso et al., 2005; Matsumoto e Hilsdorf, 2009; Panarari-Antunes et al., 2011). Embora possa ser considerada alto o valor de heterozigosidade observada para cada *locus*, a média da heterozigosidade observada de cada grupo nos revela que os originados pelo cruzamento de matrizes selvagens é maior que daqueles formados por matrizes já mantidas em cativeiro.

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. O maior tamanho populacional, maior fluxo gênico, cruzamentos aleatórios e a presença pressões seletivas, são fatores que levaram, com o passar dos anos, à seleção de indivíduos mais adaptados e, conseqüentemente, formando grupos com maior variabilidade genética (Fraser e Bernatchez, 2001; Allan e Flecker, 2003).

Apesar de apresentar e ainda manter um valor alto de variabilidade comparada com outros trabalhos de estoque de cativeiro (Was e Wenne, 2002; Barroso et al. 2005) com o passar dos anos e o aumento da endogamia poderá resultar em uma diminuição da variabilidade genética, limitando, assim, o potencial genético da espécie (Rodríguez-Rodríguez et al, 2010; Hedrick et al., 2012). A consanguinidade dos indivíduos utilizados no processo reprodutivo leva a erosão genética, tornando os indivíduos da população mais aparentados e conseqüentemente elevando a homozigose, expondo genes recessivos deletérios à seleção e eliminando a aptidão decorrente de excesso de dominância (Ward, 2006). De acordo Romana-Eguia et al. (2004), tal fato é sempre esperado em lotes mantidos em cativeiro, sendo que os desvios nas frequências possivelmente causados pela deriva genética tendam a aumentar ao longo das gerações.

Populações naturais podem ser geneticamente estruturadas, isto é, formadas por subpopulações com composição genética definida, adaptadas e equilibradas em relação a determinadas condições ambientais (Foresti et al., 1992). Estas subpopulações devem ter sua variabilidade genética identificada e considerada nos programas de conservação (Wasko et al, 2004; Panarari-Antunes et al., 2011). O presente estudo revelou uma alta diferenciação nas populações, de acordo com os parâmetros estabelecidos por Wright (1978), segundo os quais valores de F_{ST} entre 0,15 e 0,25 indicam alta diferenciação genética, e valores superiores a 0,25 indicam que as populações eram geneticamente

muito diferentes. Segundo Lafreve et al., (2004), o número restrito de parentais aliado à endogamia histórica das matrizes reflete-se num alto valor de diferenciação interpopulacional (FST). Através de suas populações naturais, os indivíduos com graus variados de diversidade podem ser usados como reprodutores nos programas de repovoamento, desde que a diversidade genética das sub-populações selvagens sejam mantidos nas populações produzidas em cativeiro, fazendo com que o estabelecimento destes indivíduos possa ser bem sucedido (Wasko et al., 2004).

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com o crescimento econômico brasileiro e a necessidade cada vez maior de recursos energéticos, a construção de empreendimentos hidroelétricos tem conseqüentemente crescido. Tais empreendimentos, quando construídos sucessivamente em cascata nos rios brasileiros têm causado a interrupção das rotas migratórias de muitas espécies de peixes comercialmente importantes. Como medida de proteção e manutenção da diversidade, os programas de repovoamento são inevitáveis. Diante disto para a melhoria da produção destinada ao manejo de populações selvagens de peixes em regiões impactadas, devem ser colocados em prática cuidados para evitar a perda de variação genética e acúmulo de endogamia. Para isso, deve-se aumentar o número de reprodutores e renovar constantemente o plantel com indivíduos selvagens provenientes das áreas a serem manejadas. Além disso, o monitoramento dos níveis de variação genética em populações mantidas em cativeiro e em populações selvagens deve ser realizado constantemente, tanto para gerar informações preliminares para a tomada de ações conservacionistas, quanto para o estabelecimento de práticas adequadas de manejo, a fim de se evitar maiores impactos ao ambiente.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGOSTINHO A. A.; GOMES L. C. e PELICICE F. M. (2007) Ecologia e manejo de recursos pesqueiros em reservatórios do Brasil. Maringa: EDUEM. p. 227-381.

AGOSTINHO, A. A., GOMES, L. C., FERNANDEZ, D. R. and SUZUKI, H. I. (2002) Efficiency of fish ladders for Neotropical Ichthyofauna. *River Research and Applications* 3:299–306.

AGOSTINHO, A. A.; THOMAZ, S.; GOMES, L. C. (2005). Conservation of the biodiversity of Brazil's inland waters. *Conservation Biology*, v. 19, p.646-652,

AHO, T. et al. (2006). Impacts of effective population size on genetic diversity in hatchery reared Brown trout (*Salmo trutta* L.) populations. *Aquaculture*, v. 253, p.244-248.

ALJANABI, S.M., MARTINEZ, I. (1997). Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. *Nucleic Acid Res*, 25 (22), 4692-4693.

ANDRADE, E. S.; ARAUJO, J. C. (2011). Medidas mitigadoras dos impactos ambientais causados por usinas hidrelétricas sobre peixes. *Revista Electrónica de Veterinária*. v. 12, n. 3, p.1-30, mar. Disponível em: <<http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n030311.html>>. Acesso em: 12 dez. 2013.

ASHIKAGA, F. Y. (2008). Estudo da estrutura genética de *Leporinus friderici* (Characiformes, Anostomidae) das escadas para transposição de peixes do complexo Canoas – rio Paranapanema. Dissertação de mestrado. Universidade Estadual de Londrina. Londrina/PR.

AVISE, J. C. (1994). *Molecular markers, natural history and evolution*. NewYork: Chapman e Hall.

AVISE, J. C. (2004). *Molecular Markers, Natural History, and Evolution*. 2. ed. Nova York: Sinauer Associates, Inc. 541 p.

BARBARA, T, PALMA-SILVA, C., PAGGI, G.M., BERED, F., FAY, M. F., LEXER C: (2007) Cross-species transfer of nuclear microsatellite markers: potential and limitations. *Molecular Ecology* 16(18):3759-3767.

BARLETTA, M.; et al., (2010) Fish and aquatic habitat conservation in South America: a continental overview with emphasis on Neotropical systems. *Journal of Fish Biology*, 76: 2118-2176.

BARROSO, R. M., HILSDORF, A. W. S.; MOREIRA, H. L. M.; MELLO, A. A.; GUIMARÃES, S. E. F.; CABELLO, P. H.; TRAUB-CSEKO, Y. M. (2003). Identification and characterization of microsatellites loci in *Brycon opalinus*. *Molecular Ecology*, Grã-Bretanha, v. 3, n.2, p. 297-298,

BARROSO, R. M.; HILSDORF, A.W.S.; MOREIRA, H. L. M.; CABELLO, P.H.; TRAUB-CSEKO, Y. M. (2005). Genetic diversity of wild and cultured populations of *Brycon opalinus* (Cuvier, 1819) (Characiforme, Characidae, Bryconiae) using microsatellites. *Aquaculture*, 247: 51-65.

BILLINGTON, N. e HEBERT, P. D. N. (1991) Mitochondrial DNA diversity in fishes and its implications for introductions. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 48: 80 – 94.

BRAGA, F. M. S. (2001) Reprodução de peixes (Osteichthyes) em afluentes do reservatório de Volta Grande, Rio Grande, sudeste do Brasil. *Iheringia - Série Zoologia*, Porto Alegre, n.91, p. 67-74.

BRITO, D.; FONSECA, G. A. B. (2006) Evaluation of minimum viable population size and conservation status of the long-furred woolly mouse opossum *Micoureus paraguayanus*: an endemic marsupial of the Atlantic Forest. *Biodiversity and Conservation*, v. 15, p. 1713–1728.

BUSSING, W. A. (1976).Geographic distribution of the San Juan Ichthyofauna of Central America with remarks on its origin and ecology. In: T. B. THORSON (ed.). *Investigations of the Ichthyofauna of Nicaraguan Lakes*. School of Life Sciences, Univ. Nebr. - Lincoln.

CAROLSFELD, J. et al. (2003) Cryopreservation of sperm in Brazilian migratory fish

conservation. *Journal Of Fish Biology*, p. 472-489

CECCARELLI, P. S.; SENHORINI, J. A.; REGO, R. F. (2005). Piracanjuba, *Brycon orbignyianus* (Valenciennes, 1849). In: BALDISSEROTTO, B.; GOMES, L. C. Espécies nativas para piscicultura no Brasil. Santa Maria/RS: Editora da Universidade Federal de Santa Maria. 121-147.

CHAMPAGNON, J, ELMBERG, J, GUILLEMAIN, M., GAUTHIER-CLERC, M, LEBRETON, J. D. (2012) Conspecifics can be aliens too: a review of effects of restocking practices in vertebrates. *Journal for Nature Conservation*, 20, 231–241.

CULLEN Jr, L., RUDRAN, R. & VALLADARES-PADUA, C. (org.). (2003) Métodos de Estudos em Biologia da Conservação e Manejo da Vida Silvestre. Curitiba: Ed. da UFPR; Fundação O Boticário de Proteção à Natureza. 667 p.

DANTAS, G. P. M. (2007) Biologia Reprodutiva, Estrutura Populacional e Variabilidade Genética de *Larus dominicanus*. 2007. 120 f. Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo - USP, São Paulo.

DEGREEF, J.; ROCHA, O. J.; VANDERBORGHT, T.; BAUDOIN. J. P. (2002). Soil seed bank and seed dormancy in wild populations of *Lima Bean* (Fabaceae): Considerations for in situ and ex situ conservation. *American Journal of Botany* 89 (10): p. 1644–1650.

ESCHMEYER, W. N, FONG, J. D. Species by family/subfamily. (<http://research.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/SpeciesByFamily.asp>). Electronic version accessed 15/01/2014.

EXCOFFIER, L.G, LAVAL S, SCHNEIDER S (2005) Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evol Bioinform Online* 1:47-50.

FIDALGO-GUERREIRO, V. H.; FERREIRA, G. C. S. (2011) Mitigação de impactos à ictiofauna após barramentos de corpos d'água através de medidas socioeducativas e educação ambiental. In: 1º CONGRESSO BRASILEIRO DE AVALIAÇÃO DE IMPACTO, 1. 2011 . Anais do 1º Congresso Brasileiro de Avaliação de Impacto.

FOOSE, T. J.; WIESE, R. J. (2006) Population management of rhinoceros in captivity.

International Zoo Yearbook, v. 40, p. 174-196.

FORESTI, F.; TOLEDO-FILHO, S.A; ALMEIDA-TOLEDO, L. F. (1992) Manejo de recursos genéticos em populações de peixes. In: SITUAÇÃO ATUAL E PERSPECTIVAS DA ICTIOGENÉTICA NO BRASIL. IX ENCONTRO BRASILEIRO DE ICTIOLOGIA. Maringá, PR

FRASER D. J., BERNATCHEZ, L. (2001) Adaptive evolutionary conservation: towards a unified concept for defining conservation units. *Molecular Ecology* 10: 2741-2752

FREITAS, S. MORALES, A. C; LAVAGNINI, T.C.; BAGGIO, M.V. (2009) O significado da expressão “haplótipo” em estudos populacionais. Um estudo de caso com *Chrysoperla externa* (Hexapoda: Neuroptera: Chrysopidae). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE GENÉTICA, 55. 2009, Águas de Lindóia. Resumos do 55º Congresso Brasileiro de Genética. Águas de Lindóia: SBG. p. 358.

FROST, L.A.; EVANS, B.S.; JERRY, D.R. (2006) Loss of genetic diversity due to hatchery culture practices in barramundi (*Lates calcarifer*). *Aquaculture*, v.261, p.1056-1064.

GODINHO A. L. e KYNARD, B. (2009) Migratory fishes of Brazil: Life history and fish passage needs. *River Research and Applications*, v. 25: p. 702-712.

GODINHO, H. P. e A. L. GODINHO. (1994) Fish communities in southeastern Brazilian river basins submitted to hydroelectric impoundments. *Acta Limnol. Bras.* 5:187-197.

GODINHO, H. P. e GODINHO, A. L. (2003) Águas, Peixes e Pescadores do São Francisco das Minas Gerais. SOGRAFE – Editora e Gráfica Ltda. 461p.

GODOY, M. P. (1975) Peixes do Brasil: subordem Characoidei; bacia do Rio Mogi Guassu. Ed. Franciscana, Piracicaba. v. 1, 216p.

GONZÁLEZ-WANGÜEMERT, M., VEGA-FERNÁNDEZ, T., PÉREZ-RUZAFÁ, A., GIACALONE, V.M. & BADALAMENTI, F. (2012). Genetic impact of a restocking

experiment of white seabream in Sicily (Northwestern Mediterranean Sea). *Journal of Sea Research*, 68: 41-48. IF: 2.683.

GUO, S.; THOMSON, E. (1992) Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiple alleles. *Biometrics*, 144: 1933-1940.

HALLERMAN, E. M. (2003) *Population genetics: principles and applications for fisheries scientists*. Bethesda, Maryland: American Fisheries Society, 458 p.

HEDRICK, P. W., LEE, R. e HURT, C. R. (2012) Genetic Evaluation of Captive Populations of Endangered Species and Merging of Populations: Gila Topminnows as an Example. *J. Heredity*. 103:651-660.

HILSDORF, A.W. e PETRERE, M. JR. (2002) Conservação de peixes na bacia do rio Paraíba do Sul. *Ciência Hoje*. 30:62–67

HILSDORF, A.W.S., AZEREDO-ESPIN, A.M.L., KRIEGER, M.H., KRIEGER, J.E. (2002). Mitochondrial DNA diversity in wild and cultured populations of *Brycon opalinus* (Cuvier, 1819) (Characiformes, Characidae, Bryconinae) from the Paraíba do Sul Basin, Brazil. *Aquaculture*. 214: 81-91.

HILSDORF, A.W.S.; RESENDE, E.K.; MARQUES, D.K.S. (2006) *Genética e Conservação de Estoques Pesqueiros de Águas Continentais no Brasil: Situação Atual e Perspectivas*. Corumbá: Embrapa Pantanal. 44p.

IVANOVA, N.V, DEWAARD, J. R, HEBERT, P. D. N. (2006) An inexpensive, automation-friendly protocol for recovering high-quality DNA. *Molecular Ecology Notes*, 6, 998–1002.

JERRY, D.R., PRESTON, N.P., CROCOS, P.J., KEYS, S., MEADOWS, J.R.S., LI, Y. (2006). Application of DNA parentage analyses for determining relative growth rates of *Penaeus japonicus* families reared in commercial ponds. *Aquaculture* 254, 171-181.

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, F. C. T. (2001) Revisão Taxonômica do gênero *Brycon* dos rios da América do Sul Cisandina (Pisces, Ostariophysi, Characiformes, Characidae). 2001. 296 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo - USP, São Paulo.

LOPERA-BARRERO, N. M., R. P. RIBEIRO, AND J. A. POVH. (2007) O repovoamento de peixes: uma estratégia multidisciplinar? *Aquicultura e Pesca*. v. 30:71-74.

LOWE-MCCONNELL, R. H. (1999) Estudos Ecológicos de Comunidades de Peixes Tropicais. EDUSP, São Paulo,. 535p.

MATSUMOTO, C.K. e A.S. HILSDORF. (2009). Microsatellite variation and population genetic structure of a Neotropical endangered Bryconinae species *Brycon insignis* Steindachner, 1877: implications for its conservation sustainable management. *Neotrop. Ichthyol.*, 7: 395-402.

MERONA, C. A., SANTOS, G. M., ALMEIDA, R. G. (2001). Short term effects of Tucuruí Dam (Amazônia, Brazil) on the tropic organization of fish communities. *Environmental Biology of Fishes* 60, 375-392.

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. Livro Vermelho da Fauna Ameaçada de Extinção. MACHADO, A. B. M.; DRUMMOND, G. M. E PAGLIA, A. P. (Eds). Brasília/Belo Horizonte: Sindicato Nacional Dos Editores De Livros, 2008. 1420 p.

MOREIRA, H. L. M. ; RIBEIRO, R. P. ; VARGAS, L. D.; ZIMMERMANN, S. ; POVH, J. A. (2003) The use of RAPD (Random Amplified Polymorphism DNA) for genetic monitoring in breeding programs of tilapia. In: *WORLD AQUACULTURE 2003*, 2003, Salvador. Book of Abstracts. v. 1. p. 460-460.

NEI, M. (1987) *Molecular evolutionary genetics*. New York, Columbia.

NINHAUS-SILVEIRA, A. (2007) Preservação dos gametas de peixes e suas aplicações. *Revista Colombiana de Ciências Pecuárias*. p.516-517.

O-CONNEL M. e WRIGHT, J. M. (1997) .Microsatellites DNA in fish. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, v. 7, p.331-363.

OLIVEIRA, D. J.; SENHORINI, J. A. (2010) Status de conservação da piracanjuba, *Brycon orbignyanus* (Valenciennes, 1849): subsídios para elaboração de plano de ação. In: II Seminário de Pesquisa e Iniciação Científica do ICMBio, 2010, Brasília. Anais do II Seminário de Pesquisa e Iniciação Científica do ICMBio. p. 107-108.

OLIVEIRA, E. J.; PÁDUA, J. G.; ZUCCHI, M. I.; VENCOVSKY, R. e VIEIRA, M. L. C. (2006) Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. *Genet Mol Biol.* 2:294–307.

OVENDEN, J.R. (1990) Mitochondrial DNA and marine stock assessment: a review *Aust. J. Mar. Freshwater Res.*, 41, pp. 835–853

PAIVA, M. P. (1982). *Grandes Represas do Brasil*. Brasília: Editerra 292 p.

PANARARI-ANTUNES, R. S.; PRIOLI, A. J.; PRIOLI, S. M. A. P. et al. (2011) Genetic Variability of *Brycon orbignyanus* (Valenciennes,1850) (Characiformes: Characidae) in Cultivated and Natural Populations of the Upper Paraná River, and Implications for the Conservation of the Species. *Brazilian Archives of Biology and Technology Aninternational Journal*, v.54, n. 4: pp. 839-848

POMPELLI, M. F. e GUERRA, M. P. (2004). *Ex situ* conservation of *Dyckia distachya*: an endangered bromeliad from South Brazil. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, v.4, p.273-279.

POVH, J. A.; LOPERA-BARRERO, N. M.; RIBEIRO, R. P.; LUPICHINSKI, J.R. GOMES, P. C.; LOPES, T. S. (2008) Monitoreo genético en programas de repoblamiento de peces mediante marcadores moleculares. *Ciencia e Investigación Agraria (Impresa)*, v. 35, p. 5-15.

POVH, J.A. (2007). Avaliação da diversidade genética e do manejo reprodutivo do pacu, *Piaractus mesopotamicus*. 75f. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de Maringá, Maringá.

POVH, J.A.; RIBEIRO, R.P.; SIROL, R.N.; MANGOLIN, C.A.; GASPARINO, E.; BARRERO, N.M.L.; GOMES, P.C.; STREIT JR., D.P.; VARGAS, L. (2006) Importância do monitoramento genético pela utilização de marcadores moleculares na

piscicultura. Em: AQUACIÊNCIA 2006, Bento Gonçalves. Anais... Bento Gonçalves: Aquabio: FURG.

PRIMACK, R. B.; RODRIGUES, E. (2002) Biologia da conservação. Londrina: E. Rodrigues. 327 p.

RIBOLLI, J.; ZANIBONI FILHO, E. (2009) Individual contributions to pooled-milt fertilizations of silver catfish *Rhamdia quelen*. Neotropical Ichthyology (Impresso), v. 7, p. 629-634.

RINGUELET, R. A.; ARAMBURU, R. H. e ARAMBURU, A. A. (1967) Los peces argentinos de agua dulce. Provincia de Buenos Aires, Gobernación, Comisión de Investigación Científica, La Plata. 602p.

RODRIGUEZ-RODRIGUEZ, M. del P.; LOPERA-BARRERO, N.M.; RIBEIRO, R.P.; POVH, J.A.; VARGAS, L.; SIROL, R.N.; JACOMETO, C.B. (2010) Diversidad genética de piracanjuba usada en programas de repoblación con marcadores microsatélites. Pesquisa Agropecuária Brasileira, v.45, p.56-63.

ROKAS, A.; LADOUKAKIS, E.; ZOUROS, E. (2003) Animal mitochondrial DNA recombination revisited. Trends in Ecology and Evolution, v. 18, p.411-417.

ROMANA-EGUIA, M. R. R., IKED, M., BASIAO, Z. U. e TANIGUCHI N. (2004) Genetic diversity in farmed Asian Nile and red hybrid tilapia stocks evaluated from microsatellite and mitochondrial DNA analysis. Aquaculture 236, 131–150.

SANCHES, A. e GALETTI-JR, P. M. (2006). Genetic Evidence of Population Structuring in the Neotropical Fresh Water Fish *Brycon hilarii* (Valenciennes, 1850) Braz. J. Biol. 4:889–895.

SIROL, R. N.; BRITTO, S. G. (2006) Conservação e manejo da ictiofauna: repovoamento. In: NOGUEIRA, M. G.; HENRY, R.; JORCIN, A. (Ed.). Ecologia de reservatórios: impactos potenciais, ações de manejo e sistemas em cascatas. São Carlos, Rima. p. 275-284.

SIVASUNDAR, A.; BERMINGHAM, E.; ORTÍ, G. (2001) Population structure and biogeography of migratory freshwater fishes (Prochilodus: Characiformes) in major South American rivers. *Molecular Ecology* 10: 407-417.

TANIGUCHI, N. (2003) Genetic factors in broodstock management for seed production. *Rev Fish Biol Fish*;13:177-185.

TAYLOR, M. F. J. et al. (1993) The lepidopteran mitochondrial control region: structure and evolution. *Molecular Biology and Evolution*, v. 10, n. 6, p. 1259-1272.

THOMPSON, J. D. et. al. The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res*, v. 24: p.4876-4882. 1997.

TOLEDO-FILHO S. A, ALMEIDA-TOLEDO, L. F, FORESTI F, GALHARDO E, DONOLA E (1992) Conservação genética de peixes em projetos de repovoamento de reservatórios. *Cadernos de Ictiogenética* 1. 39p.

UMETSU, R. K. (2004) Efeito da barragem de Manso sobre a inundação em matas ripárias na bacia do Rio Cuiabá. 2004. 65 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Mestrado em Ecologia e Conservação da Biodiversidade, Universidade Federal de Mato Grosso, Cuiabá.

VAZ, M. M.; TORQUATO, V. C.; BARBOSA, N. D. C. (2000) Guia ilustrado de peixes da bacia do rio Grande. Belo Horizonte? CEMIG/CETEC. 144 p.

VAZ, M. M.; TORQUATO, V. C.; BARBOSA, N. D. C. (2000). Guia ilustrado de peixes da bacia do rio Grande. Belo Horizonte: CEMIG/CETEC, 144 p.

WARD, R. D. (2006) .The importance of identifying spatial population structure in restocking and stock enhancement programmes. *Fisheries Research*. Asian, p. 9-18.

WAS, A; WENNE, R., (2002): Genetic differentiation in hatchery and wild sea trout *Salmo trutta* in the Southern Baltic at microsatellite *loci*. *Aquaculture* 204(3-4): 493-506

WASKO A. P., MARTINS, C., OLIVEIRA, C.; SENHORINI, J. A. e FORESTI, F. (2004) Genetic monitoring of the Amazonian fish matrinhã (*Brycon cephalus*) using

RAPD markers: insights into supportive breeding and conservation programmes. *Journal of Applied Ichthyology* 1:48–52.

WELCOMME, R. L. (1998) International introductions of inland aquatic species. FAO Fisheries Technical Paper 294, FAO, Roma, Italia. 318p.

WOLSTENHOLME, D. R. (1992) Animal mitochondrial DNA: structure and evolution. *International Review of Cytology*, v. 141, p. 173-216.

YAN, L., WANG, D., FANG, Y. (2008) Genetic diversity in the bronze gudgeon, *Coreius heterodon*, from the Yangtze River system based on mtDNA sequences of the control region. *Environmental Biology of Fishes*, 82, 35–40.

ZANIBONI FILHO, E.; REYNALTE-TATAJE, D.; WEINGARTNER, M. (2006) Potencialidad del género *Brycon* en la piscicultura brasileña. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, v.19, p.233-240.

ZANIBONI-FILHO, E.; SCHULZ, U. H. Migratory Fishes of the Uruguay River. In: CAROLSFELD, J. et al. (Eds.). *Migratory Fishes of the South America' Biology, Social Importance and Conservation Status*. Victoria: World Fisheries Trust, 2003. p. 157-194.