UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO JOÃO DEL-REI
CAMPUS TANCREDO DE ALMEIDA NEVES
DEPARTAMENTO DE ZOOTECNIA
LABORATÓRIO DE RECURSOS GENÉTICOS
BACHARELADO EM ZOOTECNIA

MARCOS ANTONIO DA SILVA

AMPLIFICAÇÕES HETERÓLOGAS DE *LOCI* MICROSSATÉLITES EM *BRYCON ORBIGNYANUS* (CHARACIFORMES: CHARACIDAE): FERRAMENTAS PARA USO NO MONITORAMENTO E MANEJO GENÉTICO DE ESTOQUES SELVAGENS E DE PISCICULTURA

SÃO JOÃO DEL-REI
JANEIRO DE 2014

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO JOÃO DEL-REI

AMPLIFICAÇÕES HETERÓLOGAS DE *LOCI* MICROSSATÉLITES EM *BRYCON ORBIGNYANUS* (CHARACIFORMES: CHARACIDAE): FERRAMENTAS PARA USO NO MONITORAMENTO E MANEJO GENÉTICO DE ESTOQUES SELVAGENS E DE PISCICULTURA

MARCOS ANTONIO DA SILVA

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao curso de graduação em Zootecnia da Universidade Federal de São João del-Rei como requisito para a obtenção do título de Bacharel em Zootecnia.

Orientador: Professor Gabriel de Menezes Yazbeck.

Co-orientador: Professor Fausto Moreira da Silva Carmo

SÃO JOÃO DEL-REI
JANEIRO DE 2014

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO JOÃO DEL-REI

AMPLIFICAÇÕES HETERÓLOGAS DE *LOCI* MICROSSATÉLITES EM *BRYCON ORBIGNYANUS* (CHARACIFORMES: CHARACIDAE): FERRAMENTAS PARA USO NO MONITORAMENTO E MANEJO GENÉTICO DE ESTOQUES SELVAGENS E DE PISCICULTURA

MARCOS ANTONIO DA SILVA

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao curso de graduação em Zootecnia da Universidade Federal de São João del-Rei como requisito para a obtenção do título de Bacharel em Zootecnia.

Orientador: Professor Gabriel de Menezes Yazbeck.

Co-orientador: Professor Fausto Moreira da Silva Carmo

DATA DE DEFESA: 22/01/2014
BANCA EXAMINADORA:

_____
GABRIEL DE MENEZES YAZBECK

_____
JANAINA DE AZEVEDO MARTUSCELLO

_____
LEILA DE GENOVA GAYA

SÃO JOÃO DEL-REI
JANEIRO DE 2014

Dedico esse trabalho a minha família, aos meus pais (Aparecida e Vicente), e irmãos (Vanessa, Aline, Gerson, Gilda, Elvira e Gilson).

AGRADECIMENTOS

Agradecimentos a Deus por ter me encaminhado durante estes cinco anos de graduação, a minha família pelo apoio incondicional, ao professor Fausto Moreira da Silva Carmo pela ajuda durante minha iniciação científica, aos colegas do Laboratório de Recursos Genéticos. Agradecimento à CEMIG, agradecimento aos professores do curso de zootecnia pela contribuição na minha formação, agradecimentos aos membros da banca por aceitarem o convite, ao Programa Peixe Vivo (nas pessoas de João de Magalhães Lopes e Míriam Aparecida Castro) pelo financiamento da minha bolsa e a FAPEMIG pelo apoio ao laboratório. Agradecimentos ao Prof. Gabriel de Menezes Yazbeck pela dedicação e ensinamentos durante a minha orientação.

RESUMO

Piracanjuba é um dos nomes comuns para *Brycon orbignyanus* (Valenciennes, 1850), uma espécie neotropical de peixe de piracema da bacia do Prata na América do Sul, cujo significado nas línguas Tupi-Guarani é peixe da cabeça amarela. Esta é uma espécie onívora com boa adaptação para condições de piscicultura e tem sido informalmente chamada de salmão brasileiro, devido às características de sua carne. Em função de seu estado de conservação e seu potencial para criação, o desenvolvimento de marcadores moleculares para avaliações da diversidade genética e medidas de manejo ambiental são muito úteis. Ainda que existam esforços atuais de isolamento *de novos* microssatélites nesta espécie, ainda não há *loci* específicos descritos na literatura técnica ou científica. Neste estudo foram testados 41 marcadores de microssatélites descritos para espécies próximas de caracídeos de água doce, em amplificações heterólogas no genoma de *B. orbignyanus*. Alguns marcadores já haviam sido relatados anteriormente para esta espécie (sete *loci* de *Brycon opalinus* e sete de *B. hilarii*) e alguns são apresentados de forma inédita aqui (oito marcadores originalmente isolados em *Salminus brasiliensis*, nove em *S. hilarii* e 10 em *S. franciscanus*).Todos *loci* candidatos passaram por ensaios de padronização das condições da reação em cadeia da polimerase (PCR) e, então, foram triados e selecionados para polimorfismos genéticos de comprimento de fragmento de DNA em cinco indivíduos.Os marcadores escolhidos foram testados em uma amostra de 49 indivíduos selvagens capturados no reservatório da Usina Hidrelétrica de Itutinga, capturados para formação de plantel reprodutor da Estação de Piscicultura de Itutinga-MG. O DNA genômico total de cada peixe foi extraído de um pequeno fragmento da nadadeira caudal por meio do protocolo chelex-proteinase K, o DNA foi titulado e amplificado utilizando-se ensaios de teste de gradientes de temperatura para definição de condições otimizadas de anelamento de iniciadores (*primers*). Dos marcadores aqui testados, 31 *loci* resultaram em formação de produto de PCR. Destes, apenas 10 *loci* resultaram em padrões polimórficos nítidos. Após avaliações genético-populacionais apenas seis *loci* puderam ser validados como diretamente aplicáveis em *B. orbignyanus*, devido a comportamento genético consistente, como por exemplo, conformidade com as expectativas de Hardy-Weinberg. Alguns resultados contrastantes com relatos anteriores de amplificação-cruzada foram obtidos, como amplificações com os *loci* BoM6 e BoM12. Este trabalho contribui com uma descrição mais ampla da diversidade heteróloga para *loci* de *B. hilarii* em *B. orbignyanus*. Um novo uso de marcadores de *Salminus* em *B. orbignyanus* foi aqui cuidadosamente avaliado.

Palavras chave: Genética da conservação, genética de populações, marcadores moleculares, piscicultura.

ABSTRACT

Piracanjuba is a common name of *Brycon orbignyanus* (Valenciennes, 1850), an endangered Neotropical freshwater fish species from the Prata River Basin in South America, which meaning in the Tupi-Guarani native languages is "yellow headed fish". It is an omnivorous species with reasonable acceptability for hatchery conditions and it has been informally dubbed the Brazilian salmon, for its characteristic taste. Because of its conservation status and its promising potential for aquaculture, the development of molecular markers for genetic diversity conservation and stock enhancement is imperative to inform technically sound hatchery and environmental management measures. Although there are current efforts for of novel isolation of microsatellite for this species, so far no specific *loci* are described in the primary literature. We tested a collection of 41 different microsatellite markers previously isolated in close freshwater characid species, for useful heterologous amplifications in *B. orbignyanus*. Some markers were already previously tested (seven *loci* from *Brycon opalinus*and seven from *B. hilarii*) and some are herein presented for the first time (eight markers originally isolated from *Salminus brasiliensis*, nine from *S. hilarii*, and 10 from *S. franciscanus*) in *B. orbignyanus*. Each cross-amplification system was tested in a subsample of five individuals for a preliminary description of amplification response (negative, nonspecific, positive, polymorphic amplification, etc.). Candidate *loci* were further optimized for PCR conditions and the selected polymorphic markers applied to a sample of 49 wild individuals captured upstream the Itutinga Hydroelectric Power Plant Dam, for broodstock formation in the Itutinga Hatchery (Minas Gerais Estate). Total genomic DNA was extracted with chelex-proteinase K from a small (~4 mm^2) piece of caudal fin tissue and PCR annealing temperatures were evaluated with the aid of temperature gradient essays. From all the potential heterologous microsatellite battery tested, 31 *loci* resulted in PCR product formation. From these, only 10 *loci* yielded intelligible polymorphic patterns in the observed sample. After population genetics evaluation, only six *loci* could be validated as directly applicable to *B. orbignyanus* due to expected mendelian behavior, as judged by means of Hardy-Weinberg expectations. Some contrasting results were obtained in regard to the previously reported cross-amplification markers, namely we succeeded with the amplification of of BoM6 and BoM12 and a more broad description of the heterologous diversity was provided for *B. hilarii* loci. A novel application of *Salminus* markers was carefully evaluated.

Key words: Conservation genetics, hatchery, molecular markers, population genetics.

LISTA DE ABREVIATURAS

Anel.	Anelamento
B.	*Brycon*
Bh	Locus de *Brycon hilarii*
BoM	Locus de *Brycon opalinus*
cm	Centímetro
ºC	Graus Celsius
DNA	Ácido dexosirribonucléico
DL	Desequilíbrio de ligação
dNTP	Deoxinucleotídeos trifosfato
EDTA	Ácido etileno diaminotetraacético
EHW	Equilíbrio de Hardy-Weinberg
H.	*Henochilus*
He	Heterozigosidade esperada
Ho	Heterozigosidade observada
KCl	Cloreto de potássio
Kg	Quilograma
Km^2	Quilômetro quadrado
L.	*Leporinus*
M	Marcador molecular (Ladder)
m	Metro
MG	Minas Gerais
Mg^{+2}	Íon de magnésio
$MgCl_2$	Cloreto de magnésio
Min.	Minuto
mM	Milimolar
µL	Microlitro
µM	Micromolar
ng	Nanograma
nm	Nanômetros

P.	*Prochilodus*
pb	Pares de bases
PCR	Reação em cadeia da polimerase
s	Segundo
S	Sul
S.	*Salminus*
Sfra	Locus de *Salminus franciscanus*
Sh	Locus de *Salminus hilarii*
Sm	Locus de *Salminus brasiliensis*
sp.	Espécie
TAE	Tris acetato EDTA
Taq DNA polimerase	DNA polimerase termoestável do Thermus aquaticus
TEMED	Tetrametiletilendiamina
Temp.	Temperatura
V/cm	Volts por centímetro
Tris-HCl	Tris hidroximetil aminometano cloridrato
U	Unidade de Taq
UVB	Ultravioleta
W	Oeste
16S rRNA	16S RNA ribossômico

LISTAS DE FIGURAS

Figura 1 Exemplar de *B. orbignyanus* coletado em 11/01/2012 na Estação de Piscicultura de Itutinga (Fotografia: Gabriel de M. Yazbeck) 22

Figura 2 Eletroforese em gel de poliacrilamida 12%, amplificação utilizando o *locus* Bh6 em *B. orbignyanus*. M=Marcador de 25 pb..... 25

Figura 3 Eletroforese em gel de poliacrilamida 12%, amplificação utilizando o *locus* BoM6 em *Brycon orbignyanus.* M=Marcador de 25 pb..... 26

LISTAS DE TABELAS

Tabela 1 Resultados da otimização das condições de PCR para amplificação cruzada de marcadores polimórficos em *B. orbignyanus*..... 25

Tabela 2 Número de alelos gerados por *locus*, motivo de repetição e tamanho de fragmentos observados neste estudo..... 27

Tabela 3 Equilíbrio de Hardy-Weinberg em amplificações heterólogas utilizando primers de *Salminus franciscanus* (Sfra04), *Salminus brasiliensis* (Sm), *Brycon opalinus* (BoM) e *Brycon hilarii* (Bh) em *Brycon orbignyanus*. Ho=Heterozigosidade observada, He=Heterozigosidade esperada..... 27

Tabela 4 Resultados das análises para desequilíbrio de ligação. Os valores na diagonal superior da tabela indicam os valores de significância (p) encontrados com auxílio do programa GenePop. Aqui são considerados significativos valores de p<0,005, em função da correção de Bonferroni..... 28

LISTAS DE TABELAS - APÊNDICE

Tabela 1 Sequência de oligonucleotídeos iniciadores (primers) utilizados neste estudo para loci polimórficos em amplificações heterólogas utilizando de marcadores de *Salminus franciscanus* (Sfra), *Salminus brasiliensis* (Sm), *Brycon opalinus* (BoM) e *Brycon hilarii* (Bh) em *Brycon orbignyanus*..... 44

Tabela 2 Número de alelos e suas respectivas frequências alélicas..... 44

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

LISTA DE ABREVIATURAS

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE TABELAS - APÊNDICE

1. INTRODUCÃO.....13
   1.1. Rio Grande..... 13
   1.2. *Brycon orbignyanus*..... 13
   1.3. Considerações sobre filogenia 16
   1.4. Marcadores microssatélites..... 16
   1.5. Marcadores heterólogos..... 17
2. JUSTIFICATIVAS..... 19
   2.1. Importância do pescado.....19
   2.2. Consevação.....19
3 - OBJETIVOS 21
   3.1. Objetivo geral.....21
   3.2. Objetivos específicos.....21
4 - MATERIAL E MÉTODOS 22
5 - RESULTADOS..... 24
6 - DISCUSSÃO..... 29
7 - CONCLUSÕES..... 34
8 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... 35
9 - APÊNDICE..... 44

1 - INTRODUÇÃO

1.1. Rio Grande

O rio Grande é um afluente da grande bacia do Paraná, este rio nasce no município de Bocaína de Minas, na serra da Mantiqueira, a uma altitude de 1980 m, percorre 1390 Km, ocupando uma área de 143.000 Km², sendo cerca de 60 % no estado de Minas Gerais (Vaz *et al*., 2000). Abrangendo 393 municípios, 214 no estado de Minas Gerais (Filho *et al*., 2008). Seus principais afluentes da margem direita encontram-se no estado de Minas Gerais, sendo eles rio das Mortes, rio Uberaba e rio Verde, enquanto que na margem esquerda encontram-se os principais afluentes do estado de São Paulo, sendo eles os rios Sapucaí, rio Sapucaí Paulista, rio Pardo e rio Turvo (Santos, 2010). A partir de certo trecho o rio Grande separa o estado de Minas Gerais do estado de São Paulo, no seu trecho final se junta com o rio Paranaíba para integrar a bacia do Paraná.

Ao longo de seu percurso encontram-se 13 barragens hidrelétricas, no sentido montante-jusante, Alto Rio Grande, Camargos, Itutinga, Funil, Furnas, Peixoto, Estreito, Jaguara, Igarapava, Volta Grande, Porto Marimbondo e Água Vermelha e reservatório de Ilha Solteira (Filho *et al*., 2008).

Das 221 espécies de peixes descritas encontradas no alto do rio Paraná, apenas 86 são minimamente conhecidas quanto a aspectos ecológicos, destas 16 são espécies que realizam grandes migrações durante o período reprodutivo (Agostinho *et al.*, 2003). As ordens Characiformes e Suliformes compõe a maioria das espécies encontradas na bacia do rio Grande (Santos, 2010).

1.2. Brycon orbignyanus

A biodiversidade de peixes é muito grande, estima que no mundo existam mais de 31.000 espécies consideradas válidas, destas aproximadamente metade são encontrada em ambientes de água doce (Eschmeyer *et al*., 2010). Segundo Reis *et al*. (2003), no mundo existem 13.000 espécies de peixes de água doce, sendo 6.000 encontradas na região neotropical, destas 4.475 são consideradas válidas. Nesta região destacamos a ordem Characiformes, constituída somente de peixes de água doce, que

apresentam corpo coberto por escamas (Vaz *et al*., 2000) e presença de nadadeira adiposa, sendo está ordem composta por 18 famílias, 270 gêneros e 1674 espécies relatadas (Nelson, 2006). A família Characidae é a categoria com a maior quantidade de espécies nesta região, com mais de 950 já descritas (Reis *et al*., 2003). Dentro desta família encontra a subfamília Bryconinae com 44 espécies válidas, sendo o gênero *Brycon* o maior representante com 42 espécies (Lima, 2003).

Brycon orbignyanus (Valenciennes, 1849) é uma espécie do gênero *Brycon*, popularmente conhecida como piracanjuba, que na linguagem Tupi-Guarani significa peixe de cabeça amarela (Agostino *et al*., 2003), às vezes informalmente referida como o salmão brasileiro, devido à coloração e o sabor da carne. É uma espécie neotropical encontrada na bacia do Prata, de grande porte e podendo chegar a 80 cm de comprimento e 8,2 Kg de peso (Vaz *et al*., 2000). Caracteriza-se por apresentar corpo fusiforme, comprido, boca terminal e ampla, coloração prateada e nadadeira caudal avermelhada com uma mancha preta na posição central (Britto *et al*., 2003; Zaniboni-Filho *et al*., 2006). Durante os períodos de cheias (época mais quente do ano), realiza a piracema: subida dos rios para reprodução, culminando com a atividade reprodutiva entre dezembro e janeiro (Agostino *et al*., 2003; Vaz *et al*., 2000). Realiza desova total, que consiste na maturação e a liberação dos gametas num único período do ano. Normalmente os machos estão aptos a reproduzirem a partir do segundo ano e as fêmeas a partir do terceiro ano. Durante o período reprodutivo os machos caracterizam por apresentarem uma pequena aspereza na nadadeira anal (Vaz *et al*., 2000).

É uma espécie de peixe de hábito onívoro, com aceitação razoável para piscicultura (Vaz *et al*., 2000), portanto com grande potencial para desenvolvimento nesta área. Apresenta rápido crescimento, boa conversão alimentar, sendo uma espécie que é adaptada às dietas artificiais (Murgas *et al*., 2003). Devido seu hábito agressivo quando fisgada é uma espécie muito apreciada nas pescas esportivas (Vaz *et al*., 2000; Maciel *et al*., 2010), mas está restrita a pequenas populações selvagens ameaçadas de extinção (Rosa e Lima, 2008; Lopera-Barrero, 2009).

A diminuição dos estoques naturais e o aumento na demanda pelos consumidores têm estimulado programas que visam aumentar a produção desta especie em pisciculturas (Borba *et al*., 2003).

1.3. Considerações sobre filogenia

O conhecimento da filogenia é importante para o sucesso de amplificações heterólogas, Barbará *et al.* (2007) descreveram 70% de sucesso em amplificação entre espécies dentro do mesmo gênero, de até 60% de amplificação dentro da mesma família, estando o sucesso na transferência dos *loci* ligado à relação filogenética dos grupos.

Vários estudos filogenéticos tem redefinido a classificação taxonõmica de muitas espécies, colaborando na escolha de *loci* microssatélites candidatos a amplificação cruzada em estudos genéticos de populações de peixes.

Hilsdorf *et al*, (2008) em suas análises filogenéticas baseada no gene mitochondrial 16S rRNA e Abe (2011) utilizando genes do DNA mitocondrial e genes nucleares, revelaram relação estreita da espécie *Brycon orbignyanus* com *B. hilarii*, essas duas espécies foram distante de *Brycon opalinus.* Mirande (2009) em suas análises mostrou que *Brycon orbignyanus* e *Salminus brasiliensis* apresentam muitas sinapomorfias em comum, demostrando a próximidade entre as duas espécies.

Orti e Meyer (1997), Abe (2011) e Calcagnotto *et al*. (2005) relataram *Brycon* como grupo irmão de *Salminus*. Javonillo *et al*. (2010) e Calcagnotto *et al*. (2005) encontraram uma relação estreita entre o gênero *Salminus* com *B. hilarii*. Javonillo *et al*. (2010) e Calcagnotto *et al*. (2005) baseando em análises genéticas, colocaram o gênero *Salminus* dentro de *Brycon.*

Oliveira *et al.* (2011) destacaram monofilético para as subfamílias Bryconinae e Salmininae, formando um novo grupo taxonômico chamado de Bryconidae. Nesse mesmo trabalho rejeitaram o monofiletismo do gênero *Brycon*, devido a maior proximidade de *Brycon insignis* com *Henochilus wheatlandii*, representante do gênero *Henochilus* do que *Brycon amazonicus.* Abe (2011) não encontrou monofiletismo para o gênero *Brycon* e para a Sufamilia Briconinae, devido a existência de espécies do gênero *Salminus* dentro da subfamília, e *Brycon* foi considerado monofilético quando inclui a espécie *H. wheatlandii* (Hilsdorf *et al.*, 2008*;* Abe, 2011). Mirande (2009) encontrou relação próxima entre Bryconinae com Salmininae, baseado em caracteres compartilhados.

1.4. Marcadores microssatélites

Muitos marcadores moleculares tem sido utilizados em estudos de genética de populações, por serem altamente abundantes, hipervariáveis e polimórficos, com destaque para os marcadores microssatélites de DNA ou Repetições de Sequências Simples (‘‘*Simple Sequence Repeats*’’ - SSR), que são marcadores de natureza codominante, baseados na herança mendeliana (DeWoody e Avise, 2002; Tautz, 1989). Esses marcadores consistem em sequências de 2 a 6 nucleotídeos, repetidos *in tandem* (lado a lado), de comprimentos variáveis (Hoshino *et al.,* 2010), característica que define os diferentes alelos em um *locus*. De acordo com o tema de repetição (*motif*), podem ser classificados em mono, di, tri, tetra, penta e hexanucleotídeo, sendo os temas de repetições dinucleotídeo, os mais comuns no genoma (Ellegren, 2004).

Os marcadores microssatélites também são classificados em perfeitos, imperfeitos e compostos, são perfeitos quando não existe modificação na seqüência (ex.: ATATATATATAT), imperfeitos quando existem alguma interrupção no motivo de repetição (ex.: ATATATGTATAT), compostos quando existem diferentes grupos de motivos de repetições presente em uma seqüência (ex.: ATATATGAGAGA) (Oliveira *et al*., 2006).

Os microssatélites são encontrados ao longo de todo o genoma, embora existam evidencias que a distribuição dos microssatélites desvia da aleatoriedade (You-Chun Li *et al.,* 2002) e são encontrados tanto em regiões codificadoras e não codificadoras do genoma (Zane *et al.,* 2000).

Estes marcadores podem ser utilizados para detecção de polimorfismo e alelos raros em análises populacionais (Alam e Islam, 2005). A detecção de polimorfismo baseia-se na diferença no número de repetições de um individuo para outro. Em *loci* microssatélites heterozigotos, o perfil genético do indivíduo exibe duas bandas de tamanho diferentes, devido ao diferente número de repetição em cada alelo (Oliveira *et al*., 2006). O homozigoto possui apenas uma banda representada por fragmentos de DNA homólogos (paterno e materno) de mesmo tamanho e com o mesmo número de repetições. Outras razões que explicam a detecção de apenas uma classe de tamanho de fragmento de DNA (uma única banda) é a ocorrência de alelos nulos (onde os sítios de anelamento dos iniciadores acumularam muitas mutações) ou a ocorrência de queda de

amplificação (*allele drop out*) do alelo maior, por competição pelos *primers* no alelo de menor tamanho, devido a efeitos estocásticos da amplificação de DNA, durante o processo de detecção do polimorfismo genético (Wang *et al.*, 2012).

Os *loci* microssatélites encontrados no genoma podem ser amplificados via Reação em Cadeia da Polimerase (*Polymerase Chain Reaction* - PCR) com auxilio de um par de oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) específicos que flanqueiam regiões de microssatélites **(**Müller *et al*., 2010)**.** O polimorfismo encontrado neste marcador deve-se as altas taxas de mutação (Oliveira *et al*., 2006), provavelmente devido a erros durante a recombinação e à derrapagem da polimerase durante a replicação do DNA (Hoshino *et al.*, 2010).

Os marcadores microssatélites tem sido utilizados em estudos de parentesco, análise de paternidade, certificação de *pedigree*e na genética de populações (Tautz 1989), sendo utilizados em uma série de programas genéticos na aquacultura (Tong e Liao, 2004), em uma variedade de peixes (Tong *et al*., 2005). Em análises populacionais, recomenda-se a utilização de um número alto de *loci* microssatélites para obter informações mais completas e confiáveis (Zane *et al*., 2000).

O desenvolvimento de marcadores moleculares para estudos de diversidade genética e melhoria de ações são de grande importância para aumentar a eficiência da piscicultura (Tong *et al*., 2002), as práticas de gestão ambiental e o melhoramento genético.

1.5. Marcadores heterólogos

Estudos envolvendo amplificações heterólogas têm sido feitos por pesquisadores que trabalham com populações naturais e de piscicultura para desenvolverem ferramentas eficazes no monitoramento genético de populações.

Tradicionalmente, o isolamento de novos marcadores microssatélites é uma tarefa trabalhosa, cara e de alta demanda de tempo (Zane *et al*., 2000), pois necessita de construção de bibliotecas, formação de clones até o desenvolvimento de novos oligonucleotídeos iniciadores. Esse cenário está mudando recentemente, com a

introdução das técnicas de sequenciamento de DNA de nova geração, porém o acesso à tais técnicas é ainda relativamente restrito.

A conservação evolutiva de regiões de sequencia única (não-repetitiva) flaqueadoras aos microssatélites no genoma, possibilita a utilização de *loci* microssatélites isolados de uma espécie filogeneticamente próxima, para amplificar com sucesso o DNA de outras espécies de interesse (Tong e Liao, 2004; O'Connell e Wright , 1997). Estas amplificações com marcadores isolados em outras espécies são chamadas amplificações cruzadas ou heterólogas.

O sucesso da amplificação cruzada esta diretamente relacionada com a distância evolutiva das espécies alvos. *Loci* microssatélites isolados de espécies próximas tem maiores chances de amplificação e consequentemente apresentar polimorfismo do que espécies distantes filogeneticamente (Primmer *et al*., 1996). Segundo Zane *et al*. (2000) *loci* microssatélites são transferíveis entre espécies, gêneros, permitindo amplificação cruzada de espécies que divergiram cerca 470 milhões anos. O uso de marcadores heterólogos, no entanto, depende do cuidadoso e da observação do comportamento do marcador em uma amostra de indivíduos de uma mesma população, pois a distância evolutiva pode implicar na perda da informação original contida nos sítios de anelamentos de iniciadores (*primers*), o que potencialmente leva a artefatos que impedem a detecção de um ou mais alelos na população (os chamados alelos nulos) (Wang *et al.*, 2012). Estes alelos, apesar de segregarem na amostra, não são detectados na PCR e levam a conclusão errônea de que heterozigotos com um alelo nulo são homozigotos. Uma forma parcial de se resolver esse problema é encontrar marcadores em Equilíbrio de Hardy-Weiberg, marcadores onde a frequência dos diferentes genótipos encontrados na população está de acordo com o esperado a partir das frequêcias observadas dos diferentes alelos. Marcadores heterólogos também necessitam, muitas vezes, de ajuste nas condições de amplificação na PCR, particularmente, no tocante à temperatura de anelamento de oligonucleotídeos iniciadores.

2 - JUSTIFICATIVAS

2.1. Importância do pescado

Em 2010 a produção mundial de pescado foi de 148 milhões de toneladas (FAO, 2010). O Brasil, apesar de possuir a maior reserva de água doce do mundo e área disponível para produção aquícola, ocupa apenas a 19º posição em produção total de pescado no mundo, com 1.264.765 toneladas/ano (0,75% da produção mundial) (MPA, 2011).

Em relação a produção brasileira, o estado de Minas Gerais ocupa a modesta 13º em produção total de pescado, com 35.797,6 toneladas/ano, pulando para 9º quando considera apenas a produção extrativa continental (MPA, 2011).

Segundo o Ministério da Pesca e Aquicultura, o pescado é a proteína animal mais consumida no mundo, mas ainda tem muito a crescer no país. Em 2011 a média de consumo mundial foi de 18,6 Kg por habitante ano, segundo a Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO). No Brasil o ministério da pesca e aqüicultura estimou um consumo de 11,17 Kg/hab/ano, houve um crescimento de 14,5 % em relação ao ano anterior Esse valor ainda está abaixo do recomendado pela Organização Mundial da Saúde (OMS) que recomenda o consumo de 12 Kg/hab/ano.

A identificação do pescado destinado aos consumidores normalmente são feitas através de características físicas. É um método invasivo possível de fraudes, por isso a utilização de marcadores moleculares surge como uma alternativa na fiscalização e certificação da procedência do pescado.

2.2. Conservação

A pesca predatória, poluição, introdução de espécies exóticas, destruição das matas ciliares, a implementações de barragens hidrelétricas tem causado profundas modificações na dinâmica dos rios e no declínio da ictiofauna Neotropical (Zaniboni-Filho *et al*., 2006; Panarari-Antunes *et al*., 2011). A alteração dos regimes hídricos promove a formação de novos habitats (Agostinho *et al*., 2003), comprometendo a sobrevivência dos peixes nativos, principalmente os peixes que fazem migração reprodutiva - a piracema (Freato *et al*., 2005).

No caso da piracanjuba, a diminuição das populações e a perda da diversidade genética torna essa espécie mais suceptível a extinção (Panarari-Antunes *et al*., 2011). Para amenizar este problema, vem sendo desenvolvidos programas para recuperação de áreas impactadas, com o objetivo de repovoar a ictiofauna de seus ambientes aquáticos.

Sabe-se que está havendo uma redução dos estoques de peixes nos rios brasileiros e os peixamentos surgiram como uma alternativa para repovoar bacias hidrográficas. Mas este sistema pode apresentar um risco para as populações naturais, pois normalmente os peixes vindos deste sistema de reprodução podem apresentar perfis genéticos distintos. Alevinos produzidos em pisciculturas para repovoamento são derivados de poucos reprodutores (Norris *et al*., 1999), o que pode levar a intensa ocorrência de deriva genética aleatória (alteração estocástica das frequências dos diferentes alelos no estoque), através de efeito fundador/gargalo genético populacional, o que não ocorreria de forma tão pronunciada sob condições naturais com grandes tamanhos de cardumes. Esse tipo de manejo pode comprometer a variabilidade genética em certas situações e precisam ser monitorados para que tenhamos uma melhor compreensão sob os possíveis impactos benéficos e deletérios das práticas de manejo.

Por isso é importante o conhecimento da diversidade genética dos peixes destinados à programas de repovoamento e peixamento dos rios, pois alevinos produzidos em pisciculturas podem não ser adaptados ao ambiente natural, onde a competição e a busca por alimento é muito grande. Também, pouco se sabe sobre a estrutura genética de populações naturais e de onde vem os reprodutores ou onde serão reintroduzidos os peixes de peixamentos (Ryman *et al.*, 1995).

Recomenda-se que os casais reprodutores não devam permanecer no estoque por mais de uma geração (Cross, 2000), devido o risco de diminuição da variabilidade genética das progênies. Estudos mostram que a diminuição da variabilidade genética pode ocorrer logo na primeira geração, sendo responsáveis pelos efeitos negativos sobre a capacidade reprodutiva e de crescimento da população (Porta *et al*., 2006).

Ações feitas com o objetivo de preservar os recursos naturais, são importantes. Se forem feitas de forma adequada, baseado em conhecimento da ictiofauna local e em estudos genéticos.

De forma mais geral, através de marcadores genéticos, pode-se:

- Verificar se os barramentos encontrados no alto rio Grande estão afetando o fluxo gênico entre populações de peixes à jusante e à montante;
- Avaliar e comparar a diversidade genética de estoques de piscicultura e cardumes naturais;
- Selecionar matrizes para reprodução na piscicultura de forma a minimizar a endogamia;
- Realizar exames de paternidade;
- Desenvolver sistemas de certificação;
- Elucidar a estrutura genética populacional (forma como a variabilidade genética está distribuída ao longo dos estoques.

3 - OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

O objetivo deste trabalho foi desenvolver ferramentas moleculares heterólogas capazes de serem aplicadas a estudos e programas de monitoramento e manejo genético de *Brycon orbignyanus*, um peixe de importância ambiental e com potencial para produção em pisciculturas.

3.2. Objetivos específicos

- Testar a transferibilidade de *loci* microssatélites previamente isolados em cinco espécies de água doce, na detecção de polimorfismos genéticos do genoma de *Brycon orbignyanus;*
- Validar estas ferramentas moleculares para uso em estoques de pisciculturas e populações naturais de *Brycon orbignyanus*.

4 - MATERIAL E MÉTODOS

Foram testados 41 *loci* microssatélites previamente descritos na literatura para cinco espécies de caracídeos: foram empregados sete *loci* de *Brycon hilarii* (Sanches e Galetti, 2006), sete de *Brycon opalinus* (Barroso *et al.*, 2003), oito de *Salminus brasiliensis* (Rueda *et al.*, 2011), nove de *Salminus hilarii* (Silva e Hilsdorf, 2011) e 10 de *Salminus franciscanus* (Rossini *et al.*, 2011). Para informação da composição de bases dos iniciadores utilizados (ver Apêndice A1). Inicialmente, os testes foram feitos em cinco indivíduos, sendo os ensaios posteriores aplicados a uma amostra populacional de 49 diferentes indivíduos de *Brycon orbignyanus* (Figura 1), capturados e mantidos em tanques-rede as margens do Rio Grande, a montante da Usina Hidrelétrica de Itutinga (21° 40'S, 44° 23'W), MG, Brasil. Os indivíduos foram capturados no reservatório e posteriormente utilizados para formação de matrizes para a produção da piscicultura.

Figura 1 - Exemplar *de B. orbignyanus* coletado em 11/01/2012 na Estação de Piscicultura de Itutinga (Fotografia: Gabriel de M. Yazbeck).

Fragmentos da nadadeira caudal (cerca de 3-5 mm^2) foram coletados e fixados em etanol 70 % dentro de tubos eppendorf de 1,5 mL. Para extração de DNA utilizou-se o método de Chelex/proteinase (Walsh *et al*., 1991), cada tubo foi adicionado 200 µL de tampão contendo 5% de resina chelex 100 e 0,1 % de SDS (dodecil sulfato de sódio), nesta solução adicionou-se um pequeno fragmento de tecido, em seguida foi adicionado 2 µL de proteinase K (10 mg/mL). Os tubos foram levados para um termociclador LongGene MG96G, sendo aquecidos por 56°C por 30 min. e na sequência 98°C por 8 min.. Os tubos foram armazenados em refrigerador a 4°C. As extrações de DNA foram diluídas na proporção 1:10, e usadas em ensaios de PCR de 12,5 µL de volume total.

Para testar o sucesso da amplificação cruzada foram utilizadas inicialmente as condições de PCR descritas pelos autores. Os *loci* que apresentaram padrões de amplificação consistente e com polimorfismos foram otimizados quanto suas condições de PCR, principalmente testando diferentes concentrações de *primers*, Mg^{+2} e Taq DNA polimerase, também foram realizados ensaios com gradientes de temperatura com o objetivo de determinar a temperatura ótima de anelamento, geralmente com uma variação de temperatura de 8-12°C, replicando um par de reações através das diferentes temperaturas. O teste consiste na observação de bandas de DNA com melhores padrões e o mínimo de inespecificidades nas amplificações. As temperaturas de anelamento que apresentaram melhores resultados foram utilizadas para análises populacionais.

As reações padronizadas de PCR foram realizadas com Tampão 1X (10 mM de Tris-HCl pH 8,8 e 25 mM KCl), 0,16 µM de cada primer (direto e reverso), 0,2 mM de dNTP, 2,2 mM de $MgCl_2$, 1,25 U de Phoneutria Taq DNA polimerase e um fragmento de DNA, o volume total de cada reação foi de 12,5 µL. As reações foram realizadas em termociclador LongGene MG96G, seguindo as seguintes condições: 4 min. a 94°C, 30 ciclos de 30s de desnaturação a 94°C, 30s de anelamento a temperatura definida para cada *locus* e 30s de extensão a 72°C, com extensão final a 72°C por 10 min.

Os produtos das PCRs foram previamente corados com um indicador de corrida (Azul de bromofenol), para permitir melhor visualização do padrão de migração, e aplicados em eletroforese em gel de poliacrilamida 12% (acrilamida e bis-acrilamida, relação 29:1 respectivamente). Os géis foram preparados com TAE 1X (Tris acetato EDTA), TEMED (tetrametiletilendiamina) e persulfato de amônio 10%. As corridas

foram realizadas em eletroforese vertical submetida a um campo elétrico 4.5 V/cm por 15 horas dentro de uma solução tampão de TAE 1X.

Todos os géis foram corados em uma solução de brometo de etídeo 0,005% (0,25 µg/mL) durante 20 min. e lavados com água destilada por 10 min., em seguida foram colocados em um transiluminador UVB, e submetidos à luz ultravioleta de 380 a 420 nm. Após a visualização das bandas os géis foram fotografados com máquina fotográfica Canon Power Shot A640. Cada gel tinha de três a cinco canaletas com marcadores Promega de peso molecular de 25 pb.

As imagens digitais foram analisadas no *software* GelAnalyzer (Lazar, 2010). As estimativas de tamanho de fragmento resultante da amplificação heteróloga, foram baseados em bandas com tamanhos conhecidos (marcadores de peso molecular de 25 pb). Foram definidas o número de alelos por *locus* para posterior análise no *software* GenePop (Versão 4.1.4, Rousset, 2008). Foi realizada a binagem (procedimento de alocação dos fragmentos de DNA observados em classes de alelos) baseada na frequência de observação de tamanhos de bandas. Para cada *locus* foi testado a existência de desequilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE). Os *loci* que desviaram do HWE, foram analisados quanto ao déficit ou excesso de heterozigotos para inferência sobre a presença de alelos nulos. A amostra populacional foi testada quanto a presença de Desequilíbrio de Ligação (DL), que consiste na associação não aleatória de alelos de diferentes pares de *loci*. Todos os níveis de significância de 5% foram ajustadas empregando correções de Bonferroni (Dunn, 1961), dividindo o valor α teste (α=0,05) pelo número de *loci* analisados (10 *loci*), resultando num valor de α=0,005.

Para cada *locus* foi testado o Equilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE) de acordo com um teste exato de probabilidade (Guo e Thompson, 1992). Os *loci* que desviaram significativamente (após a correção de Bonferroni) do HWE foram posteriormente testados quanto ao déficit de heterozigotos (possível efeito da presença de alelos nulos).

4 - RESULTADOS

Os marcadores candidatos à amplificação cruzada entre espécies foram otimizadas para condições de PCR com o DNA genômico total de *B. orbignyanus* e os resultados da padronização das reações são apresentados na (Tabela 1).

Tabela 1 - Resultados da otimização das condições de PCR para amplificação cruzada de marcadores polimórficos em *B. orbignyanus*.

Marcador heterólogo	$MgCl_2$ (mM)	*Primer* (Cada) (µM)	Taq (U)	Temp. Anel.(°C)
Sfra04	2,00	0,20	1,25	57
Sm25	2,00	0,20	0,90	54
BoM1	2,20	0,12	1,00	50
BoM2	2,20	0,16	1,25	58
BoM6	2,20	0,12	1,25	63
BoM13	2,20	0,48	1,25	57
Bh5	1,25	0,48	0,50	60
Bh6	1,25	0,48	0,50	62
Bh13	1,25	0,48	0,50	55
Bh16	1,25	0,48	0,50	63

Dos 41 marcadores microssatélites de Characidae, apenas dez marcadores geraram amplificações satisfatórias, recorrentes, polimórficas e passíveis de aplicação em genotipagens claras e inambíguas, (*i.e.* apresentando uma ou duas bandas mais intensas, entre 100 e 300 pb). Estes marcadores foram otimizadas para análises populacionais posteriores. Outros 14 marcadores resultaram em padrão de bandeamento aparentemente inespecífico (entre esses, o *locus* Sh01, que apesar de ser polimórfico, apresenta amplificação irregular). Oito *loci* não geraram qualquer banda amplificação detectável e nove marcadores apresentaram um padrão completamente monomórfico. As (Figuras 2 e 3) mostram dois exemplos de resultado de corrida eletroforética com produtos de PCR oriundos de amplificações heterólogas em piracanjuba.

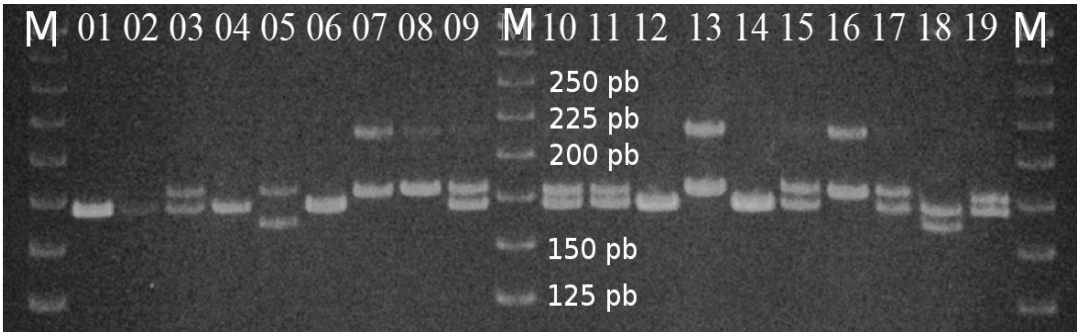

Figura 2 - Eletroforese em gel de poliacrilamida 12%, amplificação utilizando o *locus* Bh6 em *B. orbignyanus.* M=Marcador de 25 pb

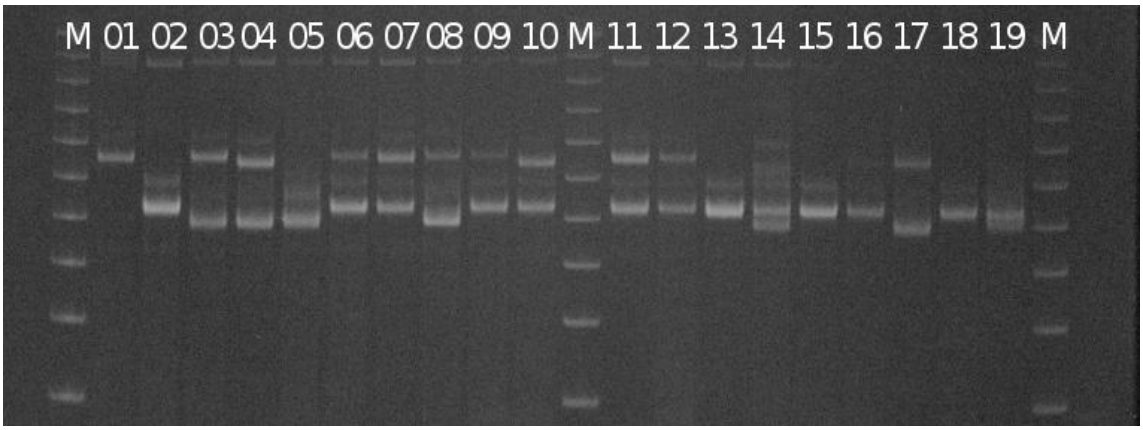

Figura 3 - Eletroforese em gel de poliacrilamida 12%, amplificação utilizando o *locus* BoM6 em *Brycon orbignyanus*. M=Marcador de 25 pb.

Todos *loci* microssatélites de *Brycon opalinus* utilizados em indivíduos de *B. orbignyanus* nesse trabalho, apresentaram algum padrão de amplificação, quatro destes *loci* mostraram polimorfismo. Foram observados um total de 16 alelos, dois alelos para o *locus* BoM2, quatro para os *loci* BoM1 e BoM13, e seis para *locus* BoM6. Com tamanho de fragmento variando de 131-198 pb (Tabela 2).

Todos *loci* microssatélites de *Brycon hilarii* apresentaram amplificação nítida e destes, quatro apresentaram ser polimórficos, sendo observados de quatro a sete alelos, com tamanho de fragmento variando de 140-225 pb. O *locus* Bh6 foi o que apresentou mais alelos e o Bh16 apresentou menos alelos **(**Tabela 2).

Dos 27 *loci* microssatélites de *Salminus* spp. testados, aproximadamente 81% apresentaram amplificação satisfatória, destes apenas três manifestaram polimorfismo, sendo eles Sfra04, Sm25 e Sh01 apresentando no máximo três alelos (Tabela 2). O *locus* Sh01 foi descartado para análise populacional por não manter um padrão de amplificação adequado para análises.

As freqüências alélicas de cada um dos *locus* (BoM, Bh, Sfra e Sm) na população de *B. orbignyanus* podem ser observadas no Apêndice A2.

Cinco marcadores polimórficos (BoM1, BoM2, BoM13, Bh6 e Bh16) mostraram estar em Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) (Tabela 3).

Tabela 2 - Número de alelos gerados por *locus*, motivo de repetição e tamanho de fragmentos observados neste estudo.

Loci	Número de alelos	Motivo de repetição	Tamanho de fragmento (pb)
Sfra04	3	$(AC)_6TCTCGCTCACA(CACG)_4$	153-163
Sm25	2	(AC)	200-220
BoM1	4	$(CA)_{16}$	146-198
BoM2	2	$(CA)_{45}$	131-149
BoM6	6	$(CA)_5TA(CA)_{10}T(CA)_4$	134-172
BoM13	4	$(CT)_{11}$	160-186
Bh5	5	$(AC)_{13}$	199-225
Bh6	7	$(GT)_{14}$	162-218
Bh13	6	$(AT)_7$	142-165
Bh16	4	$(TAA)_6$	140-166

Tabela 3 - Equilíbrio de Hardy-Weinberg em amplificações heterólogas utilizando *primers* de *Salminus franciscanus* (Sfra04), *Salminus brasiliensis* (Sm), *Brycon opalinus* (BoM) e *Brycon hilarii* (Bh) em *Brycon orbignyanus*. Ho=Heterozigosidade observada, He=Heterozigosidade esperada.

Lista dos *Primers*	Ho/He	Teste exato (p)	Déficit de heterozigoto (p)	EHW
Sfra04	0,22/0,60	0,00001*	0,0000*	Não
Sm25	0,18/0,40	0,00030*	0,0003*	Não
BoM1	0,63/0,69	0,36220	-	Sim
BoM2	0,50/0,37	0,02330	-	Sim
BoM6	0,85/0,78	0,00340*	0,9913	Não
BoM13	0,59/0,70	0,48970	-	Sim
Bh5	0,45/0,72	0,00010*	0,0000*	Não
Bh6	0,65/0,66	0,16850	-	Sim
Bh13	0,36/0,80	0,00010*	0,0000*	Não
Bh16	0,48/0,40	0,43540	-	Sim

*Valor de P<0,005 (Valor após correção de Bonferroni)

Tabela 4 - Resultados das análises para desequilíbrio de ligação. Os valores na diagonal superior da tabela indicam os valores de significância (p) encontrados com auxílio do programa GenePop. Aqui são considerados significativos valores de p<0,005*, em função da correção de Bonferroni.

Desequilíbrio de ligação										
Loci	Sfra04	Sm25	BoM1	BoM2	BoM6	BoM13	Bh5	Bh6	Bh13	Bh16
Sfra04	-	0,1209	0,3234	0,0473	0,4356	0,2155	0,7169	0,5613	0,9337	0,4742
Sm25		-	0,3073	0,0511	0,9447	0,6219	0,1180	0,8404	0,8003	0,0705
BoM1			-	0,2261	0,2558	0,0006*	0,0766	0,8893	0,0161	0,6553
BoM2				-	0,3851	0,6000	0,0013*	0,0069	0,0936	0,1362
BoM6					-	0,6264	0,2157	0,1226	0,9073	0,0766
BoM13						-	0,1985	0,7778	0,3996	0,6093
Bh5							-	0,0021*	0,0512	0,0417
Bh6								-	1,0000	0,2204
Bh13									-	0,2723

Os *loci* BoM6, Bh5, Bh6, Bh16, Sm25 e Sfra04 desviaram do HWE. O desvio dos *loci* Bh5, Bh13, Sm25 e Sfra04 foram devido ao déficit de heterozigotos, enquanto que o desvio do EHW para o *locus* BoM6 foi por excesso de heterozigotos (Tabela 3).

O desequilíbrio de ligação, associação não aleatória entre alelos de dois ou mais *loci* foi avaliado na amostra de 49 peixes destinados a formação de plantel em Itutinga. De todos *marcadores* testados somente as combinações: BoM1 x BoM13; BoM2 x Bh5 e Bh5 x Bh6 mostraram estar em desequilíbrio de ligação (Tabela 4).

5 - DISCUSSÃO

Dentre os 41 *loci* descritos para espécies próximas triados, 10 demonstraram a capacidade de amplificações cruzadas polimórficas no DNA de *B. orbignyanus*. Os demais marcadores ou apresentaram comportamento monomórfico (hipótese a qual não tem utilidade em estudos populacionais) ou falharam em gerar amplificações heterólogas consistentes e reprodutíveis. Os *loci* polimórficos foram analisados para comportamento mendeliano (através de análise do EHW) e uma descrição de sua diversidade genética foi feita na amostra de piracanjubas aqui analisadas. Ainda que alguns dos marcadores (ex. Bh) já tivessem sido descritos como passíveis de amplificações cruzadas em *B. orbignyanus*, este trabalho foi o primeiro a oferecer uma descrição mais detalhada desta aplicação heteróloga. Os resultados aqui encontrados são portanto, importantes em relação à validação de novos marcadores moleculares úteis nesta espécie de interesse.

Neste trabalho foram considerados validados para aplicação populacional todos marcadores que estavam em EHW (Bh6, Bh16, BoM1, BoM2 e BoM13) na amostra, ou cujo desvio do equilíbrio foi no sentido contrário ao déficit de heterozigotos (BoM6). Os demais marcadores exibiram desvios significativos do EHW e apresentaram déficit de heterozigotos. Ainda que estes marcadores não estejam necessariamente descartados para uso em *B. orbignyanus*, o excesso de homozigotos por eles apresentados pode ser devido à segregação de alelos nulos na população. Mais testes podem ser feitos nestes marcadores para avaliações das causas destes desvios de EHW.

Os resultados deste trabalho divergem, em parte, dos resultados encontrados por outros pesquisadores que utilizaram *loci* de *B*rycon spp. em *B. orbignyanus*. Rodriguez-Rodriguez *et al.* (2010) encontraram três alelos para os *loci* BoM1, BoM5, BoM7,

BoM13 e dois alelos para o locos BoM2, com variação de tamanho de fragmento de 150-200 pb em seu trabalho que avaliou diversidade genética de piracanjubas em programas de repovoamento. Os resultados deste presente trabalho com os *loci* BoM, apresentaram amplificações polimórficas com maior quantidade de alelos (entre dois a seis). Com relação ao *locus* BoM2 o número de alelos foi similar. Houve amplificação polimórfica para o *locus* BoM6 e não obteve amplificações consistentes para os *loci* BoM5 e BoM7. Com relação à variação de fragmento, observa-se que existes valores que estão abaixo de 150 pb.

Lopera-Barrero *et al.* (2010) encontraram apenas dois alelos para os *loci* BoM1, BoM2, BoM7 e BoM13, e o *locus* BoM5 foi considerado monomórfico em seu trabalho que avaliou diversidade genética de *Brycon orbignyanus* em sistema reprodutivo seminatural. No entanto, no que diz respeito à amplitude de tamanho dos fragmentos seus resultados estão mais próximos aos relatados nesse trabalho de 135-200 pb. Lopera-Barrero (2007) não obteve sucesso na amplificação com os *loci* BoM6 e BoM12 em indivíduos de *B. orbignyanus*, divergindo dos resultados apresentados neste trabalho.

Barroso *et al.* (2003) utilizaram *loci* de *B. opalinus* em amplificações heterólogas em *B. orbignyanus*, *em* analises feitas utilizando sistema de eletroforese capilar, encontraram resultados semelhantes aos deste trabalho, aos de Rodriguez *et al.* (2010) e aos de Lopera-Barrero *et al.* (2010) no que diz respeito a tamanho de fragmentos. Quanto ao polimorfismo, relataram monomorfismo para os *loci* BoM1 e BoM13, divergindo dos resultados de Rodriguez *et al.* (2010) e Lopera-Barrero *et al. (*2010) e dos aqui apresentados. Quanto ao *locus* BoM6, os resultados são compatíveis com este, tanto para o tamanho de fragmento quanto para o polimorfismo. Um dos motivos dos diferentes resultados pode ser o tamanho amostral. O trabalho de Barroso *et al.* (2003) utilizaram apenas dois indivíduos, pois o objetivo principal seria validar os *loci* isolados.

Ashikaga (2013) avaliando estruturação genética de *B. orbignyanus* de oito amostras da bacia do Rio Paraná, encontrou média de 9,625 e 6,750 alelos (*loci* BoM6 e BoM13 respectivamente), com relação ao EHW, apenas duas amostras desviaram do equilíbrio, e todas as amostras mostraram déficit de heterozigotos para esses mesmos *loci*, enquanto que este trabalho apresentou de seis e quatro alelos (*loci* BoM6 e BoM13 respectivamente) e EHW somente para o *locus* BoM13, enquanto que o *locus* BoM6 apresentou excesso de heterozigotos.

Rodriguez-Rodriguez *et al.* (2010) não encontraram EHW para nenhum dos *loci* polimórficos, estes *loci* testados apresentaram alta heterozigosidade observada, com exceção do *locus* BoM2. Rodriguez-Rodriguez *et al.* (2010) verificaram ainda heterozigosidade esperada menor para progênies em relação aos parentais o que caracteriza perda da variabilidade genética devido a um efeito fundador. Lopera-Barrero *et al.* (2010) também não encontraram EHW para nenhum dos *loci*, encontraram excesso de heterozigosidade nos conjuntos BoM1, BoM7 e BoM13, no *locus* BoM2 relataram déficit de heterozigosidade, resultado divergente ao deste trabalho, que podem ser explicadas pela origem dos peixes. Diferentes populações de peixes podem sofrer pressões genéticas dentro de uma mesma bacia hidrográfica ou provavelmente a amostragem não seja de uma única população. As divergências nos resultados também podem ser explicadas por mutações nas regiões flanqueadoras desses *loci*. Isso ocorre em taxas diferentes entre os *loci* (Rico *et al.*,1996). O motivo que podem levar a queda da heterozigosidade podem ser endogamia, presença de alelos nulos, amostragem não aleatória e efeito Wahlund (Lopera-Barrero *et al.*, 2010).

Sanches e Galetti (2006) e Sanshes (2007) encontraram resultados similares ao deste trabalho amplificando *loci* de *B*rycon *hilarii* em *B. orbignyanus*, obtendo variação de tamanho de fragmento de 138-226 pb, Este trabalho aqui diferiu apenas com relação ao resultado do *locus* Bh6, considerado monomórfico no trabalho desses autores. Uma hipótese pode ser o reduzido tamanho amostral, pois Sanches e Galetti (2006) não citaram o número amostral utilizado em amplificações heterólogas, Sanshes (2007) encontrou resultados semelhantes amplificando os mesmos *loci* de *Brycon hilarii* em apenas dois indivíduos de *B. orbignyanus*. Ashikaga (2013) encontrou média de 17,750 e 14,625 alelos (*loci* Bh5 e Bh13 respectivamente) e EHW para todos grupos amostrais, divergindo dos resultados deste trabalho que geraram 5 e 6 alelos (*loci* Bh5 e Bh13 respectivamente) e não foram observados EHW, com relação ao déficit de heterozigotos os resultado são compatíveis para este mesmos *loci*. Como são amostras distintas não é possível dizer se os resultados diferentes são devido ao efeito de amostragem ou as técnicas utilizadas nas análises.

O sucesso de amplificação cruzada dentro de gênero taxonômico são relatados por vários autores, Sanshes *et al.* (2012) avaliaram a estruturação genética de peixes do rio São Francisco utilizando *loci* de *B. hilarii* em *B. orthotaenia,* encontraram 39 alelos nesta população. Ramos *et al.* (2012) avaliaram estruturação genética de *Prochilodus lineatus* no Complexo Canoas utilizando *loci* microssatélites de *Leporinus*

macrocephalus, os resultados revelaram perda de heterozigosidade e valores consideráveis de endocruzamento. Barbosa *et al.* (2008) utilizaram *loci* microssatélites isolados de *Prochilodus argenteus* e obteve 100% de amplificação em *P. lineatus* e 95,45% em *P. costatus*, com polimorfismo de 90,90% e 77,27% para *P. lineatus* e *P. costatus* respectivamente, Rueda *et al*. (2011) obtiveram sucesso para amplificação cruzada para 13 *loci* de *P. lineatus* testados em *P. argenteus, P. mariae, P. magdalenae e P.* nigricans, com variação de três a 11 alelos por *locus*. Matsumoto e Hilsdorf (2009) utilizaram *loci* microssatélites isolados de *B. opalinus* e *B. cephalus* para avaliar a estruturação e variabilidade genética de *Brycon insignnis* de diferentes ambientes do Sudeste do Brasil, encontraram de três a 11 alelos por *locus*, comprovando o sucesso da amplificação cruzada dentro do gênero *Brycon.*

Os resultados aqui encontrados na amplificação de *loci* microssatélites de *Salminus* spp. em *B. orbignyanus* são compatíveis com relatos de amplificações dentro de família taxonômica apresentada por Rossini (2010) que utilizou *loci* de *B. hilarii*, *B. opalinus* e *Salminus franciscanus* em S. *Brasiliensis*, com exceção do *locus* Bh5, todos os *loci* apresentaram algum padrão de amplificação. O *locus* BoM2 e nove *loci* de *S. franciscanus* foram escolhidos para genotipagem, apresentando 10 e até 48 alelos para BoM2 e Sfra respectivamente.

Vários trabalhos destacam o sucesso da amplificação heteróloga dentro da ordem Characiformes, Olivatti *et al.* (2011) obtiveram amplificando *loci* microssatélites de *Prochilodus* em *Leporinus friderici*, destes aproximadamente 67% apresentaram polimorfismo, este mesmo trabalho, Olivatti *et al.* (2011) conseguiram amplificações de *loci* de *Axtyanax fasciatus* em *L. friderici*, representantes de gêneros distintos. Morelli *et al.* (2007) amplificaram *loci* microssatélites de *L. macrocephalus* em *P. lineatus* obtendo 75% de amplificação, destes três *loci* foram considerados polimórficos.

Neste trabalho é possível constatar que a riqueza alélica resultante das amplificações estão diretamente ligadas a proximidade entre as espécies, os *loci* polimórficos Bh, BoM e Sfra e Sm geraram em média 5,5; 4; 3 e 2 alelos respectivamente. Os melhores resultados foram observados utilizando *loci* de *Brycon hilarii em B. orbignyanus*, pode ser devido a relação estreita entre estas duas espécies (Hilsdorf *et al.*, 2008). Apesar de somente dois *loci* de *Salminus spp.* apresentarem polimórfismo, 81% dos *loci* mostraram algum padrão de amplificação, resultado acima do esperado dentro de família taxonômica (Barbará *et al.*, 2007). O sucesso desta amplificação pode ser explicado pela proximidade filogenética entre os gêneros

Salminus e *Brycon*, considerado grupo-irmão (Orti e Meyer, 1999; Calcagnotto *et al*., 2005 e Aba, 2011).

Neste trabalho verificamos a existência de desequilíbrio de ligação significativas em três pares dentre as 45 comparações possíveis. Isso indica que a maioria dos *loci* se comportam de acordo com o esperado pela segunda lei de Mendel (segregação independente) nesta população e que há uma associação verdadeiramente aleatória entre os diferentes alelos de diferentes *loci*. Esse é um parâmetro importante para a verificação de subestrutura genética na amostra (*i.e.* a amostra não é uma única população panmítica), no entanto, a verificação de EHW para alguns *loci* indica se tratar de uma amostra de uma única população.

Em relação ao desequilíbrio de ligação, Rodriguez-Rodriguez *et al.* (2010) encontraram seis agrupamentos em desequilíbrio de ligação (BoM1xBoM5, BoM1xBoM7, BoM1xBoM13, BoM5xBoM7, BoM5xBoM13, BoM7xBoM13). Sendo o desequilibro de ligação da combinação BoM1xBoM13 foi similar ao deste trabalho.

Uma das causas que pode levar tal desequilíbrio é a presença dos *loci* próximos fisicamente no mesmo cromossomo. Diante de tal consideração é possível dizer que os *combinação* BoM1xBoM13 podem estar fisicamente próximos na espécie *Brycon orbignyanus.* Porém, outras causas importantes para o DL são a seleção, a subestrutura populacional na amostra (ex. dois cardumes distintos misturados como uma única população), deriva aleatória por populações reduzidas ou gargalos populacionais; migração e cruzamentos preferenciais (não aleatórios) (Ridley, 2006).

Outros *loci* também mostraram DL (BoM2xBh5, Bh5xBh6) e essas associações podem ser exploradas em trabalhos futuros para busca de marcadores fisicamente agrupados, ou marcadores capazes de elucidar aspectos ocultos da biologia reprodutiva destes peixes.

6 - CONCLUSÕES

- Pelo menos seis *loci* analisados neste trabalho foram validados (BoM1, BoM2, BoM13, Bh6, Bh16 e BoM6) e podem ser utilizadas como ferramentas eficazes para o monitoramento de populações de *B. orbignyanus*.

- A existencia de Equilibrio de Hardy-Weinberg e excesso de heterozigotos na maioria dos *loci* microssatelites, é uma evidência que os acasalamentos ocorreram ao acaso ou de forma contrária à endogamia na população selvagem analisada.

- A amostra analisada parece ser oriunda de uma única população de acasalamentos aleatórios (panmítica)

- Os reprodutores selvagens podem ser utilizados em programas de peixamentos, desde que não ultrapasse duas gerações. ainda assim é recomendado acompanhar o desempenho das progênies nos ambientes naturais.

- O sucesso da amplificação heteróloga está diretamente ligada a próximidade filogenética entres as espécies, mostrando a necessidade de um estudo prévio antes de usar está ferramenta.

7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABE, K. T. Análise das relações filogenéticas entre espécies da subfamília Bryconinae (Ostariophysi: Characiformes: Characidae) utilizando sequências de DNA mitocondrial e nuclear. Tese Doutorado em Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Biociências, Universidade Estadual de Paulista, Botucatu, 2001, 140 p.

AGOSTINHO, A. A.; GOMES, L. C.; SUZUKI, H. I.; JULIO JR., H. F. Migratory fishes of the Upper Paraná river basin, Brazil. In: CAROSFELD, J.; I HARVEY, B.; ROSS, C.; BAER, A. Migratory fishes of South America: biology, fisheries and conservation status. Ottawa: World Fisheries Trust, International Bank for Reconstruction and Development/The World Bank, p. 19-98, 2003.

ALAM, S.; ISLAM, S. Population genetic structure of Catla catla (Hamilton) revealed by microsatellite DNA markers. Aquaculture, v. 246, p. 151-160, 2005.

ASHIKAGA, F. Y. Análise da Estrutura Genética de *Brycon orbignyanus* na Bacia do Rio Paraná para Fins de Conservação. Tese de Doutorado em zoologia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Universidade Estadual Paulista-UNESP, Botucatu, 2013, 89 p.

CAROSFELD, J.; HARVEY, B.; ROSS, C.; BAER, A. Migratory Fishes of SouthAmerica. Victoria: World Fisheries Trust, 2003, 384 p.

BARBARÁ, T.; PALMA-SILVA, C.; PAGGI, G. M.; BERED, F.; FAY, M. F.; LEXER, C. Cross-species transfer of nuclear microsatellite markers: potential and limitations. Molecular Ecology, v. 16, p. 3759-3767, 2007.

BORBA, M. R.; FRACALOSSI, D. M.; PEZZATO, L. E.; MENOYO, D.; BAUTISTA, J.M. Growth, lipogenesis and body composition of piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) fingerlings fed different dietary protein and lipid concentrations. Aquat. Living Resour, v. 16, p. 362-369, 2003.

BARBOSA, A. C. D. R.; GALZERANI, F.; CORRÊA, T. C.; GALETTI JR., P. M.; HATANAKA, T. Description of novel microsatellite loci in the Neotropical fish *Prochilodus argenteus* and cross-amplification in P. Costatus and *P. lineatus*. Genetics and Molecular Biology, v. 31, n. 1 (suppl), p. 357-360, 2008.

BARROSO, R. M.; HILSDORF, A. W. S.; MOREIRA, H. L. M.; MELLO, A. M.; GUIMARÃES, S. E. F.; CABELLO, P. H.; TRAUB-CSEKO, Y. M. Identification and characterization of microsatellites *loci* in *Brycon opalinus* (Cuvier, 1819) (Characiforme, Characidae, *Bryconiae*).Molecular Ecology Notes, v. 3, p. 297-298, 2003.

BRITTO, S. G. C.; SIROL, R. N.; VIANNA, N. C.; JARDIM, S. M.; SANTOS, J. C.; PELISARI, E. Peixes do rio Paranapanema. Duke Energy Internacional Geração Paranapanema, 2003, 112 p.

CALCAGNOTTO, D.; SCHAEFER, S. A.; DESALLE, R. Relationships among characiform fishes inferred from analysis of nuclear and mitochondrial gene sequences. Molecular Phylogenetics and Evolution, v. 36, p. 135-153, 2005.

CROSS, T. Genetic implications of translocation and stocking of fish species, with particular reference to Western Australia. Aquaculture Research, v. 31, p. 83-94, 2000.

DEWOODY, J. A.; AVISE, J. C. Microsatellite variation in marine, freshwater and anadromous fishes compared with other animals. Journal of Fish Biology, v. 56, p. 461-473, 2000.

DUNN, O. J. Multiple comparisons among means. *J. Am. Stat. Assoc.*, v. *56*, p. *52*-64, 1961.

ELLEGREN, H. Microsatellites: simple sequences with complex evolution. Nature Reviews Genetics, v. 5, n. 6, p. 435-445, 2004.

ESCHMEYER, W. N.; FRICKE, R.; FONG, D. J.; POLACK D. A. Marine fish diversity: history of knowledge and discovery (Pisces). Zootaxa, v. 2525, p. 19-50, 2010.

FAO - FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. The state of world fisheries and aquaculture, 2012, 230 p.

FILHO, J. L. A.; BRAGA, T. O.; MONTEIRO, A. C. M. C.; FILHO, A. G.; STEFANI, F. S.; DEHIRA, L. K.; CARNESECA, M. H.; LELO, P. K. Y.; HELLMEISTER, Z.; SANTOS, A. S.; KOOPEZYNSKI, A. C.; MARTINS, A. M. A. D.; NACHBAL, B.; ALVARENGA, M. C.; BARBIM, R. B. Diagnóstico da situação dos recursos hídricos na Bacia Hidrográfica do Rio Grande (BHRG) – SP/MG (Relatório Síntese – R3). Instituto de Pesquisas Tecnológicas, 2008, 52 p.

FREATO, T. A.; FREITAS, R. T. F.; SANTOS, V. B.; LOGATO, P. V. R.; MENDONÇA, A. T. Efeitos do peso de abate nos rendimentos do Processamento da piracanjuba (*Brycon orbignyanus*, Valenciennes, 1849). Ciência e Agrotecnologia, v. 29, n. 3, p. 676-682, 2005.

HICKLEY, P. Stocking and introduction of fish: a siynthesis. In: COWX, L. G. Rehabilitation of freshwater fisheries. Fishing news books, p. 297-254, 1994.

HILSDORF, A. W. S.; OLIVEIRA, C.; LIMA, F. C. T.;MATSUMOTO, C. K. A phylogenetic analysis of *Brycon* and *Henochilus* (Characiformes, Characidae, Bryconinae) based on the mitochondrial gene 16S Rrna. Genetics and Molecular Biology, v. 31, n. 1 (suppl), p. 366-371, 2011.

HOSHINO, A. A.; BRAVO, J. P.; NOBILE, P. M.; MORELLI, K. A. Microsatellites as Tools for Genetic Diversity Analysis. In: Tech. 1ed, v. 4, p. 149-170, 2010.

JAVONILLO, R.; MALABARBA, L. R.; WEITZMAN, S. H.; BURNS, J. R. Relationships among major lineages of characid fishes (Teleostei: Ostariophysi: Characiformes), based on molecular sequence data. Molecular Phylogenetics and Evolution, v. 54, p. 498-511, 2010.

LAZAR, I. GelAnalyzer, 2010. Disponível em <http://www.gelanalyzer.com>. Acessado em 13/08/2013;

LIMA, F. C. T Subfamily Bryconinae. In: Reis, R. E.; KULLANDER, S. O.; FERRARIS JR..C. J. Check List of the Freshwater Fishes of South and Central America. EDIPUCRS, p. 174-181, 2003.

LOPERA-BARRERO, N. M. Diversidade Genética e Manejo Reprodutivo da Piracanjuba, *Bryconorbignyanus*. Tese Doutorado em Zootecnia, Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2007, 120 p.

LOPERA-BARRERO, M. N. Conservation of *Brycon orbignyanus* natural populations and stocks for their reproductive, genetic, environmental sustainability: A model for species threatened with extinction. Cien. Inv. Agr., v. 36, n. 2, p. 191-208, 2009.

LOPERA-BARRERO, N. M.; VARGAS, L.; NARDEZ-SIROL, R.; RIBEIRO, P. R.; POVH, A. J.; STREIT JR., D. P.; GOMES, P. C. Diversidad Genética y Contribución reproductiva de una Progenie de *Brycon orbignyanus* em el Sistema Reproductivo Seminatural Usando Marcadores Microsatélites. Agrociência, v.44, p.171-181, 2010.

MACHADO, A. B. M. Lista da fauna brasileira ameaçada de extinção: incluindo as espécies quase ameaçadas e deficientes em dados. Fundação Biodiversitas, 2005, 160 p.

MACHADO, A.B.M.; DRUMMOND, B.M; PAGLIA, A. P. Livro vermelho da fauna brasileira ameaçada de extinção. Fundação Biodiversitas, v. 2, 2008, 1420 p.

MACIEL, C. M. R. R.; LANNA, E. A. T.; JUNIOR, A. M.; DONZELE, J. L.; NEVES, C. A.; MENIN E. Morphological and behavioral development of the piracanjuba larvae.R. Bras. Zootec., v. 39, n. 5, p. 961-970, 2010.

MPA - Ministério da Pesca e Aquicultura. Boletim estatístico da pesca e aquicultura: Brasil, 2011, 60 p.

MATSUMOTO, C. K.; HILSDORF, A. W. S. Microsatellite variation and population genetic structure of a neotropical endangered Bryconinae species *Brycon insignis* Steindachner, 1877: implications for its conservation and sustainable management. Neotropical Ichthyology, v. 7, n. 3, p. 395-402, 2009.

MIRANDE, J. M. Phylogeny of the family Characidae (Teleostei: Characiformes): from characters to taxonomy. Neotropical Ichthyology, v. 8, p. 385-568, 2010.

MORELLI, K. A.; REVALDAVES, E.; OLIVEIRA, C.; FORESTI, F. Isolation and characterization of eight microsatellite *loci* in *Leporinus macrocephalus* (Characiformes: Anostomidae) and cross-species amplification. Molecular Ecology Notes, v. 7, p. 32-34, 2007.

MULLER, G. A.; MARCONDES, C. M.; NAVARRO-SILVA, M. A. Aplicação de marcadores microssatélites para o estudo de Culicidae (Diptera): Revisão com especial referência a Haemagogus. Boletin de Malariologia y Saud Ambiental, v. L, n. 2, p. 175-186, 2010.

MURGAS, L. D. S.; FRANCISCATTO, R. T.; SANTOS, A. G. O. Espermática Pós-Descongelamento em Piracanjuba (*Brycon orbignyanus*, Vallenciennes, 1849). R. Bras. Zootec., v. 32, n. 6, p. 1810-1814, 2003.

NELSON, J. S. Fishes of the World. 4 ed. Hoboken: John Wiley & Sons, 2006, 601 p.

NORRIS, A. T.; BRADLEY, D. G.; CUNNINGHAM, E. P. Microsatellite genetic variation between and within farmed and wild Atlantic salmon (Salmo salar) populations. Aquaculture, v. 180, p. 247-264, 1999.

OLIVATTI, M. A.; BONI, T. A.; SILVA-JUNIOR, N. J.; RESENDE, L. V.; GOUVEIA, F. O.; TELLES, M. P. C. Heterologous amplification and characterization of microsatellite markers in the Neotropical fish *Leporinus friderici*. Genetics and Molecular Research, v. 10, n. 3, p. 1403-1408, 2011.

OLIVEIRA, E. J.; PÁDUA, J. G.; ZUCCHI, M. I.; VENCOVSKY, R.; VIEIRA, M. L. C. Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. Genetics and Molecular Biology, v. 29, n. 2, p. 294-307, 2006.

OLIVEIRA, C.; AVELINO, G.; ABE, K. T.; MARIGUELA, T. C.; BENINE, R. C.; ORTI, G.; VARI, R. P.; CASTRO, R. M. C. Phylogenetic relationships within the speciose family Characidae (Teleostei: Ostariophysi: Characiformes) based on multilocus analysis and extensive ingroup sampling. BMC Evolutionary Biology, v. 11, n. 275, 2011, 25 p.

ORTI, G.; MEYER, A. The radiation of characiform fishes and the limits of resolution of mitochondrial ribosomal DNA sequences. Systematic Biology, v. 46, p. 75-100, 1997.

O'CONNELL, M.; WRIGHT, M. Microsatellite DNA in fishes. Rev. Fish Biol. Fish., v. 7, p. 331-363, 1997.

PANARARI-ANTUNES, R. S.; PRIOLI, A. J.; PRIOLI, S. M. A. P.; GALDINO, A. S.; JUNIOR, H. F. J.; PRIOLI, L. M. 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, v. 54, n. 4, p. 839-848, 2011.

PORTA, J.; PORTA, J.M.; MATÍNEZ-RODRÍGUEZ, G.; ALVAREZ, M. C. Genetic structure and genetic relatedness of a hatchery stock of Senegal sole (*Solea senegalensis*) inferred by microsatellites. *Aquaculture*, v. 251, p. 46-55, 2006.

PRIMMER, R.; MULLER, P.; ELLEGREN, H. A wide-range survey of cross-species microsatellite amplification in birds. Mol. Ecol., p. 5365-378, 1996.

REIS, R. E.; KULLANDER, S. O.; FERRARI JR., C. J. In: Check list of the freshwater fishes of South and Central America. EDPUCRS, 2003, 729 p.

RAMOS, J. V. B; SODRÉ, L. M. K.; ORSI, M. L.; ALMEIA, F. S. Genetic diversity of the species *Leporinus* elongatus (Teleostei: Characiformes) in the Canoas Complex - Paranapanema River Neotropical Ichthyology, v. 10, n. 4, p. 821-828, 2012.

RICO, C.; RICO, I.; HEWITT, G. 470 million years of conservation of microsatellite *loci* among fish species, Proc. R. Soc. Lond. B., v. 263, p. 549-557, 1996.

RIDLEY, MARK. Evolução. Tradução: FERREIRA, H.; PASSAGLIA, L.; FISHER.; R. 3 Ed. Artmed, 2006, 752 p.

RODRIGUEZ-RODRIGUEZ, M. P.; LOPERA-BARRERO, N. M.; RIBEIRO, R. P.; POVH, J. A.; VARGAS, L.; SIROL, R. N.; JACOMETO, C. B. Diversidad genética de piracanjuba usada en programas de repoblación con marcadores microsatélites. Pesq. agropec. bras., v. 45, n. 1, p. 56-63, 2010.

ROSA, R. S.; LIMA, F. C. T. Os Peixes Brasileiros Ameaçados de Extinção. Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção, p. 8-286, 2008.

ROSSINI, B. C. Caracterização da estrutura genética de populações residentes e migradoras da espécie *Salminus brasiliensis* da Bacia do rio Mogi-Guaçu. Dissertação de Mestrado em Genética e Evolução, Programa de Pós-Graduação Genética e Evolução,,Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, Brasil, 2010, 140 p.

ROSSINI, B. C.; NUNES, A. G.; FREITAS, P. D.; GALETTI JR., P. M. Permanent Genetic Resources added to Molecular Ecology Resources Database 1 December 2012-31 January 2013. Molecular Ecology Resources, v. 11, p. 586-589, 2013.

ROUSSET, F. Genepop 2007: A complete reimplementation of the Genepop software for Windows and Linux , Mol. Ecol. Resources, v. 8, p. 103-106, 2008. Disponível em: <http://genepop.curtin.edu.au/> Acessado em 14/07/2013.

RUEDA, E.C.; AMAVET, P.; BRANCOLINI, F.; SOMMER, J.; ORTI, G. Isolation and characterization of eight polymorphic microsatellite markers for the migratory characiform fish, *Salminus brasiliensis*. Journal of Fish Biology, v. 79, p. 1370-1375, 2011.

RUEDA, E.C.; SOMMER, J.; SCARABOTT, P.; MARKARIANI, R.; ORTI, G. Isolation and characterization of polymorphic microsatellite loci in the migratory freshwater fish Prochilodus lineatus (Characiformes: Prochilodontidae). Conservation Genet Resour, v. 3, p. 681–684, 2011.

RYMAN, N.; UTTER, F.; HINDAR, K. Introgression, supportive breeding, and genetic conservation. Columbia University Press, p. 341-365, 1995.

SANCHES, A., GALETTI JR, P.M. Microsatellites *loci* isolated in the freshwater fish *Brycon hilarii*. Molecular Ecology Notes, v. 6, p. 1045-1046, 2006.

SANCHES, A. Estrutura genética populacional de *Brycon hilarii* (Characidae) da sub. Bacia do Rio Miranda, e seu significado para programas de conservação.Tese de Doutorado em Ciências, Programa de Pós-Graduação Ecologia e Recursos Naturais, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2007, 126 p.

SANCHES, A., GALETTI JR., P.M.; DERAZO, J.; CUTILAK-BIANCHI, B.; HATANAKA, T. Genetic population structure of two migratory freshwater fish species (*Brycon orthotaenia* and *Prochilodus argenteus*) from the São Francisco River in Brazil and its significance for conservation. Lat. Am. J. Aquat. Res., v. 40, n. 1, p. 177-186, 2012.

SANTOS, G. B. A ictiofauna da bacia do Alto Paraná (rio Grande e rio Paranaíba). MG.BIOTA, v. 2, n. 6, 2010, 56 p.

SILVA, J. V.; HILSDORF, A.W.S. Isolation and characterization of polymorphic microsatellite *loci* from *Salminus hilarii* (Characiformes: Characidae). Conservation Gen. Res., v. 3, p. 437-439, 2011.

TAUTZ, D. Hypervariabilitiy of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. Nucleic Acids Res., v. 17, p. 6463-6471, 1989.

TONG, J.; WANG, Z.; YU, X.; WU, Q.; CHU, K. Cross-species amplification in silver carp and bighead carp with microsatellite primers of common carp. Mol. Ecol. Notes, v. 2, p. 245-247, 2002.

TONG, J.; YU, X.; LIAO, X. J. Characterization of a highly conserved microsatellite marker with utility potentials in cyprinid fishes Appl. Ichthyol., v. 21, p. 232-235, 2005.

VAN OOSTERHOUT, C.; HUTCHINSON, W. F.; WILLS, D. P. M.; SHIPLEY, P. MICRO-CHECKER: Software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. Molecular Ecology Resources, v. 4, p. 535-538, 2005.

VAZ, M. M.; TORQUATO, V. C.; BARBOSA, N. D. C. Guia ilustrado de peixes da bacia do Rio Grande. CEMIG/CETEC, 2000, 144 p.

WALSH, P. S.; METZGER, D. A.; HIGUCHI, R. Chelex 100 as a Medium for Simple Extraction of DNA for PCR-Based typing from forensic material for PCR-Based Typing from Forensic Material, Cetus Corporation and Illinois State Police Reprinted from BioTechniques, v. 10, n. 4, p. 506-513, 1991.

WANG, C.; SCHROEDER, K. B.; ROSENBERG, N. A maximum likelihood method to correct for allelic dropout in microsatellite data with no replicate genotypes. Genetics, v. 192, p. 651-669, 2012.

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

YOU-CHUN LI; KOROL, A. B.; FAHIMA, T.; BEILES, A.; NEVO, E. Microsatellites: genomic distribution, putative functions and mutational mechanisms: a review. Molecular Ecology, v. 11, p. 2453-2465, 2002.

ZANE, L.; BARGELLONI, L.; PATARNELLO, T. Strategies for microsatellite isolation: a review. Molecular Ecology, v. 11, p. 1-16, 2002.

ZANIBONI-FILHO, E.; REYNALTE-TATAJE, D.; WEINGARTNER, M. Potencialidad del género Brycon em la piscicultura brasileña. Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias, v. 19, n. 2, p. 233-240, 2006.

APÊNDICE A

Apêndice A1

Tabela 2 - Sequência de oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) utilizados neste estudo para *loci* polimórficos em amplificações heterólogas utilizando de marcadores de *Salminus franciscanus* (Sfra), *Salminus brasiliensis* (Sm), *Brycon opalinus* (BoM) e *Brycon hilarii* (Bh) em *Brycon orbignyanus.*

Lista dos *Primers*	Sequência de *primers*
Sfra04	F: ATTTAGCTGTTCGGCTGA
	R: CGGCTTATGTGACGTAGAG
Sm25	F: CCTGATTCTGCTTCTCT
	R: AAGTAATGTCATCCACAA
Bom1	F:CATCTCTACTTTTTGGTTCC
	R: TGCCCAGATACAGCCC
Bom2	F: CTGGGCAGCGGAAGAG
	R: CCACATCTCTCCCCTTCG
Bom6	F: GGAGTTTGTGTGTGGAGACCGAG
	R: GCACGCAGACACCAGA
Bom13	F: CATTTCCTCAGTCCTTTTCAGC
	R: CCCACTTAGGGTCGCAC
Bh5	F: CTTCCACTCATACCGGCACT
	R: ACATCTGGCATTAGGCATAG
Bh6	F: GCGTTGCGTGTGTATGTTAA
	R: AGAGGTGTCCACAAAGTTTT
Bh13	F: AGCAATTTAAGCAAGTGAAG
	R: GCGTCGGAGCAGTAGTTATA
Bh16	F: CCTCCAATGAAAACAGTGCG
	R: ACGACTTAGCCACCCACCCT

Apêndice A2

Tabela 1 - Número de alelos e suas respectivas frequências alélicas

Loci	Alelos						
	1	2	3	4	5	6	7
Sfra04	0.5122	0.3415	0.1463	-	-	-	-
Sm25	0.7245	0.2755	-	-	-	-	-
BoM1	0.2449	0.4388	0.1020	0.2143	-	-	-
BoM2	0.7500	0.2500	-	-	-	-	-
BoM6	0.1939	0.3367	0.1327	0.0510	0.1837	0.1020	-
BoM13	0.3980	0.2551	0.2449	0.1020	-	-	-
Bh5	0.0729	0.2396	0.3958	0.0521	0.2396	-	-
Bh6	0.0306	0.1122	0.5102	0.0306	0.2449	0.0306	0.0408
Bh13	0.1020	0.1633	0.2959	0.1735	0.1837	0.0816	-
Bh16	0.0306	0.7449	0.1837	0.0804	-	-	-